

# **Biologische Charakterisierung von Azo- und Diazocin-basierten Photoschaltern**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Linda Heintze**

Kiel 2022

Dekan: Prof. Dr. Frank Kempken  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Peifer  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rainer Herges  
Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2022  
Zum Druck genehmigt: 12.04.2022

## Kurzzusammenfassung

Die Photopharmakologie verfolgt das Ziel einer gerichteten Therapie mit hoher Raum-Zeit-Auflösung durch Licht-kontrollierte Wirkstoffaktivierung bzw. -schaltung. Damit sollen Nebenwirkungen, Resistenzbildungen und Umwelteinflüsse reduziert werden. Für eine reversible Photoschaltung werden zwei photoresponsive Isomere des Wirkstoffs benötigt. Ein Isomer sollte möglichst biologisch komplett inaktiv sein, das andere Isomer hingegen sollte möglichst hochpotent sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Azo- und Diazocin-basierte Photoschalter biologisch charakterisiert, mit besonderem Fokus auf die Eignung von Diazocinen (verbrückten Azobenzolen) für photopharmakologische Anwendungen. In diesem Rahmen wurden sowohl photoschaltbare Kinaseinhibitoren als auch photoschaltbare Estrogenrezeptor-Agonisten untersucht. Hierfür wurden entsprechende *in vitro* Kinaseassays sowie ein zellbasierter Reporterassay etabliert.

Diazocene liegen im Gegensatz zu Azobenzolen thermodynamisch stabil in der Z-Konfiguration vor. Diese Z-Konfiguration wird aufgrund ihrer stark gewinkelten Struktur als biologisch inaktiv angenommen. Bei der Photoisomerisierung zum deutlich gestreckteren, vermutlich biologisch aktiven E-Isomer kommt es zu einer gravierenden strukturellen Änderung. Diese sollte folglich mit einem großen Unterschied in den biologischen Aktivitäten mit/ohne Bestrahlung einhergehen. Die Rückschaltung zum inaktiven Z-Isomer kann thermisch oder aktiv durch Bestrahlung mit 525 nm erfolgen. Somit eignen sich Diazocene auch zur Entwicklung ökotoxikologisch verträglicher Wirkstoffe.

In einem Projekt zu photoschaltbaren Azo- bzw. Diazocin-funktionalisierten Derivaten des zugelassenen VEGFR-2 Kinaseinhibitors Axitinib konnte gezeigt werden, dass die Diazocin-Derivate im Hinblick auf den photopharmakologischen Wirkunterschied mit/ohne Bestrahlung den Azobenzol-Derivaten deutlich überlegen sind. Für zwei Schwefel-verbrückte Diazocin-Derivate konnten dabei Unterschiede mit phototherapeutischen Faktoren größer als 40 in den inhibitorischen Aktivitäten mit/ohne Bestrahlung gegenüber VEGFR-2 nachgewiesen werden.

In zwei weiteren Projekten zu photoschaltbaren Kinaseinhibitoren, in denen Diazocene an die Pharmakophore von CK1 $\delta$ -Inhibitoren bzw. Imatinib gekoppelt wurden, konnte hingegen keine biologische Aktivität bzw. kein Aktivitätsunterschied mit/ohne Bestrahlung beobachtet werden.

Den Kinaseinhibitorprojekten steht das Projekt zu photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Agonisten gegenüber, in dem ein neues Photoschalter-Design verfolgt wurde. Hier stellt das funktionalisierte Diazocin selbst das Pharmakophor dar. Durch unterschiedliche Hydroxyfunktionalisierungen der Diazocene konnte in E-Konfiguration die biologische Aktivität von  $\beta$ -Estradiol erfolgreich nachgeahmt werden. Während die Z-Isomere im Reporterassay nur sehr geringfügige Aktivitäten zeigten, konnten mit regelmäßiger Bestrahlung des Zellassays für einige Derivate gute estrogene Aktivitäten nachgewiesen werden. Für die Hydroxydiazocene konnte zudem besonders deutlich eine starke Abhängigkeit der Schalteigenschaften von den Faktoren Lösungsmittel, Temperatur und molekularer Umgebung demonstriert werden. In diesem Zusammenhang ist vor allem eine photoschaltbare Verbindung aufgefallen, deren Halbwertszeit in wässriger Lösung bei 37 °C nur 20.9 ms beträgt, die aber trotzdem eine moderate estrogene Aktivität im Reporterassay mit Bestrahlung im 3 h-Takt aufwies. Dies deutet auf eine Stabilisierung der biologisch aktiven E-Konfiguration im Estrogenrezeptor hin und würde ein neues Potential für die Photopharmakologie darstellen, da die Diffusion des photoaktivierten biologisch aktiven Wirkstoffs in andere Gewebe verhindert werden würde.



## Abstract

Photopharmacology pursues the goal of a targeted therapy with high spatiotemporal resolution by light-controlled drug activation respectively photoswitching of activity. This is intended to reduce severe side effects, the emergence of resistances and environmental impacts. For reversible photoswitching, two photoresponsive isomers of the drug are required. Ideally, one isomer should be completely biologically inactive, the other isomer should be highly potent.

In the present thesis, different azo- and diazocine-based photoswitches were biologically characterized, with a particular focus on the suitability of diazocines (bridged azobenzenes) for photopharmacological applications. In this context, both photoswitchable kinase inhibitors and photoswitchable estrogen receptor agonists were investigated. Therefore, corresponding *in vitro* kinase assays as well as a cell-based reporter gene assay were established.

Contrary to azobenzenes, diazocines are thermodynamically stable in their Z-configuration. This Z-configuration is considered to be biologically inactive due to its highly angled structure. Upon photoisomerization to the more elongated, presumably biologically active E-isomer, a major structural change occurs. This should result in a significant difference between biological activities of the compound with/without irradiation. Back-switching of diazocines to the inactive Z-isomer can take place thermally or actively by irradiation at 525 nm. Hence, diazocines are also suitable for the development of ecotoxicologically compatible drugs.

In a project on photoswitchable azo- and diazocine-functionalized derivatives of the approved VEGFR-2 kinase inhibitor axitinib, it was shown that the diazocine derivatives are far superior to the azobenzene derivatives regarding the differences in photopharmacological activities with/without irradiation. For two sulfur-bridged diazocine derivatives, differences with phototherapeutic factors greater than 40 in inhibitory activities with/without irradiation against VEGFR-2 could be proven.

In two further projects on photoswitchable kinase inhibitors, in which diazocines were coupled to the pharmacophores of CK1 $\delta$  inhibitors and imatinib, respectively, no biological activity or no difference in activities of the designed compounds with/without irradiation was observed.

The kinase inhibitor projects are contrasted with a project on photoswitchable estrogen receptor agonists, in which a new photoswitch design was pursued. Here, the functionalized diazocine itself represents the actual pharmacophore. By different hydroxy functionalizations of the diazocines, the biological activity of  $\beta$ -estradiol could be successfully imitated in the E-configuration. While the Z-isomers showed only slight activities in the reporter gene assay, good estrogenic activities could be detected for some derivatives in combination with regular irradiation of the cell assay. Furthermore, for the hydroxy-diazocines a strong dependence of the switching properties on factors including solvent, temperature and molecular environment could be demonstrated. In this context, especially one photoswitchable compound attracted attention, whose half-life in aqueous solution at 37 °C was only 20.9 ms, but which nevertheless exhibited moderate estrogenic activity in the reporter gene assay when irradiated at 3 h intervals. This indicates a stabilization of the biologically active E-configuration inside the estrogen receptor and suggests a new potential for photopharmacology by preventing diffusion of the photoactivated biologically active isomer of the drug into other tissues.



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Photopharmakologie .....   | 1         |
| 1.1.1 Reversible Photoschalter.....  | 2         |
| 1.1.1.1 Stilbene.....  | 4         |
| 1.1.1.2 Azobenzole .....   | 4         |
| 1.1.1.3 Diazocine .....  | 5         |
| 1.1.2 Bio-optisches Fenster .....  | 7         |
| 1.2 Kinaseinhibitoren .....  | 9         |
| 1.2.1 Proteinkinasen.....  | 9         |
| 1.2.1.1 Struktureller Aufbau der Kinase.....                                   | 11        |
| 1.2.1.2 Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR .....                                     | 12        |
| 1.2.1.3 Rezeptor-Tyrosinkinase PDGFR .....                                     | 13        |
| 1.2.1.4 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase ABL .....                                 | 13        |
| 1.2.2 Niedermolekulare Kinaseinhibitoren .....                                 | 14        |
| 1.2.2.1 Klassifizierung von Kinaseinhibitoren.....                             | 14        |
| 1.2.2.2 Imatinib und Nilotinib.....  | 15        |
| 1.2.2.3 Axitinib.....  | 15        |
| 1.2.3 Photoschaltbare Kinaseinhibitoren .....                                  | 16        |
| 1.3 Estrogenrezeptor-Modulatoren.....  | 19        |
| 1.3.1 Estrogene.....   | 19        |
| 1.3.2 Estrogenrezeptor- <i>Signaling</i> und (Patho)physiologie .....          | 19        |
| 1.3.3 Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren.....                              | 22        |
| 1.3.4 Endokrine Disruptoren .....  | 22        |
| 1.3.5 Photoschaltbare Estrogenrezeptor-Modulatoren.....                        | 23        |
| <b>2 Zielsetzung der Arbeit .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3 Ergebnisse und Diskussion.....</b>  | <b>27</b> |
| 3.1 Photoschaltbare Diazocin-funktionalisierte CK1 $\delta$ -Inhibitoren ..... | 27        |
| 3.1.1 Photochemische Charakterisierung .....                                   | 29        |
| 3.1.2 Biologische Testung.....   | 31        |
| 3.1.2.1 CK1 $\delta$ Kinaseassay .....   | 31        |
| 3.1.2.2 ProQinase Screening.....   | 31        |
| 3.1.2.3 BMX und IGF-1R Kinaseassays.....                                       | 32        |
| 3.1.2.4 Virtuelles Screening .....   | 35        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.1.2.5  | Adenosin-Desaminase Assay .....   | 35         |
| 3.1.2.6  | Zellviabilitäts-/Proliferationsassays.....  | 36         |
| 3.2      | Photoschaltbare Azo- und Diazocin-funktionalisierte Derivate des VEGFR-2 Inhibitors<br>Axitinib ..... | 39         |
| 3.2.1    | Zusammenfassung der Publikation .....   | 39         |
| 3.2.2    | Publikation.....  | 42         |
| 3.2.3    | Zusätzliche Zelltestungsdaten .....   | 62         |
| 3.3      | Photoschaltbare Azoanaloga von Imatinib und Nilotinib .....   | 65         |
| 3.3.1    | <i>Molecular Modelling</i> .....  | 65         |
| 3.3.2    | Photochemische Charakterisierung .....  | 68         |
| 3.3.3    | Biologische Testung.....  | 70         |
| 3.3.3.1  | PDGFR- $\beta$ Kinaseassay .....  | 70         |
| 3.3.3.2  | ABL-1 Kinaseassay .....   | 71         |
| 3.4      | Photoschaltbare Diazocin-basierte Estrogenrezeptor-Agonisten .....                                    | 73         |
| 3.4.1    | Photochemische Charakterisierung .....  | 75         |
| 3.4.2    | Biologische Testung.....  | 78         |
| 3.4.2.1  | Hydroxydiazocene im Reportergen Assay .....   | 79         |
| 3.4.2.2  | Benzylalkoholdiazocene im Reportergen Assay .....   | 81         |
| 3.4.2.3  | Aktive Rückschaltung der Diazocene im Reportergen Assay .....   | 82         |
| <b>4</b> | <b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>   | <b>85</b>  |
| 4.1      | Photoschaltbare Diazocin-funktionalisierter CK1 $\delta$ -Inhibitoren.....                            | 85         |
| 4.2      | Photoschaltbare Azo- und Diazocin-funktionalisierte Derivate des VEGFR-2 Inhibitors<br>Axitinib ..... | 86         |
| 4.3      | Photoschaltbare Azoanaloga von Imatinib und Nilotinib .....   | 88         |
| 4.4      | Photoschaltbare Diazocin-basierte Estrogenrezeptor-Agonisten .....                                    | 90         |
| <b>5</b> | <b>Methoden und Materialien .....</b>   | <b>95</b>  |
| 5.1      | Aktivitätsbasierte Kinaseassays (BMX, IGF-1R, VEGFR-2 und PDGFR- $\beta$ ) .....                      | 95         |
| 5.2      | Adenosin-Desaminase (ADA) Assay .....   | 97         |
| 5.3      | HUVEC Proliferations-/Viabilitätsassays (Resazurin) .....   | 98         |
| 5.4      | Luciferase Reportergen Assay in MCF-7 Zellen.....   | 100        |
| 5.5      | Vervielfältigung und Aufreinigung des ERE-Plasmids .....  | 101        |
| 5.6      | Eigenschaften und Charakterisierung der Zellinkubatorlampen .....                                     | 101        |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>103</b> |
| <b>7</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>117</b> |
| <b>8</b> | <b>Molekülverzeichnis .....</b>   | <b>121</b> |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>9</b>  | <b>Anhang .....</b>   | <b>125</b> |
| 9.1       | ProQinase <i>Screening</i> .....                                | 125        |
| 9.2       | Virtuelles <i>Screening</i> .....                               | 128        |
| 9.3       | ABL-Kinaseassays (DiscoverX).....                               | 130        |
| 9.4       | Reportergen Assays .....  | 130        |
| 9.5       | UV-Spektren zur Charakterisierung der Zellinkubatorlampen ..... | 134        |
| <b>10</b> | <b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>                          | <b>137</b> |
| <b>11</b> | <b>Danksagung .....</b>   | <b>139</b> |



# 1 Einleitung

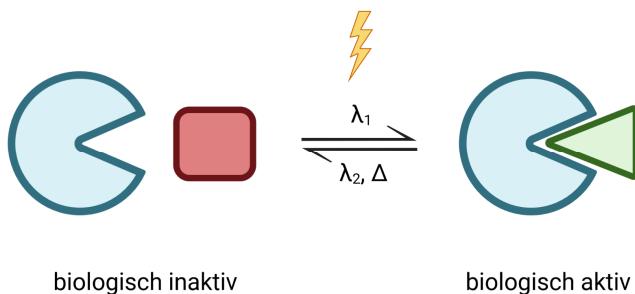
## 1.1 Photopharmakologie

Die Photopharmakologie ist ein aktuell stark wachsendes Gebiet, das sich zum Ziel gesetzt hat, Wirkstoffe durch Bestrahlung mit Licht in ihrer biologischen Aktivität zu kontrollieren. Eine präzise gesteuerte Wirkstoffaktivierung/-inaktivierung mit hoher räumlicher sowie zeitlicher Auflösung kann zur Reduktion von Nebenwirkungen und Resistenzbildungen beitragen oder auch die Grundlage zur Entwicklung von *tool*-Verbindungen für zeitaufgelöste Studien von Proteinfunktionen bzw. von Signalwegen darstellen. Des Weiteren kann die Photopharmakologie zur Entwicklung ökotoxikologisch verträglicher Arzneimittel beitragen, indem der Wirkstoff nur für die Therapie aktiviert, aber inaktiv in die Umwelt entlassen wird.<sup>[1, 2]</sup>

Licht ist aufgrund seiner Orthogonalität gegenüber den meisten biochemischen Systemen sehr gut als externer Trigger geeignet. Als nicht-invasiver Regulator kann Licht mit einer sehr hohen räumlichen und zeitlichen Präzision eingesetzt und in Bezug auf Wellenlänge und Intensität variiert werden.<sup>[1]</sup>

In der Photopharmakologie werden drei Prinzipien unterschieden: die photodynamische Therapie (PDT), die irreversible Photoabspaltung (*photodecaging*) und die reversible Photoschaltung. In der photodynamischen Therapie werden Photosensibilisatoren genutzt, die bei Bestrahlung mit Licht reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) generieren.<sup>[3]</sup> Insbesondere Singulett-Sauerstoff wirkt stark zytotoxisch und kann somit genutzt werden um malignes Gewebe zu zerstören. Die photodynamische Therapie wird bereits erfolgreich in der Klinik eingesetzt.<sup>[4]</sup> Das Prinzip der Photoabspaltung beruht darauf, dass ein Wirkstoff zunächst mit einer photolabilen Schutzgruppe (*photocleavable protecting group*) inaktiviert wird. Dieser Prozess wird auch als *caging* bezeichnet. Am Zielort kann dieser *photocage* dann durch Bestrahlung abgespalten werden. Entsprechend handelt es sich hierbei um eine irreversible, einmalige Aktivierung eines *prodrugs*.<sup>[5]</sup>

Demgegenüber steht die reversible Photoschaltung, in der im Idealfall beliebig oft „an“ und „aus“ geschaltet werden kann. Zu diesem Zweck sind zwei Konfigurationen des photoschaltbaren Liganden erforderlich – eine sollte biologisch aktiv, die andere inaktiv sein. Der inaktive Ligand ist so designet, dass er nicht am *target* binden kann und dort entsprechend keine biologische Wirkung aufweist. Für die Therapie soll der Ligand dann durch Bestrahlung mit einer spezifischen Wellenlänge in seine aktive Konfiguration geschaltet werden, die möglichst hoch-affin am *target* bindet und ihre pharmakologische Wirkung ausübt. Durch Bestrahlung mit einer anderen Wellenlänge, oder thermisch, kann die Verbindung wieder zurück in ihre inaktive Konfiguration geschaltet werden (Abbildung 1.1).<sup>[6]</sup>



**Abbildung 1.1.** Schematische Darstellung des Prinzips der reversiblen Photoschaltung. Im Idealfall ist eine Konfiguration des photoschaltbaren Liganden biologisch komplett inaktiv und kann nicht am *target* binden (rot). Die andere Konfiguration ist in der Lage am *target* zu binden und somit biologisch aktiv (grün). Beide Konfigurationen können durch Bestrahlung mit bestimmten Wellenlängen oder thermisch in einander überführt werden.<sup>[6]</sup> Erstellt mit BioRender.com.

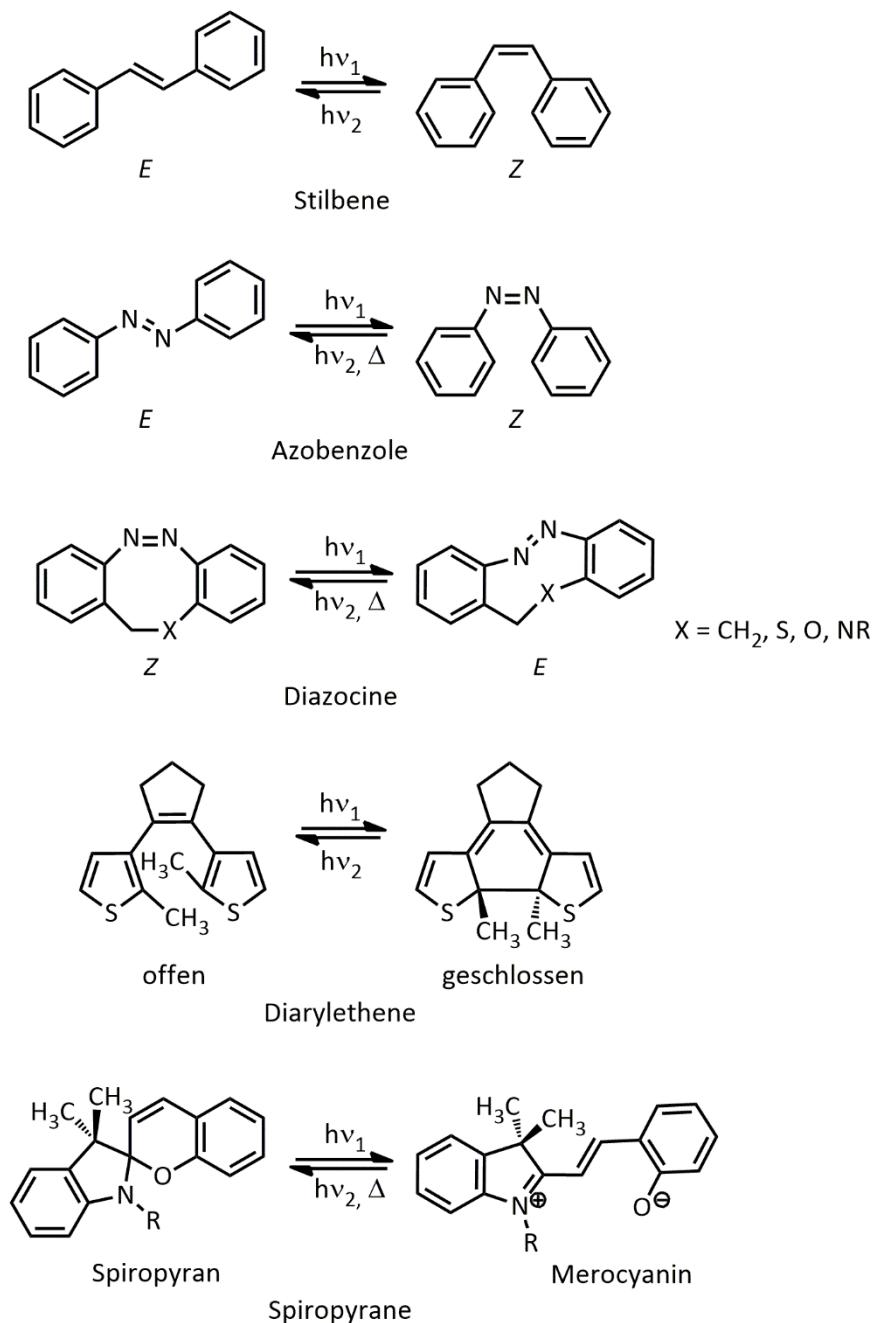
### 1.1.1 Reversible Photoschalter

Eine reversible Kontrolle von Proteinfunktionen, wie sie im Falle der Photoschaltung angestrebt wird, bringt vor allem den Vorteil mit sich, dass *downstream* Effekte so minimal wie möglich gehalten werden können. Im Beispiel der Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten, aber auch bei Medikamentenabhängigkeiten hat sich gezeigt, dass eine Langzeit-Dosierung andere Auswirkungen haben kann als eine einmalige Dosis. Zudem können Proteinfunktionen in verschiedenen Geweben/Organen unterschiedlich sein, sodass eine reversible, zeitlich und räumlich begrenzte Wirkung zum Verständnis von Proteinfunktionen beitragen und unerwünschte Nebenwirkungen minimieren kann.<sup>[7]</sup>

Das Prinzip der Photopharmakologie lässt sich nicht nur auf Liganden anwenden, sondern auch auf die Protein-*targets*. So werden zum Beispiel im Bereich der Optogenetik gentechnisch photosensitive Proteine (meist Rhodopsin-Derivate) erzeugt, deren Aktivität entsprechend Licht-abhängig reguliert werden kann.<sup>[8]</sup> Einen großen Erfolg auf diesem Gebiet verzeichnet eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der eine partielle Wiederherstellung der Sehkraft eines erblindeten Patienten mittels optogenetischer Gentherapie gelang.<sup>[9]</sup>

Im Folgenden soll nun auf photoschaltbare, niedermolekulare Liganden eingegangen werden:

Der Mechanismus der Photoschaltung kann auf *E/Z*-Isomerisierungen oder elektrocyclischen Ringschlussreaktionen beruhen. Stilbene, Azobenzole, sowie ihre heteroaromatischen Analoga, Diazocine (verbrückte Azobenzole), Indigos, Hemi(thio)indigos, Hydrazone und Iminothioindoxyle gehen *E/Z*-Isomerisierungen ein. Hingegen durchlaufen Diarylethene elektrocyclische Ringschluss-/öffnungsreaktionen. Spiropyran, Donor-Akzeptor Stenhouse Addukte und Fulgide zeigen einen gemischten Mechanismus aus *E/Z*-Isomerisierung und Cyclisierung.<sup>[5]</sup> Einige Beispiele sind in Abbildung 1.2 gezeigt.



**Abbildung 1.2.** Beispiele reversibler Photoschalter. Während Stilbene, Azobenzole und Diazocine E/Z-Isomerisierungen eingehen, durchlaufen Diarylethene Photocyclisierungsreaktionen. Spiropyrane weisen einen gemischten Mechanismus aus E/Z-Isomerisierung und Cyclisierung auf.<sup>[5, 10]</sup>

Voraussetzung für eine selektive Photoschaltung sind verschobene Absorptionsspektren der beiden Isomere. Das Gleichgewicht, dass sich nach Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge zwischen beiden Isomeren einstellt, wird als photostationäres Gleichgewicht (*photostationary state*, PSS) bezeichnet und gibt den prozentualen Anteil beider Isomere an. Dieses wird in der photochemischen Charakterisierung einer entsprechenden Verbindung zusammen mit der optimalen Anregungswellenlänge und der Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) des metastabilen Isomers ermittelt. Ebenfalls muss die Reversibilität der Photoschaltung über mehrere Bestrahlungscyclen geprüft werden, um eine mögliche Photoermüdung auszuschließen. Ein weiterer Parameter, der die Effizienz der Photoisomerisierung

beschreibt, ist die Quantenausbeute. Diese gibt an wie viele Moleküle pro absorbiertem Photon isomerisieren.<sup>[7, 11]</sup>

Für die photopharmakologische Wirkung wird eine möglichst große Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven mit und ohne Bestrahlung angestrebt, sodass ein möglichst großer Faktor zwischen den IC<sub>50</sub>- bzw. EC<sub>50</sub>-Werten resultiert. Dieser Faktor wird auch als phototherapeutischer Index bezeichnet.<sup>[12]</sup> Entsprechend sollte eine Konzentration des photoschaltbaren Wirkstoffs wählbar sein, die im Idealfall unbestrahlt komplett inaktiv und bestrahlt maximal aktiv ist.<sup>[7]</sup>

### 1.1.1.1 Stilbene

Stilbene (Abbildung 1.2, oben) weisen ein thermodynamisch stabiles *E*-Isomer sowie ein photochemisch generierbares *Z*-Isomer auf. Während das *E*-Isomer quasi-planar ist, zeigt das metastabile *Z*-Isomer, welches durch Bestrahlung mit 313 nm angereichert werden kann, eine verdrehte, helicale Konformation. Im Gegensatz zu den im Anschluss beschriebenen Azobenzolen ist das metastabile *Z*-Stilben in den meisten Fällen unter gewöhnlichen Umgebungsbedingungen stabil und kann säulenchromatographisch isoliert werden. Neben einer *E/Z*-Isomerisierung kann das *Z*-Isomer allerdings bei Bestrahlung auch eine elektrocyclische Ringschlussreaktion zum Dihydrophenanthren durchlaufen, welches dann irreversibel zum Phenanthren oxidiert wird.<sup>[11]</sup> Eine weitere Problematik, die bei der Photoschaltung von Stilbenen auftreten kann, ist eine Dimerisierung in Folge einer photoinduzierten [2+2]-Cycloaddition<sup>[13]</sup> (siehe dazu auch Photochemie von Axitinib in Kapitel 1.2.3).

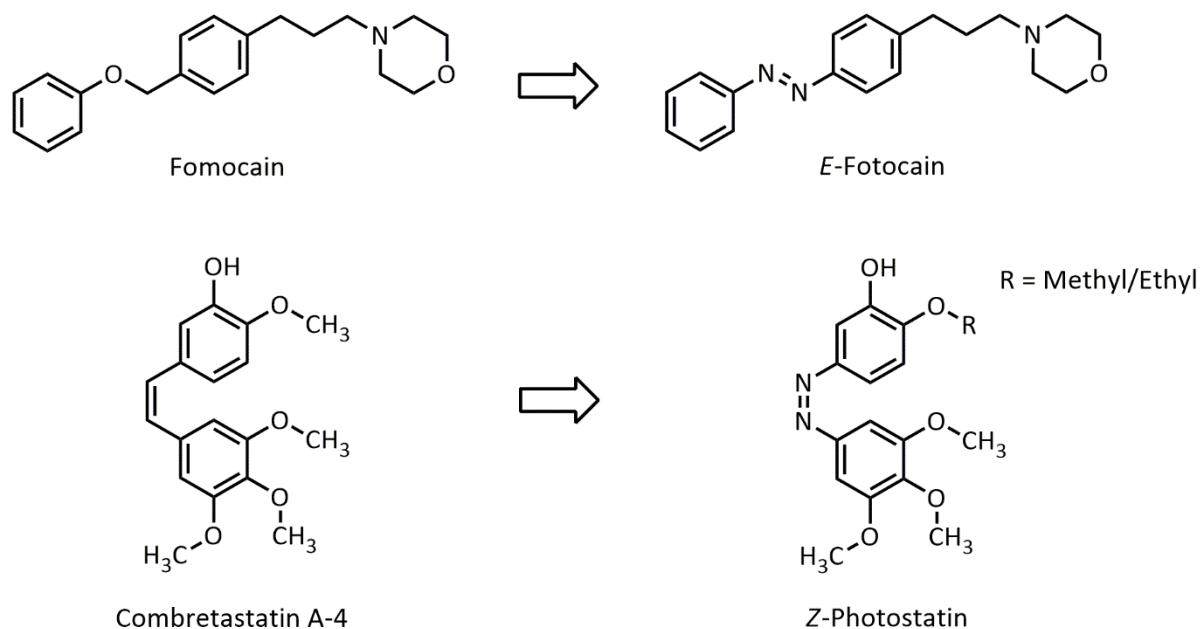
### 1.1.1.2 Azobenzole

Die am häufigsten eingesetzten photoschaltbaren Elemente sind Azobenzole. Bei der Entwicklung photoschaltbarer Wirkstoffe wird oftmals von einer bekannten Wirkstoffstruktur ausgegangen und eine geeignete funktionelle Gruppe durch eine Azobrücke ersetzt. Diese Vorgehensweise wurde von der Arbeitsgruppe Trauner als „Azologisierung“ benannt.<sup>[14, 15]</sup>

Die Photoisomerisierung von Azobenzolen zeichnet sich durch hohe Quantenausbeuten und minimale Photoermüdung aus. *E*-Azobenzol zeigt eine intensive ππ\*-Bande bei 320 nm sowie eine schwache nπ\*-Bande bei 440 nm, während das *Z*-Isomer ebenfalls bei 440 nm eine stärkere nπ\*-Bande aufweist. Das *E*-Isomer ist das thermodynamisch stabile Isomer und kann durch Bestrahlung mit 340 nm zu ca. 80 % zum *Z*-Isomer geschaltet werden. Die Rückschaltung zum *E*-Isomer kann thermisch oder durch Bestrahlung mit 450 nm erfolgen. Dabei können durch Bestrahlung 95 % *E*-Isomer und thermisch 100 % *E*-Isomer angereichert werden.<sup>[14]</sup>

Konzeptionell problematisch für biologische Anwendungen ist jedoch, dass das thermodynamisch stabile *E*-Isomer in den meisten Fällen das biologisch aktive Isomer darstellt.<sup>[15]</sup> Ein Beispiel ist Fotocain, ein Azoanalogon des Anästhetikums Fomocain (Abbildung 1.3, oben). *E*-Fotocain unterbindet als Ionenkanalblocker die Auslösung von Aktionspotentialen in Neuronen. Durch Bestrahlung mit 350 nm und folglicher Photoisomerisierung zum *Z*-Isomer, wird diese Wirkung aufgehoben.<sup>[16]</sup>

Allerdings sind ebenfalls einige Z-aktive Azobenzole bekannt, wie zum Beispiel die Photostatine (Azocombretastatin A-4-Derivate) in Abbildung 1.3, unten. Diese photoschaltbaren Inhibitoren der Mikrotubuli-Dynamik sind mehr als 200-fach toxischer in der Z-Konfiguration als in der thermodynamisch stabilen E-Konfiguration.<sup>[17–20]</sup>



**Abbildung 1.3.** Beispiele für durch Azologisierung entstandene photoschaltbare Wirkstoffe. Oben: Azologisierung von Fomocain zum E-aktiven Kanalblocker Fotocain.<sup>[16]</sup> Unten: Azologisierung von Combretastatin zum Z-aktiven Mikrotubuli-Dynamik-Inhibitor Photostatin.<sup>[17–20]</sup>

### 1.1.1.3 Diazocene

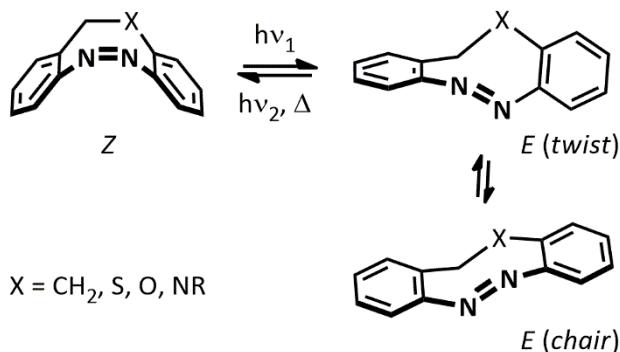
Diazocene (verbrückte Azobenzole) liegen im Gegensatz zu den Azobenzolen thermodynamisch stabil in der Z-Konfiguration vor. Aufgrund der gewinkelten und sterisch anspruchsvollen Struktur (siehe Abbildung 1.4) wird das Z-Isomer als biologisch inaktiv angenommen. Durch Bestrahlung mit ca. 400 nm kann das Diazocin zum E-Isomer geschaltet werden, welches in der *twist*- oder *chair*-Konformation vorliegen kann. Im E-Isomer stehen die beiden Benzolringe deutlich planarer zueinander als im Z-Isomer, weshalb das E-Isomer eher an biologische *targets* binden kann. Diazocene schalten nach einer bestimmten Halbwertszeit thermisch zurück, d.h. sie schalten sich selbst nach einiger Zeit automatisch „aus“. Alternativ kann die Rückisomerisierung zum inaktiven Z-Isomer durch Bestrahlung mit ca. 500 - 660 nm erfolgen.<sup>[21, 22]</sup>

Wie in Abbildung 1.4 angedeutet, sind verschieden verbrückte ( $-X-CH_2-$ ) Diazocene beschrieben.<sup>[21–23]</sup> In dieser Arbeit wurden Ethylen- und  $-S-CH_2-$ -verbrückte Diazocene behandelt, die im Folgenden auch als Kohlenstoff- und Schwefel-Diazocene bezeichnet werden.

Diazocene weisen gegenüber den Azobenzolen eine verbesserte Schalteffizienz auf. So kann das Z-Isomer des Kohlenstoff-Diazocins in *n*-Hexan durch Bestrahlung mit 370 - 400 nm zu > 90 % zum E-Isomer geschaltet werden. Dabei wird in die  $n\pi^*$ -Bande des Z-Isomers eingestrahlt, die ein Absorptionsmaximum bei 404 nm zeigt. Die Halbwertszeit wurde mit  $t_{1/2} = 4.5$  h (bei 28.5 °C) bestimmt. Die  $n\pi^*$ -Bande des E-Isomers ist gut separiert von der des Z-Isomers und zeigt ein Maximum bei

490 nm. Durch Bestrahlung mit 480 - 550 nm kann die Rückschaltung zum Z-Isomer mit einer Effizienz von nahezu 100 % erreicht werden. Somit kann die Photoisomerisierung in beide Richtungen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht erreicht werden. Die Quantenausbeuten sind dabei deutlich höher als beim Azobenzol. Zudem weist das Diazocin ebenfalls eine hervorragende Photostabilität auf.<sup>[21]</sup>

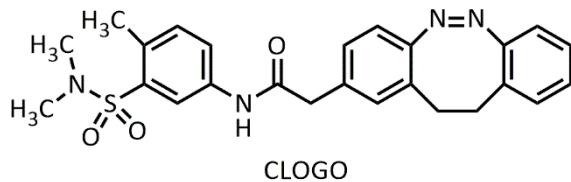
Das Schwefel-Diazocin zeigt weitestgehend vergleichbare Eigenschaften zum Kohlenstoff-Diazocin, wobei die  $\pi\pi^*$ -Bande des E-Isomer weiter rotverschoben ist (ca. 500 - 660 nm, mit einem Maximum bei 525 nm). Während durch Bestrahlung mit 405 nm in Aceton im PSS 70 % E-Isomer angereichert werden können, kann durch Bestrahlung mit 500 - 660 nm quantitativ zurückgeschaltet werden. Die Halbwertszeit des E-Isomers ist mit  $t_{1/2} = 3.5$  d (bei 27 °C) gegenüber dem Kohlenstoff-Diazocin deutlich verlängert.<sup>[22]</sup>



**Abbildung 1.4.** Photoisomerisierung der Diazocene. Das thermodynamisch stabile Z-Isomer wird aufgrund seiner gewinkelten Struktur als biologisch inaktiv angenommen. Durch Bestrahlung mit ca. 400 nm erfolgt die Photoisomerisierung zum deutlich gestreckteren E-Isomer (*twist* bzw. *chair*), welches als biologisch aktiv angenommen wird. Die Rückschaltung zum Z-Isomer kann entweder durch Bestrahlung mit ca. 500 - 660 nm oder thermisch erfolgen.<sup>[21-23]</sup>

In ersten Studien zeigen sich Diazocene zunehmend als gut geeignete Photoschalter für biologische Anwendungen, mit teilweise deutlichen Unterschieden in der pharmakologischen Wirkung vor und nach Bestrahlung. Sie wurden u.a. zur Schaltung von Peptidkonformationen<sup>[24-26]</sup>, neuronalen Aktivitäten (Kaliumkanälen bzw. Glutamatrezeptoren)<sup>[27-29]</sup> und DNA-Hybridisierung<sup>[30]</sup> eingesetzt.

Ein Beispiel ist der in Abbildung 1.5 dargestellte photoschaltbare Öffner von G-Protein-gekoppelten einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen (*G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels, GIRK channels*). Die Bezeichnung CLOGO steht für *Cyclic azobenzene Light Operated GIRK channel Opener*. CLOGO zeigte sich im Dunkeln oder nach Bestrahlung mit 500 nm (Z-Isomer) weitestgehend inaktiv. Durch Bestrahlung mit 400 nm kann CLOGO aktiviert werden, wirkt als Agonist an GIRK-Kanälen und kann folglich neuronale Aktivitäten hemmen.<sup>[27]</sup>

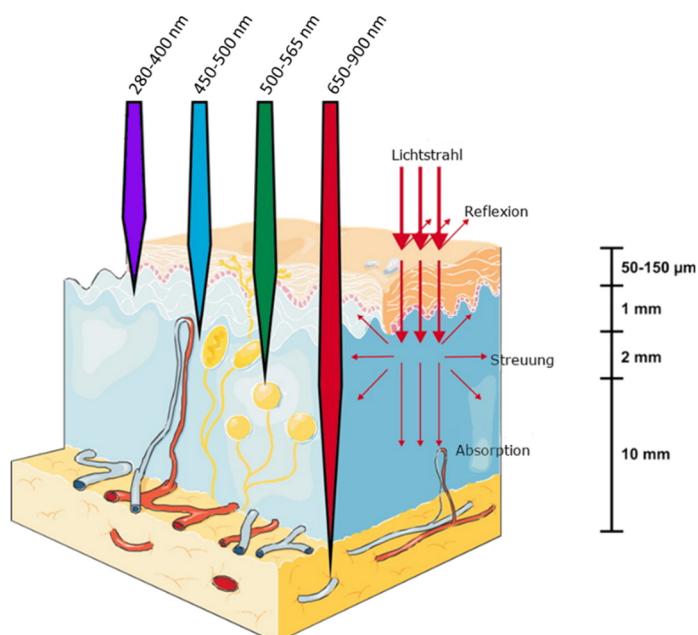


**Abbildung 1.5.** Beispiel eines Diazocin-basierten photoschaltbaren Kaliumkanalöffners. Das thermodynamisch stabile Z-Isomer ist nahezu inaktiv, während nach Bestrahlung mit 400 nm eine agonistische Wirkung am Kaliumkanal erzielt werden kann.<sup>[27]</sup>

### 1.1.2 Bio-optisches Fenster

Eine Herausforderung in der Photopharmakologie stellt die Eindringtiefe von Licht in biologisches Gewebe dar. Energierreiches, kurzwelliges Licht weist nur eine schlechte Gewebepenetration auf. Wie in Abbildung 1.6 ersichtlich, zeigen ultraviolette (UV), blaues und grünes Licht nur eine Eindringtiefe von wenigen Mikro- bzw. Millimetern.<sup>[4]</sup> UV-Strahlung kann zudem DNA-Schäden, in erster Linie Pyrimidindimere (Cyclobutan-Pyrimidindimere oder 6–4 Photoprodukte) verursachen, die sowohl mutagen als auch zytotoxisch sind.<sup>[31]</sup>

Gelbes/rotes Licht mit Wellenlängen um die 600 nm führt zu einer hohen Autofluoreszenz, da der Großteil natürlich vorkommender endogener Fluorophore (v.a. Hämoglobin und Oxy-Hämoglobin) ebenfalls in diesem Bereich absorbiert. Optimal wäre die Verwendung von Licht im Bereich von 650 - 900 nm (tiefrot bzw. Nahinfrarot (NIR)), da dies eine tiefe Gewebepenetration sowie eine geringe Autofluoreszenz zeigt.<sup>[32]</sup> Im noch höheren Infrarot-Bereich wird die Lichtdurchlässigkeit durch die Absorption von Wasser beschränkt.<sup>[33]</sup>



**Abbildung 1.6.** Eindringtiefe des Lichts in biologisches Gewebe. Mit Genehmigung verändert nach<sup>[4]</sup>.

Der Bereich von 650 - 900 nm wird auch als bio-optisches Fenster bezeichnet. Entsprechend sind photosensitive Moleküle, die in diesem Wellenlängenbereich des bio-optischen Fensters eine Photoisomerisierung durchlaufen, erstrebenswert.<sup>[34, 35]</sup> Wie aus der vorangegangenen Beschreibung verschiedener Photoschalter hervorgeht, sind für die Photoisomerisierung von Wirkstoffen in den meisten Fällen jedoch deutlich kürzere Wellenlängen erforderlich. Daher werden verschiedene Ansätze verfolgt, diese Problematik anzugehen.

Zum einen sind verschiedene Strategien bekannt, den Absorptionsbereich der Photoschalter zu höheren Wellenlängen zu verschieben. So wurden z.B. rot- oder sogar nahinfrarot-verschobene, tetra-*ortho*-methoxysubstituierte Azobenzole publiziert.<sup>[35, 36]</sup> Ebenfalls ist ein –NMe–CH<sub>2</sub>– verbrücktes Diazocin bekannt, dessen Rückschaltung zum Z-Isomer im NIR-Bereich erfolgt.<sup>[23]</sup>

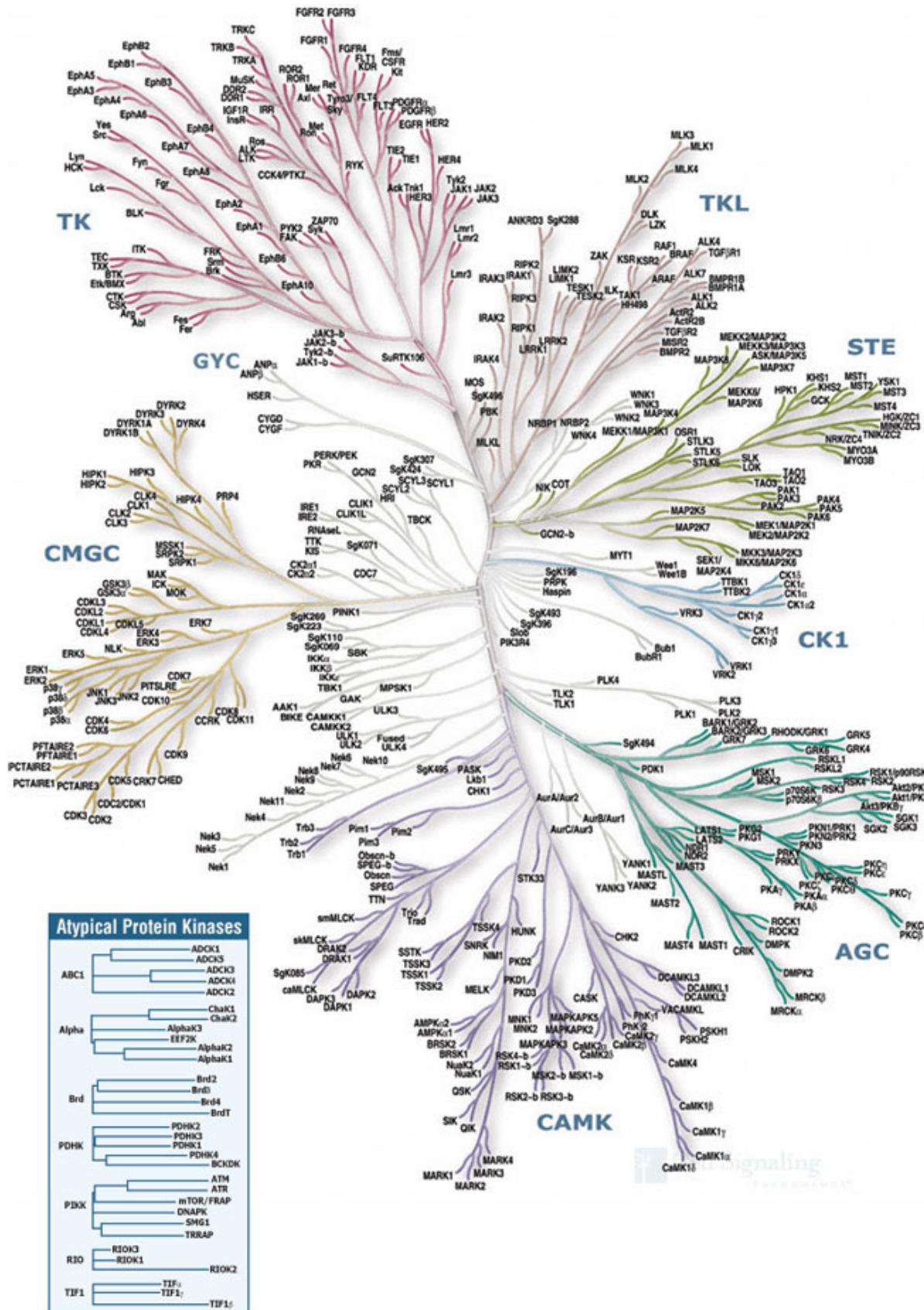
Zum anderen werden verschiedene Methoden verfolgt, um eine Photoisomerisierung im kürzeren Wellenlängenbereich auch *in vivo* zu ermöglichen. Ein Beispiel ist der Einsatz von Lichtwellenleitern (*optical fibers*), mit denen Licht der benötigten Wellenlänge in tiefer liegende Gewebe gebracht werden kann. Allerdings geht dabei der nicht-invasive Charakter der photopharmakologischen Anwendung verloren.<sup>[37]</sup> Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung verschiedener Energietransfersysteme dar, bei denen ein Photosensibilisator Licht im Bereich des bio-optischen Fensters absorbiert und die gesammelte höhere Anregungsenergie auf den Photoschalter überträgt, was dessen Isomerisierung bewirkt.<sup>[34]</sup> Darüber hinaus ist die Nutzung von Tscherenkov-Strahlung, die als zweite Form der Strahlung von klinisch verwendeten Radionukleotiden erzeugt werden kann, zur Photoaktivierung denkbar.<sup>[38]</sup>

## 1.2 Kinaseinhibitoren

### 1.2.1 Proteinkinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, die die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf Substratproteine katalysieren.<sup>[39]</sup> Phosphoryliert werden dabei die Hydroxygruppen spezifischer Aminosäuren (Serin, Threonin und Tyrosin). Diese posttranskriptionale Modifikation spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivitätskontrolle von Signaltransduktionskaskaden. Ungefähr 30 % aller humanen Proteine können von Kinasen phosphoryliert werden. Somit übernehmen Proteinkinasen extrem wichtige Funktionen in sämtlichen Regulations- und Entwicklungsmechanismen der Zelle, wie zum Beispiel Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Dabei stellen Kinasen die Gegenspieler der Phosphatasen dar, welche die Phosphatgruppen wieder abspalten können. Hyperaktivitäten, Fehlfunktionen oder Überexpressionen von Proteinkinasen stehen im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten, insbesondere Tumorerkrankungen und Leukämien. Daher stellen Proteinkinasen wichtige Wirkstoff-*targets* dar.<sup>[40]</sup>

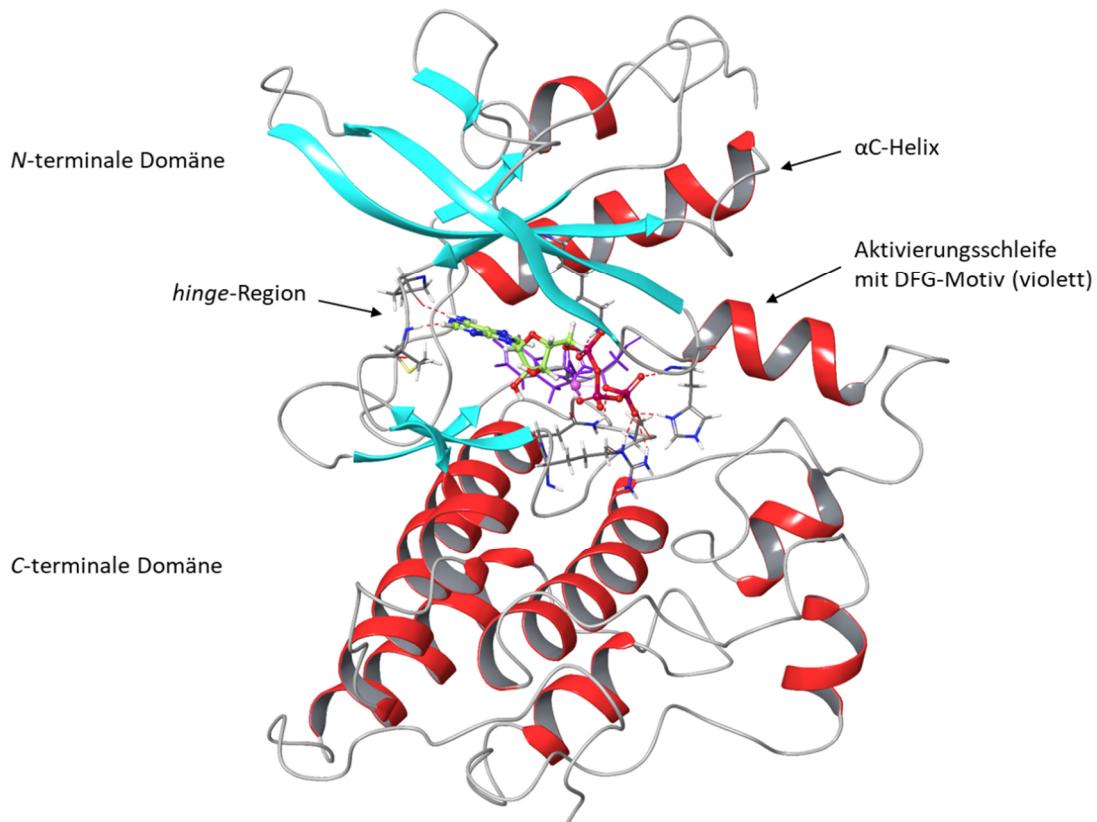
Die 518 humanen Wildtyp-Proteinkinasen wurden mit Hilfe eines Sequenzvergleichs in sieben Gruppen eingeteilt (phylogenetischer Kinase-Stammbaum siehe Abbildung 1.7).<sup>[41]</sup> Je nach phosphorylierter Aminosäure werden in erster Linie Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosinkinasen unterschieden. Tyrosinkinasen können zudem in Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen eingeteilt werden.<sup>[39]</sup>



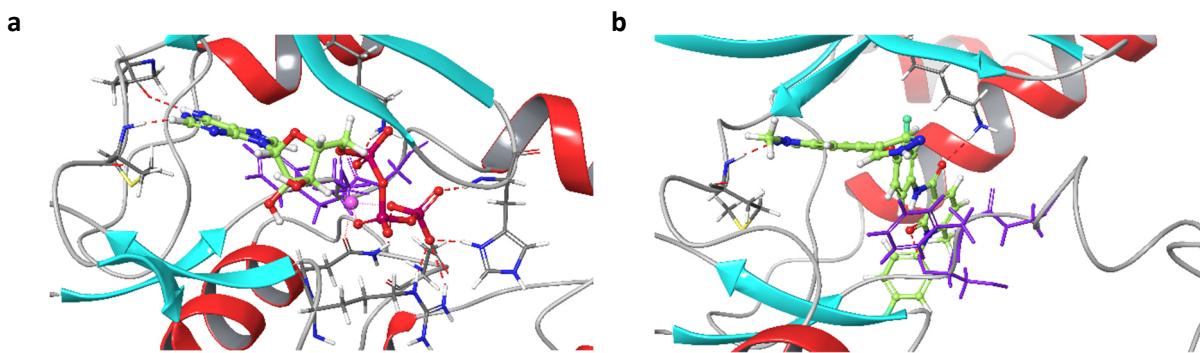
**Abbildung 1.7.** Phylogenetischer Stammbaum des humanen Kinoms. Die Proteinkinasen wurden in sieben Hauptgruppen eingeteilt. TK: Tyrosinkinasen, TKL: Tyrosinkinase-ähnliche Kinasen, STE: Homologe der Hefekinasen *Sterile 7*, *Sterile 11* und *Sterile 20*, CK1: Caseinkinase 1, AGC: PKA,PKG und PKC Familien, CAMK: Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, CMGC: CDK, MAPK, GSK3 und CLK Familien. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology, Inc. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)) reproduziert.

### 1.2.1.1 Struktureller Aufbau der Kinase

Alle Proteinkinasen besitzen einen homologen Aufbau bestehend aus einer *N*-terminalen sowie einer *C*-terminalen Subdomäne (in Abbildung 1.8 exemplarisch für die Rezeptor-Tyrosinkinase MET gezeigt). Während die *N*-terminale Domäne aus fünf  $\beta$ -Faltblattsträngen und der regulatorisch wichtigen  $\alpha$ C-Helix besteht, weist die *C*-terminale Domäne vor allem  $\alpha$ -Helices auf. Beide Domänen sind über die *hinge* (Scharnier)-Region verbunden, zu der das ATP-Adenosin Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet.<sup>[42]</sup> In Nachbarschaft zur ATP-Bindetasche befindet sich in der Spalte zwischen beiden Domänen ebenfalls die Substratbindetasche. Der Zugang zum aktiven Zentrum wird maßgeblich von der Aktivierungsschleife kontrolliert, die unterschiedliche Konformationen einnehmen kann. Sie beginnt mit dem hochkonservierten DFG-Motiv (Aspartat, Phenylalanin und Glycin). Dieses Motiv besetzt im aktiven Zustand der Kinase die der ATP-Bindetasche benachbarte hydrophobe *back pocket* ( $DFG_{in}$ ).<sup>[43]</sup> Abbildung 1.9 a zeigt die vergrößerte Ansicht der ATP-Bindetasche der MET-Kinase in  $DFG_{in}$ -Konformation (violett) mit gebundenem ATP sowie koordiniertem Magnesiumion (pink). Der Aspartatrest des DFG-Motivs koordiniert das Magnesiumion, welches die  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATPs für die Übertragung auf das Substrat orientiert.<sup>[42]</sup> Im inaktiven Zustand der Kinase kann das DFG-Motiv aus der hydrophoben *back pocket* herausklappen ( $DFG_{out}$ , Abbildung 1.9 b mit gebundenem  $DFG_{out}$ -Inhibitor), was zur Folge hat, dass die Aktivierungsschleife teilweise den Zugang zur ATP- und Substratbindetasche blockiert.<sup>[43]</sup>



**Abbildung 1.8.** Röntgenkristallstruktur der Rezeptor-Tyrosinkinase MET mit gebundenem ATP sowie komplexiertem Magnesiumion (PDB: 3DKC<sup>[44]</sup>). Visualisiert mit Maestro 12.8, Schrödinger.



**Abbildung 1.9.** Vergrößerte Ansicht der ATP-Bindetasche der MET-Kinase in DFG<sub>in</sub> bzw. DFG<sub>out</sub> Konformation mit entsprechendem Liganden. (a) DFG<sub>in</sub> Konformation mit gebundenem ATP (PDB: 3DKC<sup>[44]</sup>). (b) DFG<sub>out</sub> Konformation mit gebundenem DFG<sub>out</sub>-Inhibitor (PDB: 4EEV<sup>[45]</sup>). DFG-Motiv in violett, rot gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen. Visualisiert mit Maestro 12.8, Schrödinger.

### 1.2.1.2 Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR

Die *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFR) 1-3 gehören zu den transmembranen Rezeptor-Tyrosinkinasen. Sie bestehen aus einem extrazellulären Teil mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen, die auch die Bindestelle für den Wachstumsfaktor VEGF enthalten, einer kurzen Transmembrandomäne und einem intrazellulären Teil, der die Tyrosinkinase-Domäne enthält. Die Bindung von VEGF löst eine Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors aus. Daraufhin werden spezifische Signaltransduktionsproteine rekrutiert, phosphoryliert und verschiedene *downstream* Signalkaskaden aktiviert, darunter p38MAPK, Raf/MEK/ERK, und PI3K/PKB. Letztlich werden Zellprozesse wie Proliferation, Migration und Permeabilität gefördert.<sup>[46, 47]</sup>

Während VEGFR-1 insbesondere für die Entwicklung hämatopoetischer Zellen und VEGFR-3 vorwiegend für die Entwicklung lymphatischer Endothelzellen entscheidend ist, ist VEGFR-2 hauptsächlich für die Entwicklung vaskulärer Endothelzellen verantwortlich.<sup>[47]</sup> VEGFR-2, auch als *kinase insert domain receptor* (KDR) bezeichnet, ist demnach maßgeblich an der Angiogenese (Bildung neuer Blutgefäße) beteiligt.<sup>[46]</sup> Angiogenese spielt nicht nur in der Embryogenese und Wundheilung eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Pathophysiologie bei der Anbindung von Tumoren ans Blutsystem.<sup>[48]</sup>

Zum Wachstum und für die entsprechende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen benötigen Tumoren einen Anschluss ans Blutsystem. Dieser bietet ihnen zudem die Möglichkeit zur Metastasierung.<sup>[46]</sup> Ein Sauerstoffmangel in den Zellen verursacht eine erhöhte Konzentration an Hypoxie-induziertem Faktor-1α (HIF-1α). Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert die Expression verschiedener pro-angiogener Faktoren, u.a. VEGF.<sup>[49]</sup>

Beim von-Hippel-Lindau (VHL) Syndrom kommt es aufgrund einer bestimmten Mutation, die den Abbau von HIF-1α verhindert, zu einer dauerhaften Überexpression von VEGF. In Folge dessen treten vermehrt vaskuläre Tumoren, wie retinale Angiome, Hämangioblastome des ZNS und Klarzell-Nierenzellkarzinome (*clear-cell renal cell carcinoma* (RCC)) auf.<sup>[49]</sup>

VEGF und VEGFR-2 stellen demnach geeignete *targets* in der Krebstherapie dar.<sup>[50]</sup> So sind u.a. bereits Antikörper gegen VEGF und VEGFR-2 sowie eine Vielzahl niedermolekularer Kinaseinhibitoren mit Haupt-target VEGFR-2 zugelassen.<sup>[51]</sup>

### 1.2.1.3 Rezeptor-Tyrosinkinase PDGFR

*Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α und β* gehören wie VEGFR zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen und weisen einen analogen Aufbau zu VEGFR auf. Ebenso kommt es nach Bindung des Wachstumsfaktors zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors, in Folge dessen zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. PDGFRs werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter mesenchymale und neuronale Zellen.<sup>[52]</sup> Sie spielen eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung sowie bei der Regulation der Gewebe-Homöostase bei Erwachsenen.<sup>[53]</sup>

Ein abnormales PDGF/PDGFR-*signaling* wird mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Tumorerkrankungen, neurologische Erkrankungen und Bindegewebserkrankungen. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte Krebszellen ihr selbständiges Wachstum durch eine autokrine Wachstumsstimulation über PDGF/PDGFR-*signaling* realisieren. Dies konnte insbesondere für Gliome beobachtet werden.<sup>[52]</sup> PDGF ist wie VEGF an der Angiogenese beteiligt, insbesondere an der Rekrutierung vaskulärer Perizyten. Daher stellen PDGF und PDGFR ebenfalls *targets* für die anti-angiogene Therapie dar.<sup>[53]</sup>

Des Weiteren vermittelt PDGFR neuroprotektive Funktionen und steht daher pathogenetisch in Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen. Auch verschiedene Bindegewebserkrankungen (z.B. Geschwüre und Lungenfibrose) sowie vaskuläre Abnormalitäten können Folge eines gestörten PDGF/PDGFR-*signalings* sein.<sup>[52]</sup>

Vergleichbar zu VEGFR gibt es verschiedene pharmakotherapeutische Ansätze zur Inhibition des PDGF/PDGFR-Signalwegs, z.B. Antikörper und DNA/RNA-Aptamere gegen PDGF oder Antikörper und Kinaseinhibitoren gegen PDGFR.<sup>[54]</sup>

### 1.2.1.4 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase ABL

Die ABL-Kinasefamilie gehört zu den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen.<sup>[55]</sup> Beide Abelsonkinasen (ABL1 und ABL2) sind an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse in der Entwicklung und normalen Homöostase beteiligt, insbesondere an der Reorganisation des Zytoskeletts, die für Zellmorphogenese, -motilität, -adhäsion und -polarität erforderlich ist. Dysfunktionen der ABL-Kinasen führen u.a. zum Auftreten von Krebs, Entzündungen und neurodegenerativen Erkrankungen. Des Weiteren spielt ABL eine wichtige Rolle bei der Infektion von Wirtszellen mit mikrobiellen Pathogenen.<sup>[56]</sup>

Der strukturelle Aufbau von ABL1/2 beinhaltet eine hochkonservierte SH3-SH2-SH1 Kassette aus der Tyrosinkinase *Src homology 1* (SH1) Domäne sowie den regulatorischen Domänen SH2 und SH3. C-terminal befindet sich zudem eine F-Aktin-Bindedomäne und entweder eine DNA-Bindedomäne sowie Kernlokalisations- und nukleäre Exportsignale (ABL1) oder Mikrotubulin- und Aktin-Bindedomänen (ABL2). Hieraus lässt sich auf die Lokalisation von ABL1 im Zellkern bzw. Zytoplasma und ABL2 in der Zellperipherie schließen.<sup>[55, 56]</sup>

Die Aktivität der ABL-Kinasen wird über inter- und intramolekulare Wechselwirkungen und/oder (Auto)phosphorylierung reguliert. Eine Autoinhibition der Kinase erfolgt durch Bildung einer Klammerartigen Struktur, in der SH3 an eine Prolin-reiche Sequenz zwischen SH2 und SH1 bindet und ein N-terminaler myristoylierter Rest in einer hydrophoben Tasche der Kinasedomäne bindet.<sup>[56, 57]</sup>

Chromosomale Translokation von ABL1 zur *breakpoint cluster region* (BCR) Sequenz (Philadelphia-Chromosom) führen zur Entstehung des Fusionsproteins BCR-ABL1, dessen Kinasefunktion eine konstitutive Aktivität aufweist. BCR-ABL1 wurde in verschiedenen Leukämien, wie chronische myeloische Leukämie (CML) und akute lymphatische Leukämie (ALL) nachgewiesen. Mit Zulassung des BCR-ABL1 Inhibitors Imatinib (Glivec®/Gleevec®, Novartis) gelang ein Durchbruch in der CML-Therapie.<sup>[56, 58]</sup>

Da zahlreiche bakterielle und virale Pathogene die ABL-Funktion unterwandern, die u.a. zur Internalisierung und intrazellulären Motilität erforderlich ist, wäre in Zukunft eventuell auch ein Einsatz von ABL-Inhibitoren zur Behandlung mikrobieller Infektionen denkbar.<sup>[56]</sup>

## 1.2.2 Niedermolekulare Kinaseinhibitoren

2001 gelang mit der Zulassung von Imatinib als erster niedermolekularer Kinaseinhibitor ein Durchbruch auf dem Gebiet der *targeted therapy* (zielgerichtete Krebstherapie). Erstmals konnte die spezifische Inhibition bestimmter Kinasen mit geringer systemischer Toxizität erreicht werden.<sup>[39]</sup> Derzeit (Stand: 21.01.2022) sind bereits 72 niedermolekulare Proteinkinaseinhibitoren durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen; 41 davon wurden in den letzten fünf Jahren zugelassen. Der Großteil der zugelassenen Inhibitoren bindet ATP-kompetitiv.<sup>[59, 60]</sup>

### 1.2.2.1 Klassifizierung von Kinaseinhibitoren

Kinaseinhibitoren können nach ihrer Bindestelle sowie der Art ihrer Interaktion mit dem Protein klassifiziert werden. Nachfolgend wird die Einteilung nach Roskoski<sup>[39]</sup> zusammengefasst:

Zu den ATP-kompetitiv und reversibel bindenden Inhibitoren gehören die Typen I, I<sup>1/2</sup> und II. Typ I Inhibitoren binden in der ATP-Bindetasche in der aktiven DFG<sub>in</sub>-Konformation der Kinase. Typ I<sup>1/2</sup> Inhibitoren binden an eine inaktive Konformation der Kinase, die dennoch in DFG<sub>in</sub> vorliegt. Typ II Inhibitoren binden die inaktiv DFG<sub>out</sub>-Konformation der Kinase. In dieser Konformation wird die *back pocket* für die Inhibitoren zugängig. Zu den Typ II Inhibitoren gehören u.a. die im Anschluss beschriebenen Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Axitinib.

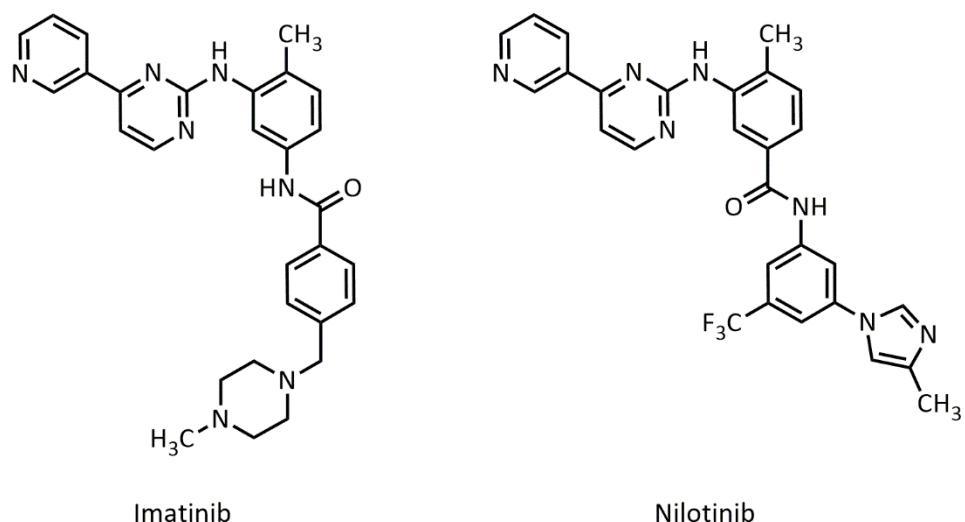
Nicht-ATP-kompetitive, allosterische Inhibitoren werden in die Typen III und IV eingeteilt. Während Typ III Inhibitoren in direkter Nachbarschaft zur ATP-Bindestelle binden und die *back pocket* besetzen können, binden Typ IV Inhibitoren weiter entfernt von der ATP-Bindetasche. Beide allosterischen Inhibitortypen binden reversibel.

Typ V Inhibitoren sind bivalente Inhibitoren, die an zwei verschiedenen Bindestellen binden und diese somit überbrücken. Diese Art von Inhibitoren ist variabel ATP-kompetitiv und bindet ebenfalls reversibel.

Eine weitere Klasse von Kinaseinhibitoren stellen die kovalenten Typ VI Inhibitoren dar. Diese binden meist an nukleophile Cysteine im aktiven Zentrum. Kovalente Inhibitoren sind nicht-ATP-kompetitiv und binden in der Regel irreversibel.

### 1.2.2.2 Imatinib und Nilotinib

Die beiden strukturell verwandten Kinaseinhibitoren Imatinib und Nilotinib (Abbildung 1.10) wurden von Novartis entwickelt. Sie inhibieren verschiedene Tyrosinkinasen, darunter BCR-ABL, ABL-1 und PDGFR- $\beta$  und sind für die Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zugelassen.<sup>[61]</sup> In 95 % der CML-Patienten kann das Fusionsgen BCR-ABL gefunden werden, welches durch eine Chromosomentranslokation (Philadelphia-Chromosom) entsteht.<sup>[62]</sup> Die Inhibition von BCR-ABL durch Imatinib (Glivec®/Gleevec®) führte zu einem herausragenden Erfolg in der CML-Therapie. Trotzdem treten auch häufig Resistenzen gegenüber Imatinib auf. Daher wurden BCR-ABL Inhibitoren der zweiten Generation mit höherer Potenz sowie verbesserter Selektivität entwickelt; unter anderem Nilotinib (Tasigna®).<sup>[63, 64]</sup>



**Abbildung 1.10.** Strukturformeln der BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib.

### 1.2.2.3 Axitinib

Der Indazol-basierte Kinaseinhibitor Axitinib (Abbildung 1.11) inhibiert vor allem VEGFR 1-3, aber auch andere Tyrosinkinasen wie PDGFR- $\beta$  und c-Kit. Axitinib ist seit 2012 als Mittel der zweiten Wahl für die Behandlung von Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) zugelassen und wird unter dem Handelsnamen Inlyta® von der Firma Pfizer vertrieben.<sup>[47, 65]</sup>

Bei ca. 90 % der *clear-cell* RCC Fälle liegt das VHL Syndrom und folglich eine VEGF Überexpression vor. Daher eignet sich hier der Einsatz von Axitinib als VEGFR-2 und Angiogenese-Inhibitor.<sup>[66]</sup> Axitinib zeigte sich zudem als effektiver Inhibitor der BCR-ABL Mutante T315I, die häufig für Resistenzen gegenüber Kinaseinhibitoren in der CML Therapie verantwortlich ist.<sup>[67]</sup>

Auf die Photoisomerisierung der C-C-Doppelbindung von Axitinib wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

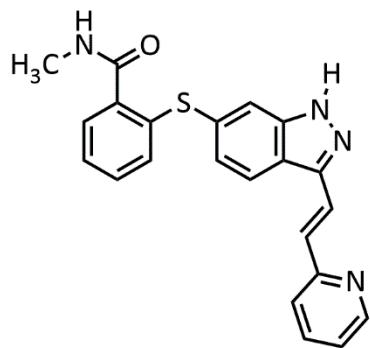


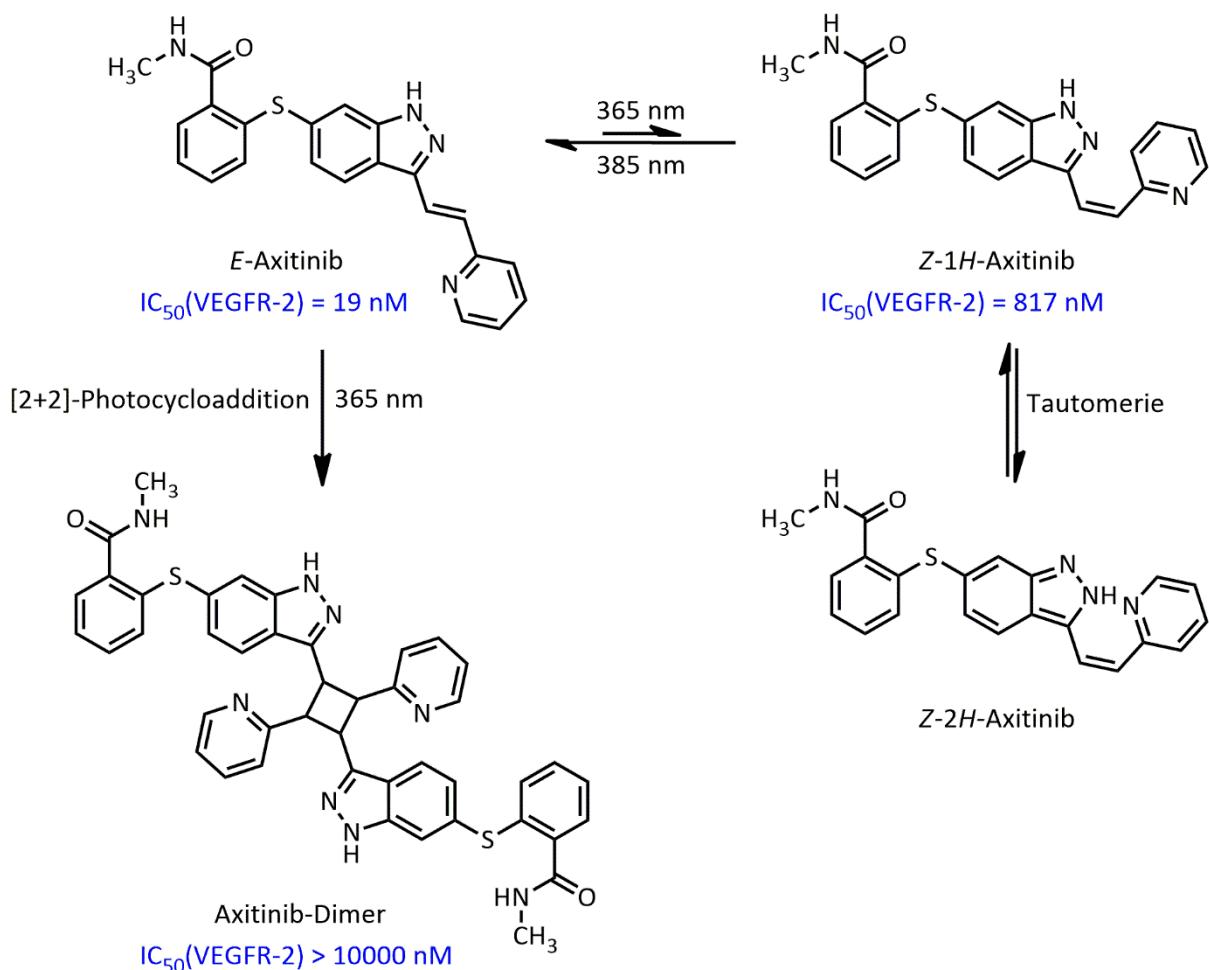
Abbildung 1.11. Strukturformel des VEGFR-Inhibitors Axitinib.

### 1.2.3 Photoschaltbare Kinaseinhibitoren

Der Einsatz von niedermolekularen Kinaseinhibitoren hat die Krebstherapie revolutioniert, jedoch stellt vor allem das Auftreten von Resistenzen ein wachsendes Problem dar.<sup>[68]</sup> Eine Strategie, dieses Problem anzugehen, ist die Entwicklung photoschaltbarer Kinaseinhibitoren für eine lokal und zeitlich begrenzte Wirkung.

In einem vorangegangenen Projekt hat unsere Arbeitsgruppe die Photoschaltbarkeit von Axitinib untersucht.<sup>[69]</sup> Dabei wurde unter anderem die Auswirkung der Licht-induzierte *E/Z*-Isomerisierung der Stilben-ähnlichen Doppelbindung auf die inhibitorische Aktivität gegenüber VEGFR-2 betrachtet. Während die *E/Z*-Isomerisierung in DMSO reversibel verläuft, kommt es in wässriger Lösung nach Bestrahlung mit 365 nm durch eine konkurrierende [2+2]-Cycloaddition zu irreversibler Dimerbildung. Eine unidirektionale Aktivierung durch Bestrahlung von Z-Axitinib mit 385 nm und folglich Isomerisierung zum biologisch aktiven *E*-Isomer konnte hingegen im *in vitro* Assay erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei konnte ein phototherapeutischer Index (Faktor Unterschied zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten) von 43 erreicht werden (Abbildung 1.12).

Im Rahmen dieses Projektes wurde zudem festgestellt, dass die Photoisomerisierung von Axitinib zu einem bestimmten Anteil bereits im gewöhnlichen Laborlicht vonstatten geht, weshalb die Handhabung der photosensitiven Verbindung in einem abgedunkelten Labor unter Rotlicht (außerhalb des Absorptionsbereichs der Verbindung) zwingend erforderlich ist.<sup>[69]</sup>



**Abbildung 1.12.** Photoschaltbarkeit des zugelassenen VEGFR-2 Inhibitors Axitinib unter Angabe der  $IC_{50}$ -Werte in einem *in vitro* VEGFR-2 Kinaseassay. Mit Genehmigung verändert nach<sup>[69]</sup>.

Eine Auswahl weiterer bereits publizierter photoschaltbarer niedermolekularer Kinaseinhibitoren ist in Tabelle 1.1 aufgeführt. Mit Ausnahme des von Wilson *et al.* publizierten Maleimid-basierten PKC-Inhibiters basieren alle anderen photoschaltbaren Kinaseinhibitoren auf (Hetero-)Azobenzolen. Auffällig dabei sind die relativ geringen phototherapeutischen Indices zwischen 1.6 und 17 in den biologischen Testungen, trotz guter Schalteigenschaften der Verbindungen in DMSO und teilweise auch in wässriger Lösung.<sup>[70–74]</sup> Der Maleimid-basierte Inhibitor weist zwar einen deutlich größeren phototherapeutischen Index auf, ist jedoch wie Axitinib in wässriger Lösung nicht reversibel schaltbar.<sup>[75]</sup>

**Tabelle 1.1.** Auswahl bereits publizierter photoschaltbarer niedermolekularer Kinaseinhibitoren mit IC<sub>50</sub>-Werten, jeweils mit und ohne Bestrahlung (bestrahlt bzw. dunkel), sowie den sich daraus ergebenen phototherapeutischen Indices. Dargestellt ist jeweils das biologisch aktive Isomer.

| Struktur Kinaseinhibitor | target                | Publikation                     | IC <sub>50</sub> (nM)<br>dunkel | IC <sub>50</sub> (nM)<br>bestrahlt | photo-<br>therap.<br>Index |
|--------------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
|                          | PKC                   | Wilson et al. <sup>[75]</sup>   | > 25000                         | 580                                | > 43                       |
|                          | RET                   | Ferreira et al. <sup>[70]</sup> | 150                             | 580                                | 3.8                        |
|                          | CK1δ                  | Schehr et al. <sup>[71]</sup>   | 138                             | 218                                | 1.6                        |
|                          | BRAF <sup>V600E</sup> | Hoorens et al. <sup>[72]</sup>  | 1680                            | 156                                | 11                         |
|                          | CK1δ                  | Kolarski et al. <sup>[73]</sup> | 4600                            | 17300                              | 3.7                        |
|                          | RET                   | Xu et al. <sup>[74]</sup>       | 3                               | 50                                 | 17                         |

## 1.3 Estrogenrezeptor-Modulatoren

### 1.3.1 Estrogene

Estrogene spielen eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse, darunter u.a. Zellwachstum, Reproduktion, Entwicklung und Differenzierung. Dysfunktionen im Estrogen-*signaling* können zu verschiedenen Krankheiten, wie Krebs, Stoffwechselerkrankungen, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen, Entzündungen und Osteoporose führen.<sup>[76]</sup>

Estrogene sind Steroidhormone, bestehend aus vier kondensierten Ringen (ein Benzolring, zwei Cyclohexane und ein Cyclopentan) mit insgesamt 18 C-Atomen. Neben einer phenolischen Hydroxygruppe besitzen die Estrogene entweder eine Carbonylgruppe (Estron) oder eine ( $17\beta$ -Estradiol), zwei (Estriol) oder drei (Estetrol) Hydroxygruppen (siehe Abbildung 1.13). Bei Frauen im gebärfähigen Alter ist  $17\beta$ -Estradiol das prädominante Hormon. Die Estrogensynthese findet vor allem in den Ovarien, aber auch in den Nebennieren und im Fettgewebe statt. Ursprung der Steroidhormone ist Cholesterin, welches in mehreren enzymatischen Schritten zu Androstendion umgesetzt wird. Dieses wird von der Cytochrom P450 Aromatase zu Estron umgewandelt, aus dem dann Estradiol gebildet wird. Im peripheren Gewebe kann Estradiol auch aus Testosteron durch Aromatase-Umsetzung gebildet werden.<sup>[77]</sup>

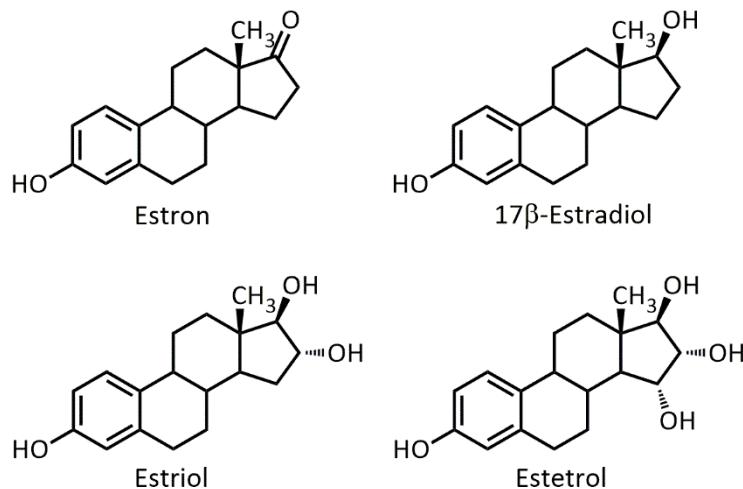


Abbildung 1.13. Strukturformeln der endogenen Estrogene.

### 1.3.2 Estrogenrezeptor-*Signaling* und (Patho)physiologie

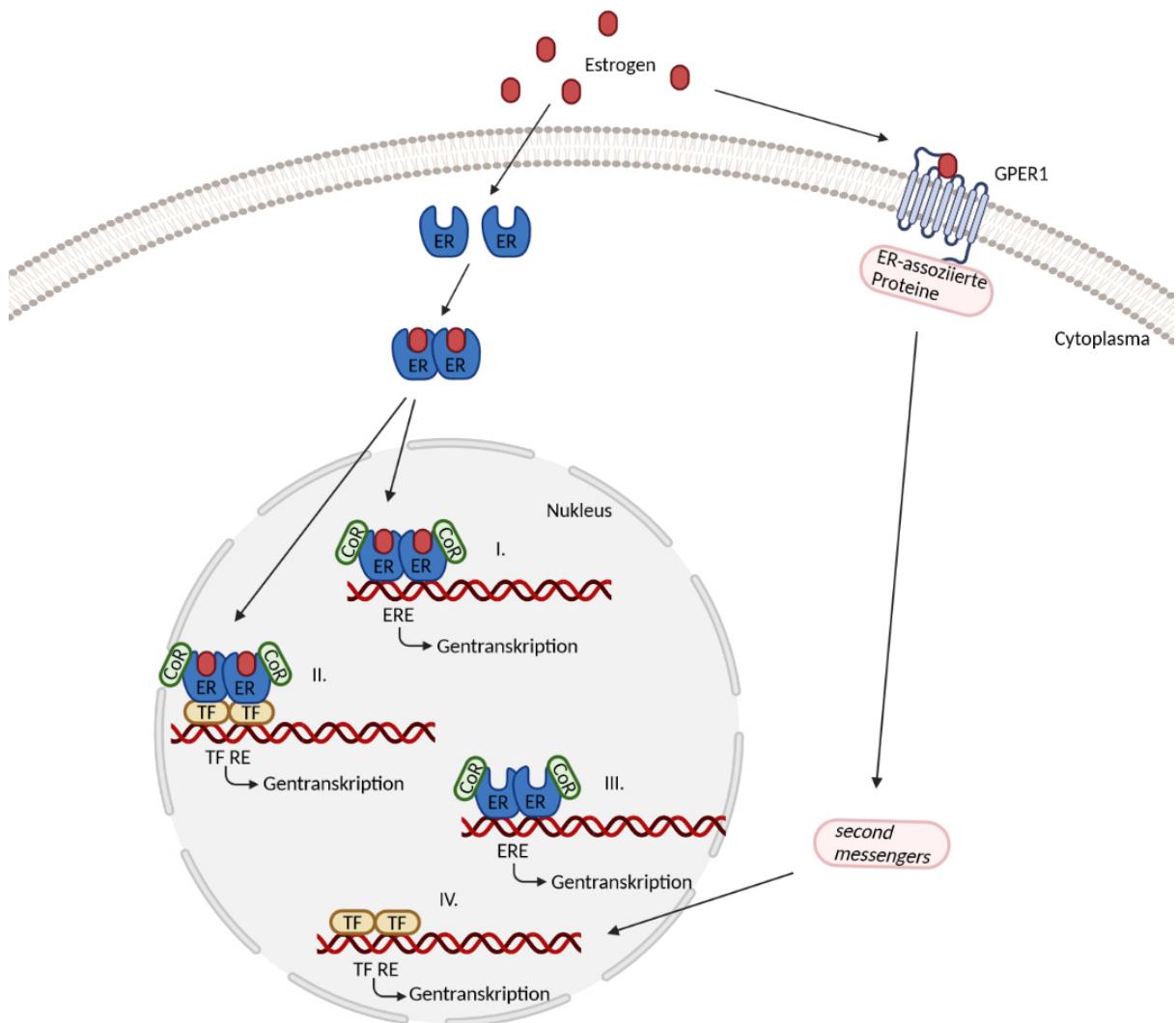
Die Wirkung der Estrogene wird sowohl über nukleäre als auch über membranständige Estrogenrezeptoren (ER) vermittelt. Während die beiden Nuklearrezeptoren, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , als Transkriptionsfaktoren agieren, ist der membranständige G-Protein-gekoppelte ER (GPER1) für ein schnelles Estrogen-*signaling* und die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, vermittelt durch *second messenger*, verantwortlich.<sup>[77]</sup> Im Folgenden soll auf die Nuklearrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  näher eingegangen werden.

ER $\alpha$  wird hauptsächlich in Uterus, Ovarien, Brust, Nieren, Knochen, weißem Fettgewebe und Leber exprimiert. ER $\beta$  wird hingegen in Ovarien, zentralem Nervensystem (ZNS), kardiovaskulärem System,

Lunge, männlichen Reproduktionsorganen, Prostata, Darm, Nieren und Immunsystem gefunden. ER $\alpha$  und ER $\beta$  weisen einen homologen Aufbau aus drei funktionellen Domänen, der N-terminalen Domäne (NTD), der DNA-Bindedomäne (DBD) und der C-terminalen Ligand-Bindedomäne (LBD), auf. Die DBD vermittelt die Bindung des ERs an spezifische DNA-Sequenzen in Zielgenen, sogenannte *estrogen-response elements* (EREs). Während die DBD zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  hochkonserviert ist, erlauben kleine strukturelle Unterschiede in den LBD die Entwicklung Subtyp-selektiver Liganden.<sup>[76]</sup>

Das nachfolgend beschriebene ER-*signaling* ist in Abbildung 1.14 vereinfacht dargestellt. Zunächst soll auf den klassischen Regulationsmechanismus über das ERE (Abbildung 1.14 I.) eingegangen werden: Nach Bindung von Estrogen an ER $\alpha$  oder ER $\beta$  im Zytoplasma kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Rezeptor-Dimerisierung induziert. Das ER-Dimer wandert in den Zellkern, wo es am Chromatin an das ERE bindet. Zusammen mit einer Vielfalt an Coregulatoren wird ein Transkriptionskomplex gebildet und entsprechend die Genexpression aktiviert.<sup>[77, 78]</sup> Allgemein sind die rekrutierten Coregulatoren (Coaktivatoren/Corepressoren) sowohl für beide Rezeptor-Subtypen ER $\alpha/\beta$  unterschiedlich als auch abhängig vom Liganden (Agonist/Antagonist).<sup>[76]</sup>

Neben dem direkten genomischen Effekt, können die ERs auch indirekt die Genexpression regulieren (Abbildung 1.14 II.). Dies trifft für ca. ein Drittel der ER-regulierten Gene zu, die keine ERE-Sequenz besitzen. Hierbei spielen z.B. Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Des Weiteren kann auch eine Ligand-unabhängige ER Aktivierung (Abbildung 1.14 III.) vermittelt durch Phosphorylierung spezifischer Reste oder Assoziation mit Coregulatoren erfolgen. Über die ER  $\alpha/\beta$  vermittelte Transkriptionsregulation hinaus findet ein Estrogen-*signaling* über die bereits erwähnten membranständigen ERs statt (Abbildung 1.14 IV.). Hierbei handelt es sich um eine indirekte Regulation, vermittelt durch die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden.<sup>[77, 78]</sup>



**Abbildung 1.14.** Verschiedene Wege des Estrogenrezeptor-Signaling. I. Direkter genomicer Regulationsmechanismus über das ERE. II. Indirekte Regulation durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. III. Ligand-unabhängige ER-Aktivierung, z.B. mittels Coregulatoren. IV. Estrogen-Signaling über membranständige G-Protein-gekoppelte ERs.<sup>[77, 78]</sup> ER: Estrogenrezeptor, ERE: estrogen-response element, CoR: Coregulatoren, TF: Transkriptionsfaktoren, TF RE: Transkriptionsfaktor-response element, GPER1: G-Protein-gekoppelter Estrogenrezeptor 1. Erstellt mit BioRender.com.

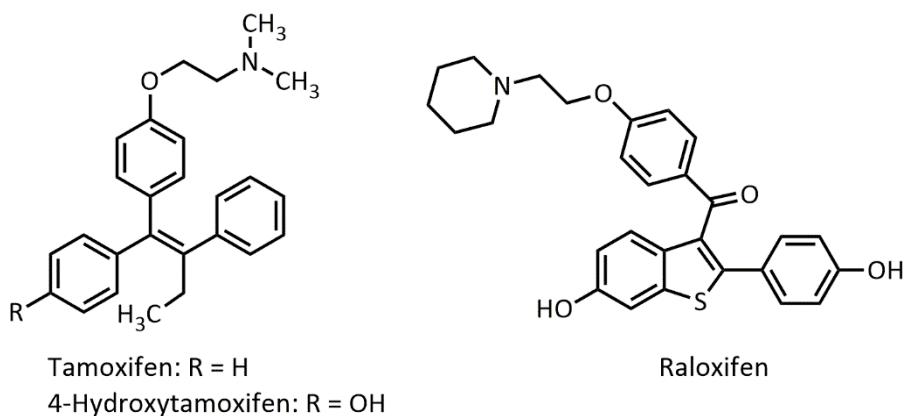
Das ER-signaling spielt eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und Tumorprogression. In den frühen Stadien von Brust-, Ovarien- und Prostatakrebs zeigt sich eine erhöhte Expression von ER $\alpha$ , welcher hier als Tumorpromoter wirkt. Die Expression von ER $\beta$  scheint hingegen während der Karzinogenese reduziert zu sein, was für eine Wirkung von ER $\beta$  als Tumorsuppressor spricht, allerdings sind die Studien diesbezüglich teilweise widersprüchlich. Ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit des ER-signaling ist dessen Aufgabe bei der Erhaltung der Lipid- und Glucose-Homöostase. So fördert ein Estrogen-Mangel die Entwicklung von Adipositas, des metabolischen Syndroms und von Typ 2 Diabetes.<sup>[76]</sup>

### 1.3.3 Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren

Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) sind nicht-steroidale ER-Liganden, die eine funktionelle Dualität aufweisen. Sie können abhängig vom Gewebe sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken. SERMs werden v.a. für die Therapie und Prävention von Brustkrebs und Osteoporose eingesetzt. Vorteil einer gemischten agonistischen/antagonistischen Wirkung ist das Erreichen einer gewünschten Wirkung im Zielgewebe ohne Nebenwirkungen in anderen Geweben. Ein idealer SERM hätte demnach eine starke anti-estrogene Wirkung auf Brust- und Uteruskarzinome, aber eine stimulierende, estrogene Wirkung auf die Knochenbildung. Die duale Wirkung ist u.a. auf unterschiedliche ER $\alpha$ /β-Expression und Coregulator-Rekrutierung in den verschiedenen Geweben zurückzuführen.<sup>[79]</sup>

Der am häufigsten eingesetzte SERM in der Behandlung von Brustkrebs ist Tamoxifen (Struktur siehe Abbildung 1.15, links). *In vivo* ist der aktive Metabolit 4-Hydroxytamoxifen.<sup>[80]</sup> Während Tamoxifen eine antagonistische Wirkung in der Brust zeigt, wirkt es als Agonist in Knochen, Uterus und kardiovaskulärem System. Daher kann als Nebenwirkung z.B. ein Uteruskarzinom auftreten.<sup>[76]</sup>

Zu den SERM der zweiten Generation gehört Raloxifen (Abbildung 1.15, rechts). Raloxifen wurde zunächst für die Brustkrebstherapie entwickelt, zeigte sich jedoch nicht wirksam in Tamoxifen-resistentem Brustkrebs und nur moderat effektiv in fortgeschrittenem Brustkrebs. Allerdings kann Raloxifen erfolgreich in der Prävention von Brustkrebs eingesetzt werden.<sup>[79, 80]</sup> Zudem ist Raloxifen für die Behandlung postmenopausaler Osteoporose zugelassen.<sup>[79]</sup>



**Abbildung 1.15.** Strukturen der selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) Tamoxifen und Raloxifen.

### 1.3.4 Endokrine Disruptoren

Neben den bereits beschriebenen endogenen, steroidalen Estrogenen und den SERMs, zeigt eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Substanzen ebenfalls eine estrogene bzw. antiestrogene Wirkung. Dazu gehören Phytoestrogene, Xenoestrogene und Metalloestrogene. Phytoestrogene sind nicht-steroidale pflanzliche Substanzen, die als Agonist oder Antagonist am ER wirken können. Zu den Xenoestrogenen gehören sämtliche synthetisch hergestellte Verbindungen mit estrogener Wirkung, darunter Arzneistoffe, wie z.B. Ethinylestradiol (Wirkstoff der Antibabypille), Industriechemikalien, wie z.B. Bisphenol A, verschiedene Nahrungsmittel- und Kosmetikzusätze und Pestizide.

Metalloestrogene sind Schwermetallionen, die an spezifische Aminosäurereste in der LBD der ERs koordinieren können und somit nicht-kompetitiv die Bindetasche blockieren.<sup>[77, 81]</sup>

Unbewusst über die Umwelt oder Nahrung aufgenommen, können diese Substanzen unerwünschte, gesundheitsschädliche Wirkungen auf das Hormonsystem haben, daher werden sie auch als endokrine Disruptoren bezeichnet. Der Begriff endokriner Disruptor wurde von der *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) definiert als: „ein exogener Stoff, der mit Produktion, Freisetzung, Transport, Bindung, Wirkung oder Elimination von natürlichen Hormonen, die im Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Regulation von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind, wechselwirkt“.<sup>[82]</sup>

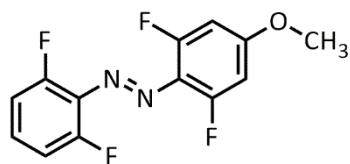
Endokrine Disruptoren können zu verschiedenen Fehlfunktionen und Krankheiten in Tier und Mensch führen.<sup>[83]</sup> Ein weltweit beobachtetes Phänomen ist die Verweiblichung von Fischen, die mit Reproduktionsstörungen einhergeht.<sup>[84]</sup> Auch im Menschen können endokrine Disruptoren verschiedene Krankheiten, wie Krebs (insbesondere Brust-, Prostata- und Hodenkrebs), Diabetes und Adipositas oder verminderte Fertilität verursachen.<sup>[83]</sup>

Beispielsweise wurden hohe Konzentrationen Ethinylestradiol in Oberflächenwassern gefunden (> 0.1 µg/l für Deutschland, USA und Brasilien, dies entspricht mehr als 30-fach dem EC<sub>50</sub><sup>[85]</sup> von Ethinylestradiol).<sup>[86]</sup> Zudem wurde gezeigt, dass Ethinylestradiol sehr hohe Toxizität, Persistenz und Bioakkumulation in der Umwelt ausweist.<sup>[87]</sup>

### 1.3.5 Photoschaltbare Estrogenrezeptor-Modulatoren

Eine Reduktion der durch Arzneimittelrückstände verursachten Umwelteinflüsse könnte durch die Entwicklung photoschaltbarer Wirkstoffe erreicht werden. Diese würden im Idealfall nur für die Therapie aktiviert, aber inaktiv in die Umwelt entlassen werden. Des Weiteren könnten z.B. SERMs noch selektiver nur in einem bestimmten Gewebe durch Bestrahlung aktiviert und somit Nebenwirkungen verringert werden. Über die therapeutische Anwendung hinaus könnten photoschaltbare Estrogenrezeptor-Liganden dazu beitragen, das komplexe ER-*signaling* weitergehend aufzuklären.

Kürzlich wurden Azobenzol-basierte, photoschaltbare Estrogenrezeptor-Liganden von Tsuchiya und Umeno *et al.* publiziert. Die in Abbildung 1.16 dargestellte Verbindung zeigt eine mikromolare Bindungsaaffinität zu ERα in der Z-Konfiguration, während das E-Isomer bis 10 µM keine Aktivität aufweist.<sup>[88]</sup>



**Abbildung 1.16.** Struktur des von Tsuchiya und Umeno *et al.* entwickelten, photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Liganden.<sup>[88]</sup>

Des Weiteren wurden in den letzten zwei Jahren andere photoschaltbare Nuklearrezeptor-Liganden für Retinsäurerezeptor α, Farnesoid X Rezeptor und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ von der Arbeitsgruppe Trauner publiziert. Alle diese „Photohormone“ basieren auf Azobenzolen.<sup>[15, 89, 90]</sup>



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Photopharmakologische Konzepte zielen auf eine reversible sowie zeitlich und räumlich kontrollierte Wirkstoffaktivierung ab. Durch eine präzise gesteuerte Wirkung im Zielgewebe sollen Nebenwirkungen vermieden und die ökotoxikologische Verträglichkeit der Wirkstoffe gefördert werden. Zudem können photoschaltbare *tool*-Verbindungen zur Aufklärung von Proteinfunktionen beitragen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der biochemischen Charakterisierung verschiedener photoschaltbarer Wirkstoffe. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf die „neuartigen“ Diazocine und deren Eignung für biologische Anwendungen gerichtet. In diesem Zusammenhang soll auch ein Vergleich zu den standardmäßig eingesetzten Azobenzolen gezogen werden, die bislang zum Teil nur relativ geringe Unterschiede zwischen den biologischen Aktivitäten mit und ohne Bestrahlung zeigen (vgl. photoschaltbare Kinaseinhibitoren Tabelle 1.1).

Insgesamt wurden vier Projekte bearbeitet, von denen sich drei mit photoschaltbaren Kinaseinhibitoren beschäftigen und eins mit photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Agonisten.

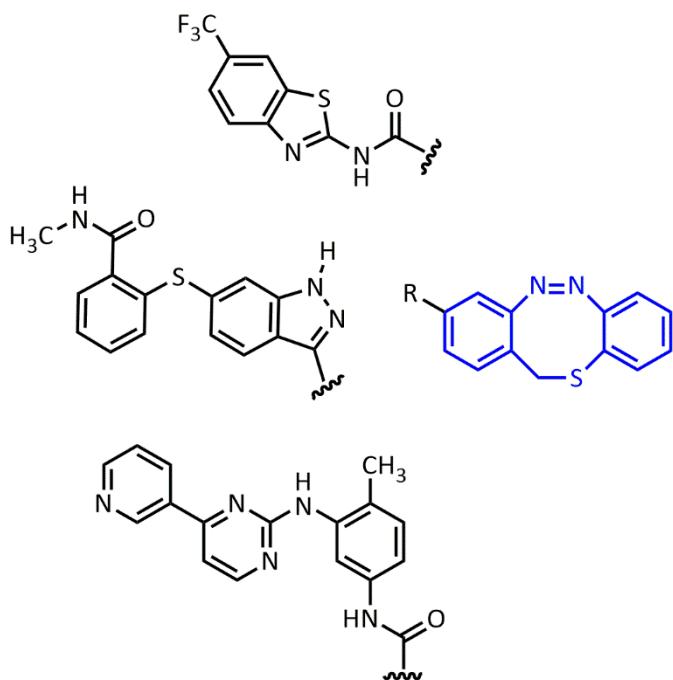
### Photoschaltbare Kinaseinhibitoren

Je ein Beispiel aus den drei Projekten zu photoschaltbaren Kinaseinhibitoren ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Von oben nach unten sind die Pharmakophore eines CK1 $\delta$ -Inhibitors, von Axitinib und von Imatinib dargestellt, die jeweils mit einem Schwefeldiazocin (blau) funktionalisiert wurden.

Im ersten Projekt bestand die Aufgabenstellung in der *target*-Evaluierung ursprünglich als CK1 $\delta$ -Inhibitoren von Schehr entwickelter Diazocin-funktionalisierter Derivate mit dem Ziel, photopharmakologische Wirkunterschiede im biologischen System nachzuweisen. Dabei sollten in erster Linie *hits*, die in einem Kinase-*screening* bzw. virtuellen *screening* erhalten wurden, in separaten *in vitro* Assays verifiziert werden.

Im zweiten Projekt sollten ausgehend von dem in der Einleitung (Abschnitt 1.2.3) beschriebenen Axitinib-Projekt reversibel schaltbare Azo- und Diazocin-funktionalisierte Axitinib-Derivate im VEGFR-2 Kinaseassay jeweils mit und ohne Bestrahlung getestet und hinsichtlich ihres photopharmakologischen Wirkunterschieds bewertet werden.

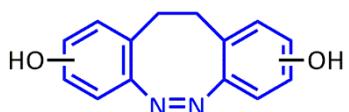
Im dritten Projekt wurde das Konzept der Azologisierung bzw. der Kopplung von Azobenzolen und Diazocinen an Wirkstoff-Pharmakophore, in Anlehnung an die photoschaltbaren Axitinib-Derivate, auch auf Imatinib und Nilotinib angewendet. Die Azoderivate sollten entsprechend biochemisch charakterisiert werden. Dafür sollte zunächst ein PDGFR- $\beta$  Kinaseassay genutzt werden.



**Abbildung 2.1.** Beispiele photoschaltbarer Diazocin-basierter Kinaseinhibitoren die in dieser Arbeit photobiologisch charakterisiert werden sollten. Dargestellt ist je ein Beispiel der drei Projekte in denen die Pharmakophore von CK1 $\delta$ -Inhibitoren, Axitinib und Imatinib (von oben nach unten) mit einem Schwefeldiazocin (blau) funktionalisiert wurden.

### Photoschaltbare Estrogenrezeptor-Agonisten

Das vierte Projekt verfolgte einen neuen Ansatz des Photoschalter-Designs. Das photoschaltbare Element (Diazocin) stellt hier selbst das Pharmakophor dar. Dafür dienen Hydroxy-funktionalisierte Diazocin-Derivate, die Estradiol imitieren sollen, als Modellsysteme (Abbildung 2.2). Die Auswirkung auf die photopharmakologische Aktivität durch Bestrahlung (und folglich gravierender struktureller Änderung) dieses neuen Photoschalter-Designs sollte im biologischen System untersucht werden. Dazu sollte ein zellbasierter Reportergenassay zur Ermittlung der estrogenen Aktivität (mit/ohne Bestrahlung) etabliert werden.



**Abbildung 2.2.** Hydroxy-funktionalisiertes Diazocin als photoschaltbarer Estrogenrezeptor-Agonist und Modellsystem für den Einsatz des photoschaltbaren Elements selbst als Pharmakophor.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

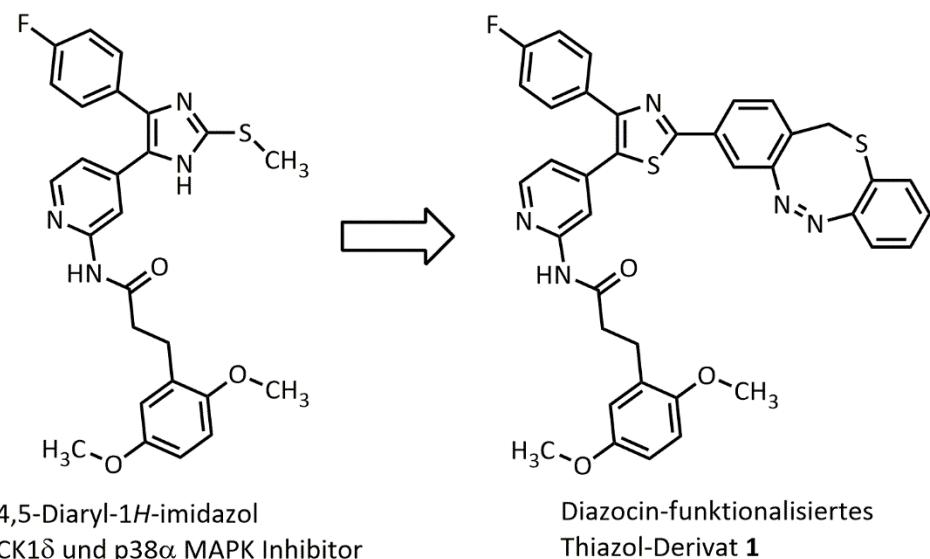
#### 3.1 Photoschaltbare Diazocin-funktionalisierte CK1 $\delta$ -Inhibitoren

Im ersten Projekt stand die *target*-Identifizierung für drei verschiedene Diazocin-funktionalisierte Leitstrukturen im Vordergrund, die ursprünglich als *Casein kinase 1  $\delta$*  (CK1 $\delta$ )-Inhibitoren von Schehr im Rahmen ihrer Dissertation<sup>[91]</sup> entwickelt wurden. Ziel war es, die Eignung von Diazocinen als Photoschalter im biologischen System an geeigneten *targets* nachzuweisen.

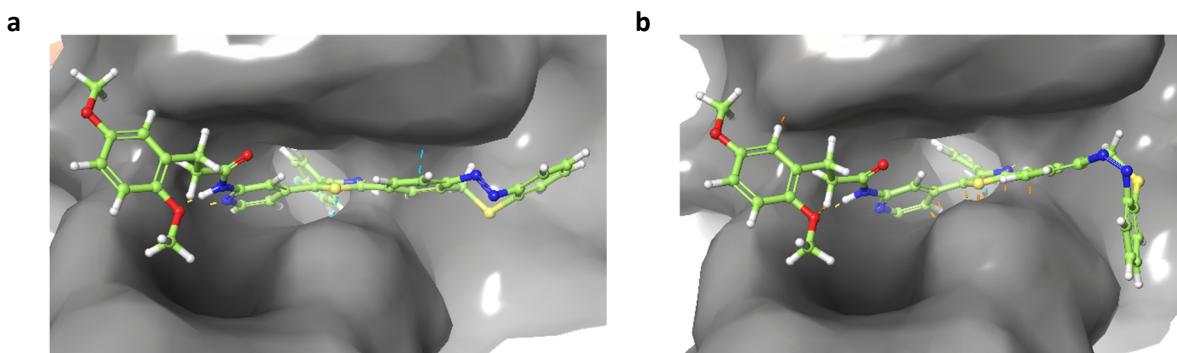
Schehr ging dafür zunächst von als *teardrop binders* bekannten 4,5-Diarylheterocyclen aus, die hochpotent CK1 $\delta$  und die strukturell eng verwandte *p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase* (p38 $\alpha$  MAPK) inhibieren.<sup>[92, 93]</sup> CK1 $\delta$  gehört zur CK1-Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Die  $\delta$ -Isoform wird auch als Stress-induzierte Isoform bezeichnet. Verschiedene Dysregulationen und Mutanten werden mit neurodegenerativen Erkrankungen sowie Krebs in Verbindung gebracht. CK1 $\delta$  ist in sehr vielen Regulationsmechanismen der Zelle involviert, beispielsweise im zirkadianen Rhythmus und im Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg.<sup>[94]</sup> p38 $\alpha$  MAPK gehört ebenfalls zu den Serin/Threonin-Kinasen und ist u.a. an der Produktion proinflammatorischer Zytokine beteiligt, weshalb p38 $\alpha$  auch in Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis sowie *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) und Asthma steht. Des Weiteren spielt p38 $\alpha$  eine wichtige Rolle in der Tumorgenese; abhängig von Zelltyp und Entwicklungsstadium als Suppressor oder Promoter.<sup>[95]</sup>

Für einen 4,5-Diaryl-1*H*-imidazol-basierten Inhibitor (Abbildung 3.1, links) sind IC<sub>50</sub>-Werte von 4 nM auf CK1 $\delta$  und 10 nM auf p38 $\alpha$  bekannt. Ebenfalls war bereits eine Röntgenkristallstruktur dieses Inhibitors in p38 $\alpha$  verfügbar (PDB: 5ML5).<sup>[93]</sup> Der *hinge binder* des Inhibitors ist dabei das 2-Aminopyridin, welches zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Die 2-Position des Imidazolrings wurde von Schehr zur Einführung von photoschaltbaren Diarylazo- und Diazocin-Systemen ausgewählt. In der Kristallstruktur liegt diese Position in einem engen Kanal, daher sollte sich ein deutlicher Wirkunterschied zwischen den *E/Z*-Konfigurationen des photoschaltbaren Inhibitors ergeben (vgl. Abbildung 3.2). Da das 1*H*-Imidazol im Falle der Azoderivate zu einer Tautomerisierung mit der Azobrücke führen würde, wurde dieses Motiv durch Thiazol ersetzt.<sup>[71]</sup>

Im Folgenden soll nun das Diazocin-funktionalisierte Thiazol-Derivat **1** (Abbildung 3.1, rechts) näher betrachtet werden. Hierbei wurde ein Schwefel-verbrücktes Diazocin in *meta*-Position zur Azobindung mit dem Thiazol verknüpft.<sup>[71]</sup> Heterodiazocine besitzen den synthetischen Vorteil, dass sie unsymmetrisch aufgebaut werden können und weisen relativ lange Halbwertszeiten auf (Schwefel-Diazocin in Aceton 3.5 Tage).<sup>[22]</sup> *Molecular modelling* Studien wurden unter Verwendung der Software Maestro von Schrödinger LLC (New York, NY, USA) durchgeführt. Die *modelling* Ergebnisse des Diazocines **1** in der ATP-Bindetasche von p38 $\alpha$  MAPK (PDB: 5ML5)<sup>[93]</sup> zeigen für das gestreckte *E*-Isomer (*E*-**1**) einen plausiblen Bindemodus (Abbildung 3.2 a), während für das gewickelte *Z*-Isomer (*Z*-**1**) nur ein sehr ungünstiger Bindemodus mit starker sterischer Kollision (orange gestrichelte Linien, Abbildung 3.2 b) hervorgesagt wird. Daher ist anzunehmen, dass das *Z*-Isomer nicht in der Kinase binden kann und somit biologisch inaktiv ist. Für das *E*-Isomer ist hingegen eine biologische Aktivität zu erwarten.<sup>[71]</sup>

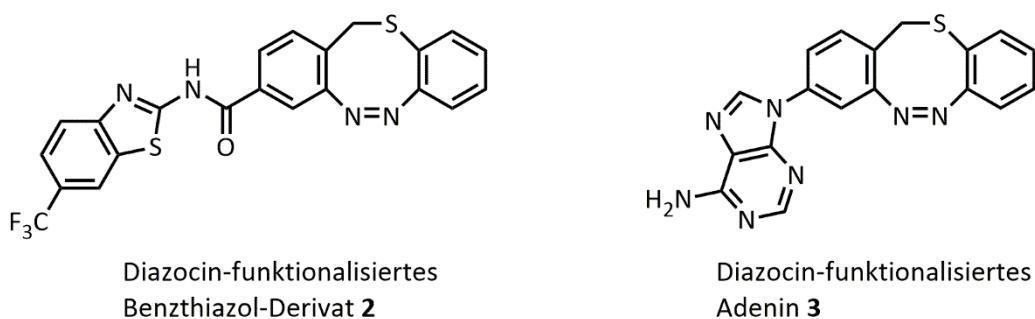


**Abbildung 3.1.** Ausgehend vom 4,5-Diaryl-1*H*-imidazol (*teardrop binder*), einem hochpotenten CK1 $\delta$ /p38 $\alpha$  Inhibitor<sup>[93]</sup>, wurde von Schehr das photoschaltbare Diazocin-funktionalisierte Thiazol-Derivat **1** entwickelt.<sup>[71]</sup>



**Abbildung 3.2.** Berechnete Bindemodi des Diazocin-funktionalisierten Thiazol-Derivates **1** in der ATP-Bindetasche von p38 $\alpha$  MAPK (PDB: 5ML5)<sup>[93]</sup>. **(a)** Für das *E*-Isomer (*E*-**1**) kann ein plausibler Bindemodus gefunden werden. Gelb gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen, hellblau gestrichelte Linien:  $\pi-\pi$  stacking. **(b)** Ungünstiger Bindemodus des *Z*-Isomers (*Z*-**1**) mit starker sterischer Kollision (orange gestrichelte Linien). Angelehnt an<sup>[71]</sup>.

Neben dem Diazocin-funktionalisierten *teardrop binder* (**1**) wurden von Schehr zwei weitere Leitstrukturen mit Schwefel-Diazocinen verknüpft.<sup>[91]</sup> Zum einen wurde ein Benzthiazol-Derivat funktionalisiert (**2**, Abbildung 3.3, links). Benzthiazol- und Benzimidazol-Derivate sind als CK1 $\delta$ -Inhibitoren literaturbekannt.<sup>[96, 97]</sup> Zur Herstellung eines entsprechenden photoschaltbaren Derivates wurde 2-Aminobenzothiazol mittels Peptidkupplung mit dem Diazocin funktionalisiert (**2**). Zum anderen wurde das Diazocin an den ATP-Bestandteil Adenin gebunden (**3**, Abbildung 3.3, rechts).<sup>[91]</sup> Als *hinge binder* in der ATP-Bindetasche könnte Adenin möglicherweise zu einem potenteren, nicht selektiven Kinaseinhibitor führen. Im Vordergrund steht hierbei der *proof of concept* des Diazocins als Photoschalter für biologische Systeme. Zumal zu diesem Zeitpunkt (2017) noch kaum photopharmakologische Anwendungen für Diazocine bekannt waren.

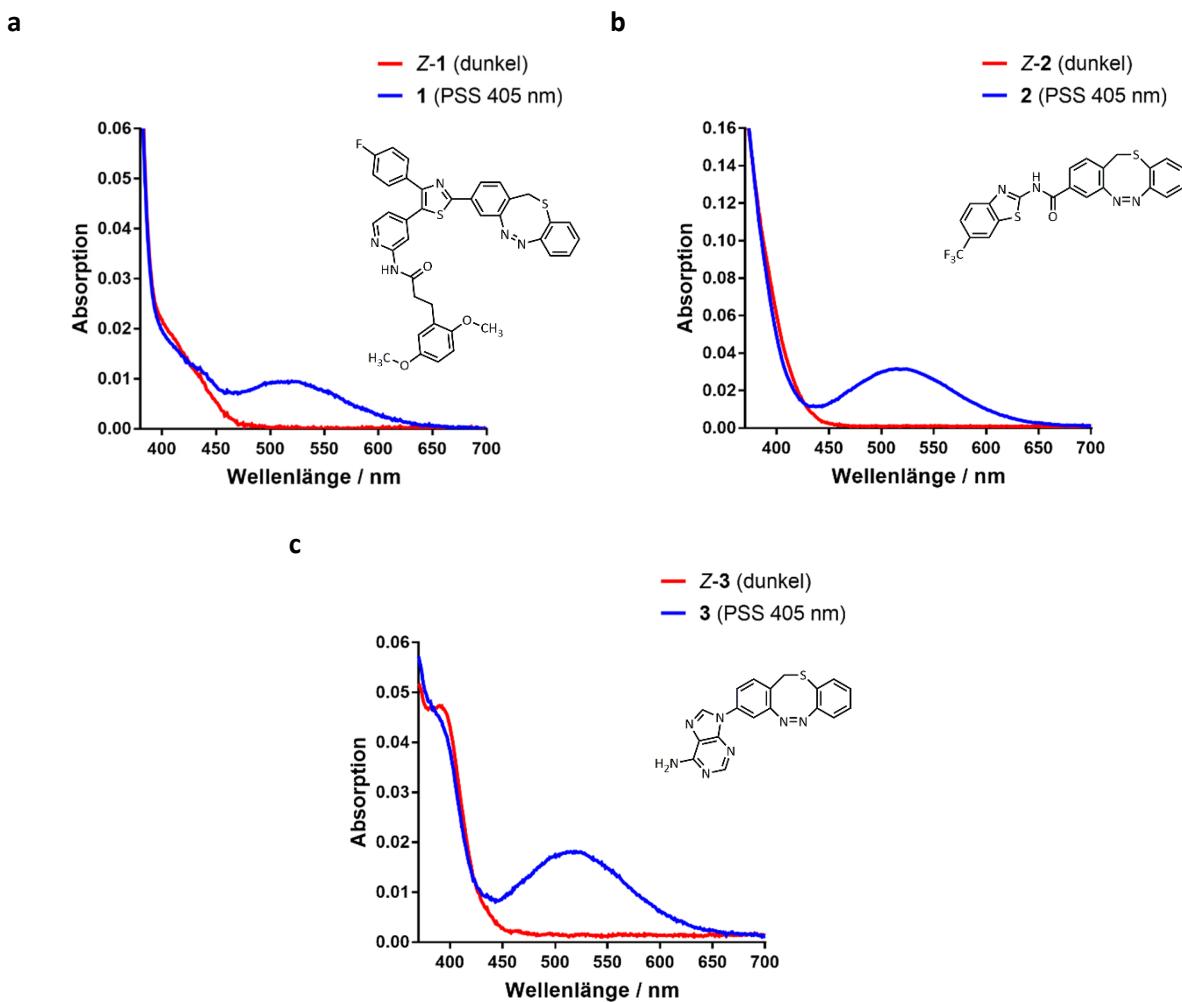


**Abbildung 3.3.** Von Schehr synthetisierte Diazocin-funktionalisierte Photoschalter.<sup>[91]</sup> Benzthiazol-Derivat **2** basiert auf der Struktur bekannter CK1 $\delta$ -Inhibitoren.<sup>[96, 97]</sup> Verbindung **3** enthält den ATP-Baustein Adenin.

### 3.1.1 Photochemische Charakterisierung

Zur photochemischen Charakterisierung der Diazocin-funktionalisierten CK1 $\delta$ -Inhibitoren **1-3** wurden von Schehr UV/VIS-Spektren aufgenommen (Abbildung 3.4) sowie Bestimmungen der photostationären Gleichgewichte (PSS) und der Halbwertszeiten vorgenommen (Tabelle 3.1).<sup>[91]</sup> Aufgrund eines sehr großen Unterschieds in der Extinktion zwischen dem Diazocin und der jeweiligen funktionalisierten Leitstruktur in Verbindung mit einer begrenzten Wasserlöslichkeit der Derivate **1-3** konnte die Charakterisierung nur in DMSO durchgeführt werden. Wie aus den UV/VIS-Spektren in Abbildung 3.4 ersichtlich, lassen sich die Z-Diazocene (rot) durch Bestrahlung mit 405 nm zum jeweiligen *E*-Isomer schalten. Dabei werden die  $n\pi^*$  Banden der *E*-Isomere angereichert, deren Absorptionsmaxima bei 520 nm liegen (blau). Durch Bestrahlung mit 525 nm können diese quantitativ zum Z-Isomer zurückgeschaltet werden (nicht dargestellt).

Mittels NMR-Spektroskopie wurde der jeweilige Anteil des *E*-Isomers im PSS nach Bestrahlung mit 405 nm bestimmt. Dieser liegt für die Diazocin-funktionalisierten Derivate **1-3** in DMSO zwischen 47 % und 60 % (Tabelle 3.1). Die Bestimmung der Halbwertszeiten wurde sowohl mittels NMR- als auch mittels UV/VIS-Spektroskopie vorgenommen. Dabei sind die mittels NMR-Spektroskopie bestimmten Halbwertszeiten mit 3.2-4.1 Tagen deutlich länger als die mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmten Halbwertszeiten (18-21 Stunden, Tabelle 3.1). Diese Konzentrationsabhängigkeit könnte auf ein  $\pi$ - $\pi$  stacking der *E*-Isomere zurückzuführen sein. Die im Vergleich zum UV/VIS deutlich höheren NMR-Konzentrationen begünstigen dieses  $\pi$ - $\pi$  stacking, was zu einer langsameren Rückisomerisierung und folglich längeren Halbwertszeiten führt.



**Abbildung 3.4.** UV/VIS-Spektren der von Schehr synthetisierten Diazocin-funktionalisierten CK1 $\delta$ -Inhibitoren **1-3** (jeweils vergrößerte Ansicht der  $\pi\pi^*$ -Bande des Diazocins) in DMSO. Gemessen wurde jeweils das Z-Isomer im Dunkeln (rote Linien) sowie das PSS nach Bestrahlung mit 405 nm (blaue Linien). (a) Diazocin-funktionalisiertes 4,5-Diaryl-thiazol (*teardrop binder*) **1**.<sup>[71]</sup> (b) Diazocin-funktionalisiertes Benzthiazol-Derivat **2**. (c) Diazocin-funktionalisiertes Adenin **3**.<sup>[91]</sup>

**Tabelle 3.1.** Zusammenfassung der photochemischen Eigenschaften der Diazocin-funktionalisierten CK1 $\delta$ -Inhibitoren **1-3** in DMSO. Photostationäre Gleichgewichte (PSS) nach Bestrahlung mit 405 nm sowie Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) gemessen mittels NMR- und UV/VIS-Spektroskopie.<sup>[91]</sup>

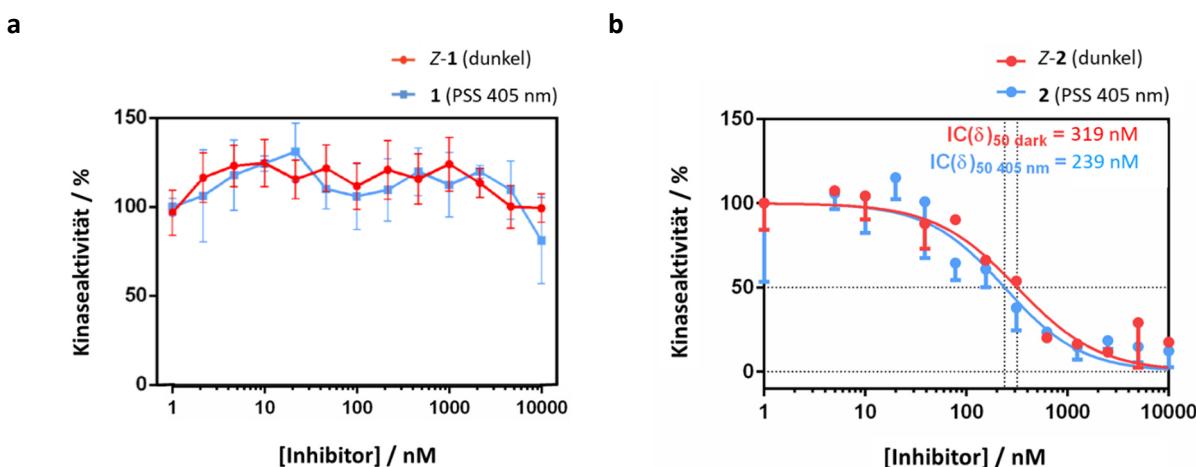
| #        | PSS 405 nm (E/Z %),<br>DMSO (NMR) | $t_{1/2}$ (d),<br>DMSO (NMR) | $t_{1/2}$ (h),<br>DMSO (UV/VIS) |
|----------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| <b>1</b> | 47/53                             | 3.2                          | 19                              |
| <b>2</b> | 57/43                             | 3.4                          | 18                              |
| <b>3</b> | 60/40                             | 4.1                          | 21                              |

### 3.1.2 Biologische Testung

#### 3.1.2.1 CK1 $\delta$ Kinaseassay

Die Diazocin-funktionalisierten Derivate **1** und **2** wurden zunächst von Ianes im Rahmen ihrer Dissertation<sup>[98]</sup> im Arbeitskreis Knippschild an der Universität Ulm in einem *in vitro* CK1 $\delta$  Kinaseassay getestet. Dabei wurde ein radiometrischer Assay unter Einsatz von radioaktiven  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP verwendet. Die Auswertung erfolgt über Auslesung der Cherenkov-Strahlung der mit  $^{32}\text{P}$ -phosphorylierten Substratproteine, die mit der Kinaseaktivität korreliert.

Unter kontrollierten Lichtbedingungen wurde jeweils das unbestrahlte Z-Isomer sowie das PSS nach Bestrahlung mit 405 nm getestet. Für das Diazocin-funktionalisierte 4,5-Diaryl-thiazol **1** konnte keine signifikante Inhibition der CK1 $\delta$ -Aktivität in beiden Konfigurationen bis zu Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Abbildung 3.5 a). Das Diazocin-funktionalisierte Benzthiazol-Derivat **2** hingegen zeigt eine moderate inhibitorische Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten von 319 nM ( $\pm 59$  nM) für das unbestrahlte Z-Isomer und 239 nM ( $\pm 56$  nM) für das PSS nach Bestrahlung mit 405 nm, jedoch keinen signifikanten Unterschied vor und nach Bestrahlung (Abbildung 3.5 b).<sup>[98]</sup>



**Abbildung 3.5.** Dosis-Wirkungskurven der Diazocin-funktionalisierten Derivate **1** und **2** in einem *in vitro* CK1 $\delta$  Kinaseassay, jeweils mit und ohne Bestrahlung. (a) **1** im Dunkeln (Z-Isomer, rot, IC<sub>50</sub> > 10000 nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (PSS 405 nm, blau, IC<sub>50</sub> > 10000 nM). (b) **2** im Dunkeln (Z-Isomer, rot, IC<sub>50</sub> = 319  $\pm$  59 nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (PSS 405 nm, blau, IC<sub>50</sub> = 239  $\pm$  56 nM). Assaydurchführung und Erstellung der Dosis-Wirkungskurven von Ianes<sup>[98]</sup>, ebenfalls bereits veröffentlicht von Schehr<sup>[91]</sup>.

Beide Verbindungen (**1** und **2**) wurden zudem an der verwandten p38 $\alpha$  MAP-Kinase getestet. Die entsprechenden Assays wurden von Weisner im Arbeitskreis Rauh an der TU Dortmund durchgeführt. Dabei konnte für keines der beiden Derivate eine inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden (IC<sub>50</sub> > 30000 nM).<sup>[99]</sup>

#### 3.1.2.2 ProQinase Screening

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob ein anderes target identifiziert werden kann, an dem eine photoschaltbare Wirkung nachweisbar ist. Dafür wurde zunächst ein Kinase-screening bei der Firma ProQinase (Freiburg, Deutschland) für die Diazocin-funktionalisierten Derivate **1-3** durchgeführt. In dem Selektivitätsprofiling wurden dabei 320 Wildtyp-Kinasen mit den Verbindungen **1-3** jeweils in den

Konzentrationen 10 µM und 1 µM vermessen. Da der kommerzielle Assay unter gewöhnlichem Umgebungslicht stattfindet und die Testung weder im Dunkeln noch mit Bestrahlung durchgeführt werden kann, wurde von Schehr das PSS im Laborlicht exemplarisch für Diazocin **1** bestimmt. Dabei wurde der Anteil des vermutlich biologisch aktiven *E*-Isomers mit 12 % bestimmt.<sup>[91]</sup> Die resultierenden Inhibitorkonzentrationen im *screening* sollten demnach ausreichend sein, um eine mögliche Kinaseinhibition erkennen zu können.

Die Ergebnisse (vgl. Anhang Abschnitt 9.1) sind als Restaktivitäten der (inhibierten) Kinasen in Prozent zur Kontrolle angegeben. Auffällig ist, dass das Adenin-Diazocin **3** auf keiner einzigen Kinase eine deutliche Inhibition zeigt. Somit ist davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um einen Kinaseinhibitor handelt. Für das Diazocin-funktionalisierte 4,5-Diaryl-thiazol **1** sowie das Benzthiazol-Derivat **2** konnten hingegen verschiedene *hits* identifiziert werden. Zur weiteren Untersuchung wurden *targets* ausgewählt, an denen beide Diazocin-Derivate eine deutliche Inhibition (Restaktivität < 50 %) zeigen. Zudem wurden von Witt *molecular modelling* Studien durchgeführt.<sup>[100]</sup> Als vielversprechende *hits* wurden schließlich die Tyrosinkinasen BMX, IGF-1R und SRC identifiziert.

Testungen an SRC wurden von Keul im Arbeitskreis Rauh durchgeführt.<sup>[101]</sup> Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase SRC steht repräsentativ für die SRC-Kinasefamilie und wird von einem Protoonkogen codiert. Durch Beteiligung an zahlreichen Signalkaskaden in der Zelle spielt SRC u.a. eine Schlüsselrolle in der Zellteilung, was SRC zu einem geeigneten *target* in der Krebstherapie macht. Beispielsweise sind bereits drei SRC-Inhibitoren für die CML-Therapie zugelassen.<sup>[102]</sup> Für die Diazocin-funktionalisierten Derivate **1** und **2** konnte im SRC Kinaseassay allerdings weder mit noch ohne Bestrahlung eine inhibitorische Aktivität beobachtet werden.<sup>[101]</sup>

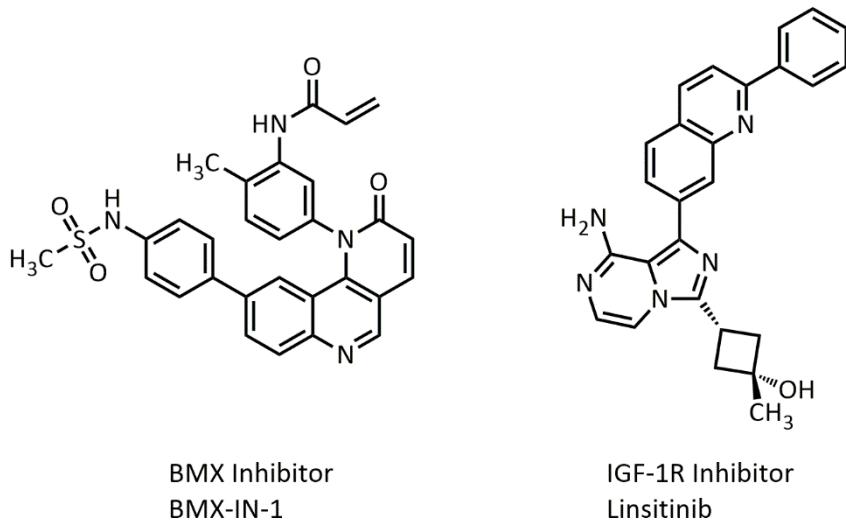
Für BMX und IGF-1R sollten im Folgenden die entsprechenden Assays etabliert werden.

### 3.1.2.3 BMX und IGF-1R Kinaseassays

*Bone marrow tyrosine kinase on chromosome X* (BMX) gehört zur TEC-Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und ist strukturell verwandt mit den SRC Kinasen.<sup>[103]</sup> BMX wird unter anderem in Epithelzellen exprimiert; in Prostatakrebs ist die Expression erhöht.<sup>[104]</sup> Die Funktionen von BMX sind vielseitig und zum Teil noch nicht genau aufgeklärt. BMX kann verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivieren und ist an der Regulierung verschiedener Zellprozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Motilität und Apoptose, beteiligt.<sup>[103]</sup> Neben der Expression in vielzähligen Krebsarten spielt BMX auch eine wichtige Rolle bei der Immunantwort in hämatopoetischen Zellen sowie bei kardiovaskulären Prozessen.<sup>[105]</sup> Als Referenzinhibitor für den BMX Kinaseassay wurde BMX-IN-1 ausgewählt. BMX-IN-1 ist ein potenter, selektiver und irreversibler BMX-Inhibitor (Struktur siehe Abbildung 3.6, links). Das elektrophile Acrylamid bindet kovalent an Cys-496 in der ATP-Bindetasche. BMX-IN-1 inhibiert verschiedene Prostatakrebs-Zelllinien mit IC<sub>50</sub>-Werten im einstelligen micromolaren Bereich.<sup>[104]</sup>

*Insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen und spielt eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung sowie dem postnatalen Wachstum. Ebenso ist IGF-1R an der oncogenen Transformation und an der Tumorgenese beteiligt.<sup>[106]</sup> Aufgrund seines *prosurvival signalings* wird IGF-1R auch für Resistenzen gegenüber verschiedenen Krebstherapien verantwortlich gemacht.<sup>[107]</sup> Zwischen IGF-1R und dem eng verwandten Insulinrezeptor (IR) kann ein kompensatorischer *crosstalk* erfolgen, weshalb vor allem duale IGF-1R/IR-Inhibitoren für die

Krebstherapie interessant sind.<sup>[106]</sup> Einen solchen dualen IGF-1R/IR-Inhibitor stellt Linsitinib (OSI-906) dar. Für den ATP-kompetitiven Inhibitor (Struktur siehe Abbildung 3.6, rechts) konnten antiproliferative Wirkungen an verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen werden.<sup>[107]</sup> Für mehrere Krebsarten wurde die Phase II der klinischen Studien erreicht, darunter unter anderem kleinzelliges Lungenkarzinom<sup>[108]</sup>, Prostatakarzinom<sup>[109]</sup> und gastrointestinaler Stromatumor<sup>[110]</sup>. Für die Behandlung von Nebennierenrindenkarzinom hat Linsitinib die Phase III der klinischen Studien erreicht. Insgesamt zeigte sich jedoch keine Erhöhung der Überlebenszeit.<sup>[111]</sup>



**Abbildung 3.6.** Referenzinhibitoren für die Etablierung der Kinaseassays. Links: Struktur des *bone marrow tyrosine kinase on chromosome X* (BMX) Inhibitors BMX-IN-1.<sup>[104]</sup> Rechts: Struktur des *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) Inhibitors Linsitinib.<sup>[107]</sup>

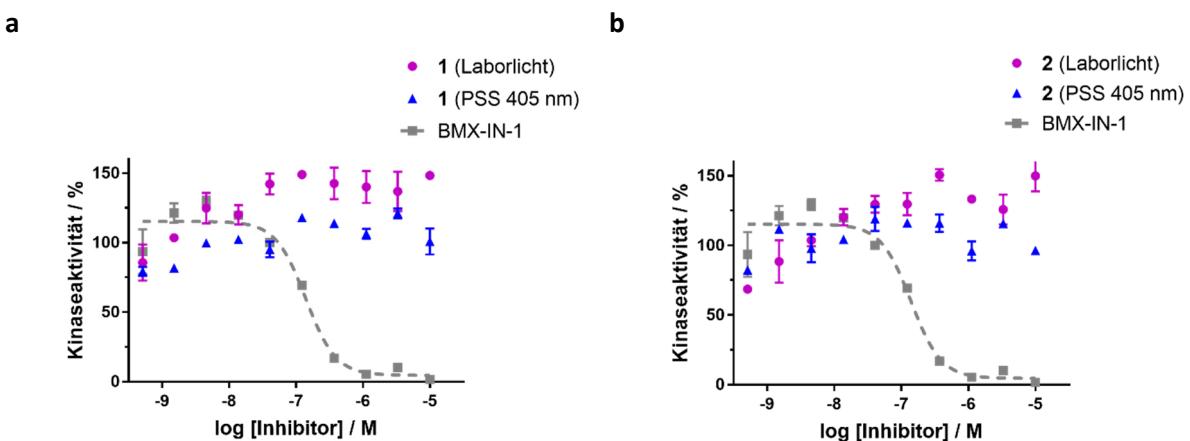
Als BMX bzw. IGF-1R Kinaseassay wurden die entsprechenden Enzymsysteme zusammen mit dem ADP-Glo™ Kinaseassay (Promega, Madison, WI, USA) verwendet, den wir zuvor bereits erfolgreich für die Testung von VEGFR-2 sowie PDGFR-β Inhibitoren eingesetzt haben.<sup>[69]</sup> Das Prinzip des Assays beruht auf der Bestimmung des bei der Kinasereaktion verbrauchten ATPs mithilfe einer Luciferin/Luciferase-Reaktion. Das erhaltene Lumineszenzsignal ist dabei proportional zur Kinaseaktivität.

Bei der Etablierung beider Assays wurden die Konzentrationen von ATP, Substrat und Kinase so aufeinander abgestimmt, dass am Messgerät Lumineszenzsignale im linearen Bereich mit gutem Signal-zu-Rausch Verhältnis erhalten wurden. Dabei war zu beachten, dass das Substrat in diesem Assayformat im Überschuss zu ATP vorliegen muss. Die Testsubstanzen wurden jeweils in einem Konzentrationsbereich von 10 µM bis 0.5 nM in 1:3 Verdünnungsschritten mit 1 % DMSO als Cosolvent eingesetzt. Für die Referenzen BMX-IN-1 und Linsitinib konnten in den jeweiligen Assays IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt werden, die in sehr guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten stehen (BMX-IN-1: IC<sub>50</sub> = 140 nM, Literaturwert: 138 nM<sup>[104]</sup>; Linsitinib: IC<sub>50</sub> = 56.6 nM, Literaturwert: 35 nM<sup>[107]</sup>).

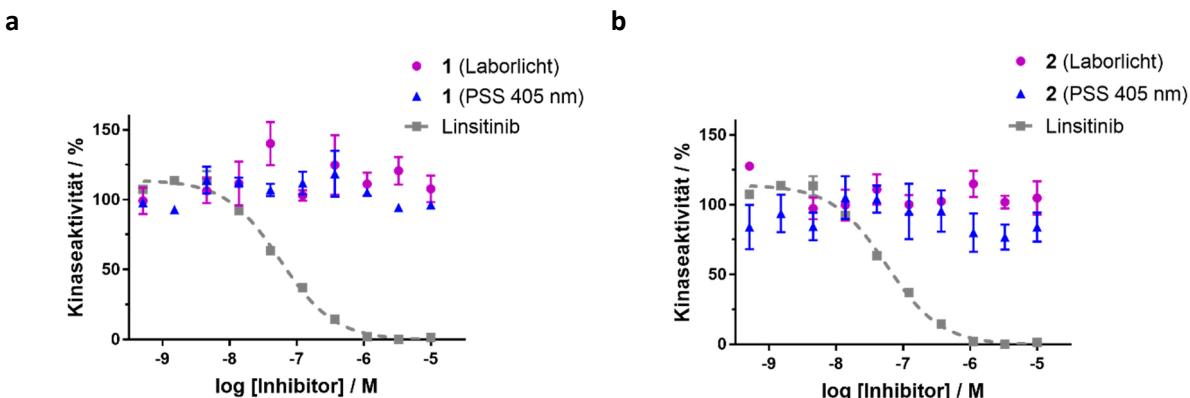
Nach erfolgreicher Assayetablierung wurden die beiden Diazocin-funktionalisierten Verbindungen **1** und **2** zunächst im Laborlicht und anschließend nach Bestrahlung mit 405 nm (PSS 405 nm) getestet. Dabei konnten sowohl auf BMX (Abbildung 3.7) als auch auf IGF-1R (Abbildung 3.8) bis zu Konzentrationen von 10 µM keine inhibitorischen Aktivitäten von **1** und **2** nachgewiesen werden, weder mit noch ohne Bestrahlung. Demnach konnten die *hits* aus dem ProQinase screening nicht

bestätigt werden, in den separaten Kinaseassays erwiesen sich BMX, IGF-1R und SRC somit als falsch positive *hits*.

Es ist bekannt, dass Verbindungen, die Azofunktionen enthalten als sogenannte *pan-assay interference compounds* (PAINS) agieren können. PAINS sind Substanzen, die sehr häufig und oftmals falsch positive *hits* in *high throughput screenings* (HTS) zeigen. Dies kann u.a. auf Bindungsinteraktionen durch die Bildung von Aggregaten, auf unspezifische Reaktionen mit den Proteinen oder auf Interferenzen mit dem Auslesungssignal zurückzuführen sein.<sup>[112, 113]</sup>



**Abbildung 3.7.** Dosis-Wirkungskurven der Diazocin-funktionalisierten Derivate **1** und **2** in einem *in vitro* BMX Kinaseassay, jeweils mit und ohne Bestrahlung. (a) **1** im Laborlicht (violett,  $IC_{50} > 10000$  nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} > 10000$  nM) im Vergleich zur Referenz BMX-IN-1 (grau,  $IC_{50} = 140$  nM,  $R^2 = 0.95$ ). (b) **2** im Laborlicht (violett,  $IC_{50} > 10000$  nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} > 10000$  nM) im Vergleich zur Referenz BMX-IN-1 (grau,  $IC_{50} = 140$  nM,  $R^2 = 0.95$ ). Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.



**Abbildung 3.8.** Dosis-Wirkungskurven der Diazocin-funktionalisierten Derivate **1** und **2** in einem *in vitro* IGF-1R Kinaseassay, jeweils mit und ohne Bestrahlung. (a) **1** im Laborlicht (violett,  $IC_{50} > 10000$  nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} > 10000$  nM) im Vergleich zur Referenz Linsitinib (grau,  $IC_{50} = 56.6$  nM,  $R^2 = 0.99$ ). (b) **2** im Laborlicht (violett,  $IC_{50} > 10000$  nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} > 10000$  nM) im Vergleich zur Referenz Linsitinib (grau,  $IC_{50} = 56.6$  nM,  $R^2 = 0.99$ ). Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.1.2.4 Virtuelles Screening

Zur target-Identifizierung des Diazocin-funktionalisierten Adenins **3** wurde von der Arbeitsgruppe Kirchmair (Universität Hamburg) ein virtuelles screening durchgeführt.<sup>[114]</sup> In diesem strukturbasierten alignment werden target-Vorhersagen anhand des Vergleichs der 3D-Struktur mit denen bekannter Liganden getroffen.

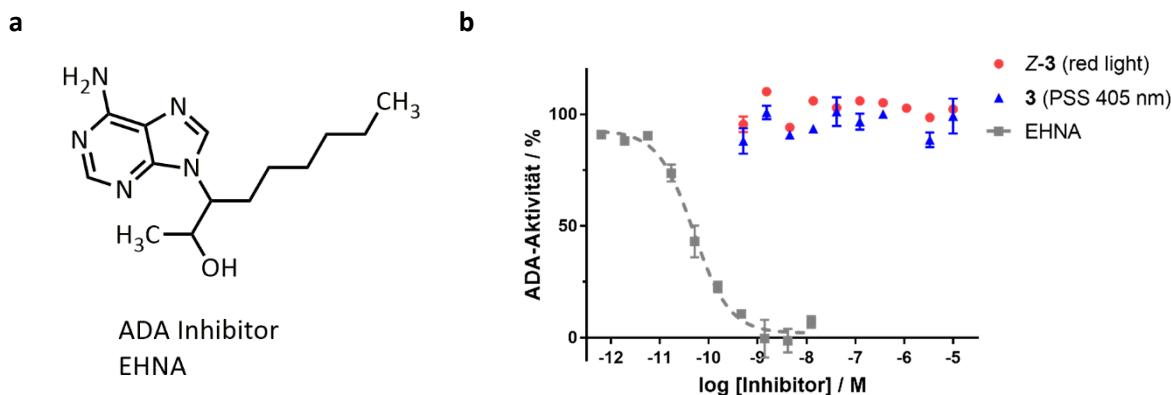
Dabei waren vor allem hits interessant, die für das E-Isomer, nicht jedoch für das Z-Isomer auftraten (Ergebnisse des screenings für beide Isomere siehe Anhang Abschnitt 9.2). Ein vielversprechender hit, der für das E-Isomer gefunden wurde, ist (2S,3R)-3-(6-Aminopurin-9-yl)-6-(2-methylphenyl)hexan-2-ol, ein Adenosin-Desaminase (ADA)-Inhibitor<sup>[115]</sup>. Entsprechend wurde ADA als ein mögliches target identifiziert. Zur Evaluierung dieses targets sollte folglich ein ADA Assay etabliert werden.

### 3.1.2.5 Adenosin-Desaminase Assay

Adenosin-Desaminase (ADA) katalysiert die Desaminierung von Adenosin und Desoxyadenosin zu Inosin bzw. Desoxyinosin. Somit spielt ADA eine wichtige Rolle im intrazellulären sowie extrazellulären Purinstoffwechsel. Neben seiner enzymatischen Funktion werden dem Protein verschiedene regulatorische Funktionen im immunologischen sowie neurologischen Bereich zugeordnet. ADA agiert als Kostimulator bei der Proliferation und Differenzierung von T-Zellen durch Interaktion mit dem Differenzierungscluster CD 26. Zudem kann ADA als allosterischer Modulator an Adenosinrezeptoren wirken, die insbesondere im neurologischen System von Bedeutung sind. Aufgrund des Ausübens mehrerer verschiedener Funktionen dieses einkettigen Proteins, kann die ADA per Definition den sogenannten moonlighting-Proteinen zugeordnet werden. Neben dem Zusammenhang mit unzähligen pathologischen Konditionen, wie beispielsweise kardiale Ischämie, Krebs und Alzheimer-Krankheit, ist insbesondere die Regulation der moonlighting-Funktionen von großem medizinischen Interesse.<sup>[116]</sup> Ein photoschaltbarer ADA-Inhibitor könnte hier möglicherweise als tool-Molekül zur Aufklärung beitragen.

Das Adenosine Deaminase (ADA1) Inhibitor Screening Kit (Colorimetric) der Firma BioVision, Inc. (Milpitas, CA, USA) wurde für die Testung des Diazocin-funktionalisierten Adenins **3** verwendet. In diesem Assay katalysiert die ADA die Desaminierung von Adenosin zu Inosin. In weiteren enzymatischen Schritten wird Inosin zur Harnsäure abgebaut. Diese kann photometrisch (OD 293 nm) vermessen werden. Als Referenzinhibitor beinhaltet das Kit erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenin (EHNA, siehe Abbildung 3.9 a), einen potenzen ADA-Inhibitor, von dessen Struktur auch der im virtuellen screening gefundene Inhibitor abgeleitet wurde<sup>[115]</sup>.

Für das Diazocin-funktionalisierte Adenin **3** konnte im Assay allerdings bis zu einer Konzentration von 10 µM keinerlei Inhibition der ADA nachgewiesen werden (Abbildung 3.9 b). Dies gilt sowohl für das unbestrahlte Z-Isomer (rot), als auch für das PSS nach Bestrahlung mit 405 nm (blau). Hingegen zeigte sich die Referenz EHNA mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 49.0 pM als hochpotent, was gegen eine fehlerhafte Durchführung des Assays spricht. Somit scheint es sich bei dem Diazocin-funktionalisiertes Adenin **3** nicht um einen ADA-Inhibitor zu handeln und der hit des virtuellen screenings konnte entsprechend devalidiert werden. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass das Diazocin im Vergleich zu der Alkyl- bzw. Aralkyl-Kette der Referenzinhibitoren sterisch deutlich anspruchsvoller und rigider ist.

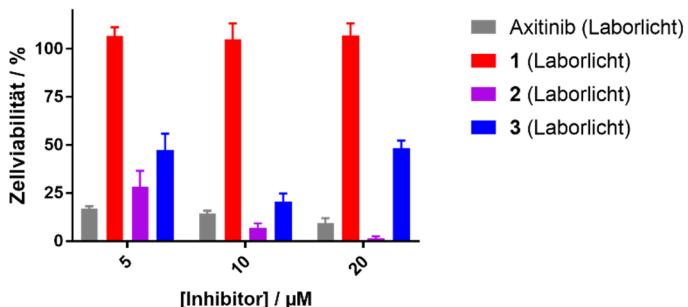


**Abbildung 3.9.** (a) Struktur des Adenosin-Desaminase (ADA) Inhibitors *erythro*-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenin (EHNA). (b) Diazocin-funktionalisiertes Adenin **3** in einem *in vitro* ADA Assay, mit und ohne Bestrahlung. Z-**3** im Dunkeln (rot,  $\text{IC}_{50} > 10000 \text{ nM}$ ) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $\text{IC}_{50} > 10000 \text{ nM}$ ) im Vergleich zur Referenz EHNA (grau,  $\text{IC}_{50} = 49.0 \text{ pM}$ ,  $R^2 = 0.98$ ). Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.1.2.6 Zellviabilitäts-/Proliferationsassays

Da bisher kein geeignetes *target* zum Nachweis einer photopharmakologischen Wirkung gefunden werden konnte, sollten die Diazocin-funktionalisierten Derivate **1-3** an Zellen getestet werden. Hierfür wurden *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) verwendet, mit denen zuvor ein photopharmakologischer Wirkunterschied von Axitinib bewiesen werden konnte.<sup>[69]</sup> Zunächst wurden Zellviabilitätsassays unter gewöhnlichem Laborlicht (in dem auch schon ein geringer Anteil *E*-Isomer vorliegt – 12 % für Diazocin **1**<sup>[91]</sup>) durchgeführt, um zu prüfen, ob generell eine Wirkung nachweisbar ist. Die Testsubstanzen **1-3** bzw. die Referenz Axitinib wurden 24 h nach Zellaussaat jeweils in den Konzentrationen 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  mit einer finalen DMSO-Konzentration von 1 % zu den Zellen gegeben und für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Resazurin-Assay. Der Resazurin-Assay beruht auf der Reduktion des Redoxfarbstoffs Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin durch metabolisch aktive Zellen. Das auszulesende Fluoreszenzsignal ist demnach proportional zur Anzahl lebender Zellen.<sup>[117]</sup>

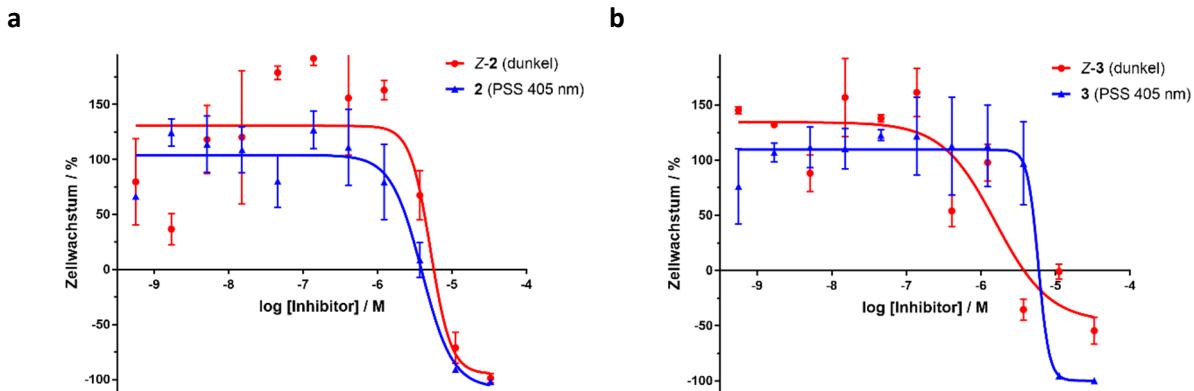
Die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays sind in Abbildung 3.10 als Balkendiagramm dargestellt. Verbindung **1** (rot) zeigt sich bis 20  $\mu\text{M}$  als komplett inaktiv auf HUVEC (Zellviabilität ca. 100 %). Dies steht in Übereinstimmung mit den Kinasetestungen an CK1 $\delta$ , p38 $\alpha$ , SRC, BMX und IGF-1R. Für die Derivate **2** und **3** (violett bzw. blau) ist hingegen eine deutliche Verringerung der Zellviabilität zu beobachten, die sich (mit Ausnahme von 20  $\mu\text{M}$  **3**) konzentrationsabhängig zeigt. Um die zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung sowie den Effekt einer Bestrahlung mit 405 nm genauer untersuchen zu können, wurden anschließend Proliferationsassay durchgeführt und entsprechende Dosis-Wirkungskurven der Verbindungen **2** und **3** mit und ohne Bestrahlung angefertigt.



**Abbildung 3.10.** HUVEC-Zellviabilitätsassay der Diazocin-funktionalisierte Derivate **1-3** im Vergleich zur Referenz Axitinib. Finale DMSO-Konzentration 1 %. Nach 48 h Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte die Auswertung der Zellviabilität mittels Resazurin-Assay. Handhabung der Testsubstanzen fand unter gewöhnlichem Laborlicht statt.

Der Proliferationsassay erfolgte analog zum Zellviabilitätsassay mit dem Zusatz, dass hier das Zellsignal zum Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanzen (24 h nach Aussaat) ermittelt wurde. Somit konnte nach weiteren 48 h das Zellwachstum betrachtet und zwischen zytostatischer und zytotoxischer Wirkung unterschieden werden. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde jeweils ein Konzentrationsbereich von 33  $\mu\text{M}$  - 0.56 nM in 1:3 Verdünnungen getestet. Die Verbindungen **2** und **3** wurden sowohl unbestrahlt im Dunkeln (*Z*-Isomere) als auch nach einmaliger Bestrahlung der DMSO-Lösungen mit 405 nm (PSS 405 nm) auf die Zellen gegeben.

Beide Diazocin-funktionalisierten Derivate **2** und **3** weisen im HUVEC-Proliferationsassay IC<sub>50</sub>-Werte im einstelligen mikromolaren Bereich auf (Abbildung 3.11), jedoch ist kein eindeutiger Wirksamkeitsunterschied zwischen bestrahlt und unbestrahlt erkennbar. Für das Diazocin-funktionalisierte Benzthiazol-Derivat **2** ist dieser fehlende photopharmakologische Wirkunterschied analog zur CK1 $\delta$ -Testung. Für das Diazocin-funktionalisierte Adenin **3** könnte die Wirkung auch auf eine unspezifische Toxizität zurückzuführen sein, da keine zytostatische sondern in hohen Konzentrationen direkt eine zytotoxische Wirkung auftritt. Allgemein ist es konzeptionell problematisch, dass auch die *Z*-Isomere (*Z*-**2** und *Z*-**3**) biologisch aktiv sind. Außerdem ist zu beachten, dass die Halbwertszeiten der *E*-Isomere eventuell nicht ausreichen, um nach 48 h Inkubation einen deutlichen Effekt zu sehen. Die Halbwertszeiten konnten nicht in wässriger Lösung bestimmt werden und zeigten sich zudem konzentrationsabhängig, sodass die tatsächliche Situation in den sehr geringen Konzentrationen im Zellassay bei 37 °C unklar ist.



**Abbildung 3.11.** Testung des Diazocin-funktionalisierten Benzthiazol-Derivats **2** sowie des Diazocin-funktionalisierten Adenins **3** in einem HUVEC-Proliferationsassay jeweils mit und ohne Bestrahlung. Zugabe der Testsubstanzen erfolgte 24 h nach Zellaussaat mit einer finalen DMSO-Konzentration von 1 %. Nach weiteren 48 h Inkubation erfolgte die Auswertung mittels Resazurin-Assay. (a) Z-**2** im Dunkeln (rot,  $IC_{50} = 5.2 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.75$ ) sowie nach einmaliger Bestrahlung der DMSO-Lösung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} = 4.0 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.92$ ). (b) Z-**3** im Dunkeln (rot,  $IC_{50} = 1.6 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.81$ ) sowie nach einmaliger Bestrahlung der DMSO-Lösung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.93$ ). Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

## 3.2 Photoschaltbare Azo- und Diazocin-funktionalisierte Derivate des VEGFR-2 Inhibitors Axitinib

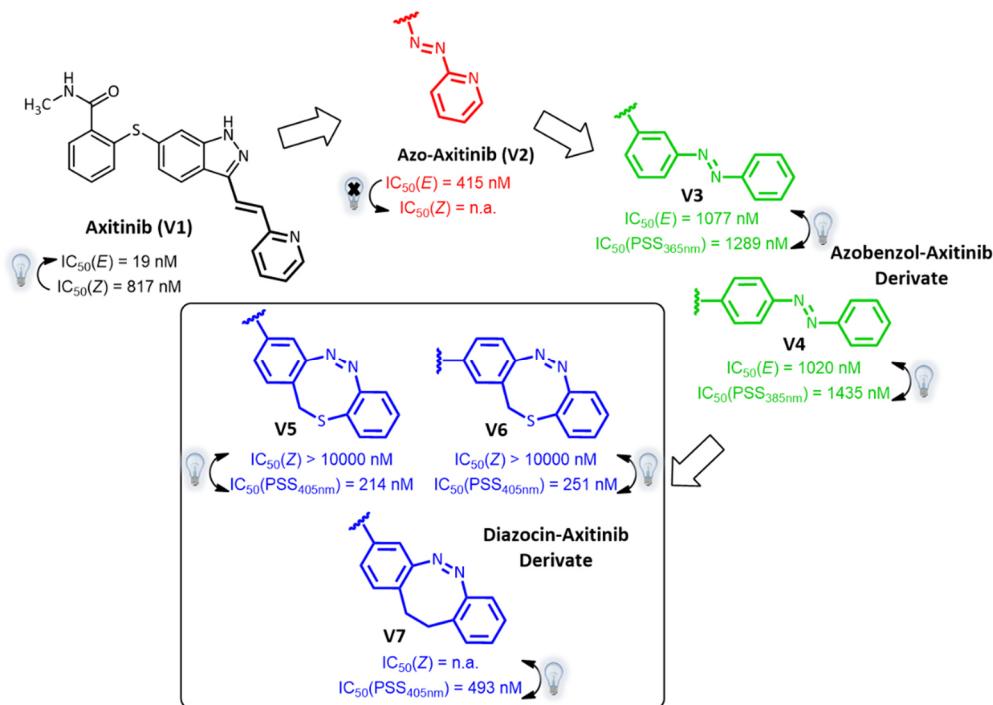
### 3.2.1 Zusammenfassung der Publikation

Verbindungsnummern **V1-V7** beziehen sich auf die Veröffentlichung:

Linda Heintze, Dorian Schmidt, Theo Rodat, Lydia Witt, Julia Ewert, Malte Kriegs, Rainer Herges und Christian Peifer

*Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(23), 8961

doi:10.3390/ijms21238961



**Abbildung 3.12.** Übersicht der synthetisierten photoschaltbaren Azo- und Diazocin-Derivate ausgehend vom VEGFR-2 Kinaseinhibitor Axitinib.  $IC_{50}$ -Werte wurden im VEGFR-2 Kinaseassay jeweils mit und ohne Bestrahlung gemessen. Angelehnt an<sup>[118]</sup>.

Ausgehend von dem zugelassenen VEGFR-2 Kinaseinhibitor Axitinib (**V1**) wurden verschiedene Azo- und Diazocin-Derivate synthetisiert und charakterisiert. Dabei wurde das Ziel eines reversibel photoschaltbaren Inhibitors mit deutlichem Aktivitätsunterschied beider Isomere verfolgt. Grundlegend dafür war die in Abschnitt 1.2.3 beschriebene vorangegangene Publikation<sup>[69]</sup>, in der unsere Arbeitsgruppe die Photoisomerisierung von Axitinib (**V1**) untersucht hat. Die Stilben-ähnliche Doppelbindung geht zwar in DMSO eine reversible *E/Z*-Isomerisierung ein, in wässriger Lösung ist die Photoschaltung hingegen nur unidirektional aufgrund einer zur Schaltung konkurrierenden [2+2]-Photocycloaddition, die zu einer irreversiblen Dimerbildung führt (vgl. Abbildung 1.12).<sup>[69]</sup> Folglich wurde im anschließenden Projekt das Konzept der „Azologisierung“ im weiteren Sinne angewendet und neben dem direkten Austausch der Kohlenstoffdoppelbindung durch eine Azo-Bindung auch Azobenzole und Diazocine an das Axitinib-Pharmakophor gekoppelt, um diese auf eine reversible Photoschaltung zu untersuchen.

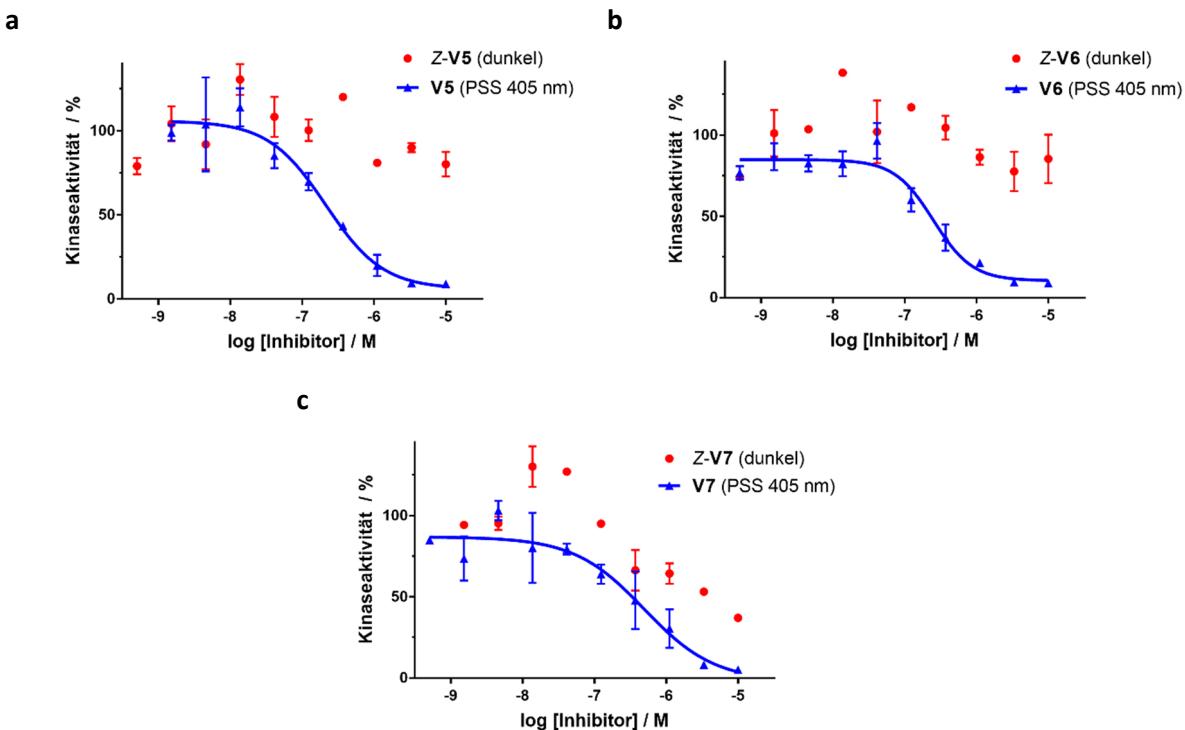
Nach erfolgreicher Synthese zeigte sich in der photochemischen Charakterisierung, dass Azo-Axitinib (**V2**) aufgrund einer Azo-Hydrazon Tautomerie einer sehr schnellen Rückisomerisierung zum thermodynamisch stabilen *E*-Isomer unterliegt und daher nicht als photoschaltbarer Inhibitor geeignet ist. Für die Azobenzol- und Diazocin-funktionalisierten Derivate konnte hingegen ein für die biologische Testung geeignetes reversibles Schaltverhalten in DMSO nachgewiesen werden. Die Azobenzole **V3** und **V4** weisen dabei nach Bestrahlung mit 365 nm bzw. 385 nm im PSS einen Anteil des *Z*-Isomeren von ≥ 80 % und Halbwertszeiten (bei 37 °C) von 43.1 h bzw. 5.7 h auf. Bei den Diazocinen **V5-V7** liegen nach Bestrahlung mit 405 nm im PSS 25 - 60 % *E*-Isomer vor und die Halbwertszeiten bei 37 °C betragen zwischen 1.5 h und 7.3 h. Insgesamt lässt sich sagen, dass die photochemischen Parameter der Azobenzol- und Diazocin-Derivate eine Testung im *in vitro* Kinaseassay erlauben. Jedoch war es nicht möglich, die photochemische Charakterisierung zusätzlich auch in wässriger Lösung durchzuführen, was der schlechten Löslichkeit der Verbindungen zu verschulden ist.

Im VEGFR-2 Kinaseassay konnte für die Azobenzol-Axitinib-Derivate **V3** und **V4** zwar eine moderate inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden, jedoch kein signifikanter Unterschied in der Aktivität zwischen beiden Isomeren. Dieses Ergebnis lässt sich auch mittels *molecular modelling* erklären, bei dem jeweils für beide Isomere ein plausibler Bindemodus in der VEGFR-2 Bindetasche gefunden wurde.

Im Vergleich dazu zeigen die Diazocin-Axitinib-Derivate **V5-V7** deutlich bessere photopharmakologische Wirkungen. Während die *Z*-Isomere der Schwefel-Diazocene (**V5** und **V6**) bis zu Konzentrationen von 10 µM komplett inaktiv sind, zeigt sich nach Bestrahlung mit 405 nm eine deutliche Inhibition der Kinaseaktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten von 214 nM bzw. 251 nM (Abbildung 3.13 a und b). Unter Annahme eines IC<sub>50</sub> für die *Z*-Isomere von weit über 10000 nM ergeben sich phototherapeutische Indices (Faktor Wirkunterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Inhibitor) von größer als 40. Dies stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber zuvor publizierten Azo-basierten *small molecule* Kinaseinhibitoren (phototherapeutischer Index: 1.6 - 11<sup>[70-72]</sup>) dar. Unter Berücksichtigung, dass nur 25 % bzw. 47 % zum aktiven *E*-Isomer geschaltet sind, spricht dies für eine hohe Potenz der Schwefel-Diazocene in *E*-Konfiguration.

Für das Ethylen-verbrückte Diazocin (**V7**) zeigt sich im Gegensatz zu den Schwefel-Diazocinen (**V5** und **V6**) auch eine geringe Aktivität des *Z*-Isomers (Abbildung 3.13 c, rote Kreise). Die Ursache dafür lässt sich im Winkel zwischen den Phenylringen der *Z*-Diazocene finden. Dieser fällt für das Kohlenstoff-Diazocin (85.8°) deutlich größer aus als für die Schwefel-Diazocene (76.1°). Mittels *induced-fit docking* konnte gezeigt werden, dass das flexible Protein in der Lage ist, sich dem vergleichsweise etwas weiter geöffneten *Z*-Isomer des Kohlenstoff-Diazocins (*Z*-**V7**) anzupassen.

Demnach erwiesen sich die Schwefel-Diazocin-Derivate (**V5** und **V6**) als am besten geeignet zur photoschaltbaren VEGFR-2 Inhibition und sind im Hinblick auf einen photopharmakologischen Wirkunterschied deutlich den Azobenzol-Derivaten (**V3** und **V4**) überlegen. Als nachteilig ist jedoch die schlechte Wasserlöslichkeit der Diazocin-Derivate (**V5-V7**) zu betrachten, so mussten die Kinaseassays mit einem Anteil von 10 % DMSO durchgeführt werden.



**Abbildung 3.13.** Dosis-Wirkungskurven der Schwefel-Diazocin-funktionalisierten Axitinib-Derivate **V5** und **V6** sowie des Kohlenstoff-Diazocin-funktionalisierten Axitinib-Derivates **V7** in einem *in vitro* VEGFR-2 Kinaseassay, jeweils mit und ohne Bestrahlung. Finale DMSO-Konzentration 10 %. (a) Z-**V5** im Dunkeln (rot,  $IC_{50} > 10000$  nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} = 214$  nM, Restaktivität (Plateau): 6 %,  $R^2 = 0.94$ ). (b) Z-**V6** im Dunkeln (rot,  $IC_{50} > 10000$  nM) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} = 251$  nM, Restaktivität (Plateau): 10 %,  $R^2 = 0.94$ ). (c) Z-**V7** im Dunkeln (rot, Restaktivität:  $\geq 37\%$ ) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (blau,  $IC_{50} = 493$  nM,  $R^2 = 0.89$ ). Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. Verändert nach<sup>[118]</sup>.

Zusätzlich zu den VEGFR-2 Kinaseassays wurde für das Schwefel-Diazocin **V5** ein PamGene Kinom-Proiling unter Verwendung von *human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC) Lysaten durchgeführt. Durch Analyse des Phosphorylierungsgrad von über 144 Peptidsubstraten konnte hierbei die Inaktivität des Z-Isomers (Z-**V5**) bestätigt werden. Hingegen konnte nur eine geringfügige inhibitorische Aktivität des Diazocins nach Bestrahlung mit 405 nm beobachtet werden. Auch in diesem Assay mussten 10 % DMSO eingesetzt werden, um eine Präzipitation der Testsubstanz zu verhindern.



Article

# Photoswitchable Azo- and Diazocine-Functionalized Derivatives of the VEGFR-2 Inhibitor Axitinib

Linda Heintze <sup>1,†</sup>, Dorian Schmidt <sup>1,†</sup>, Theo Rodat <sup>1</sup>, Lydia Witt <sup>1</sup>, Julia Ewert <sup>2</sup>, Malte Kriegs <sup>3</sup>, Rainer Herges <sup>2</sup> and Christian Peifer <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-University of Kiel, 24118 Kiel, Germany; lheintze@pharmazie.uni-kiel.de (L.H.); dschmidt@pharmazie.uni-kiel.de (D.S.); trodat@pharmazie.uni-kiel.de (T.R.); lwitt@pharmazie.uni-kiel.de (L.W.)

<sup>2</sup> Otto-Diels-Institute of Organic Chemistry, Christian-Albrechts-University of Kiel, 24098 Kiel, Germany; jewert@oc.uni-kiel.de (J.E.); rherges@oc.uni-kiel.de (R.H.)

<sup>3</sup> Laboratory of Radiobiology & Experimental Radiooncology and UCCH Kinomics Core Facility, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; m.kriegs@uke.de

\* Correspondence: cpeifer@pharmazie.uni-kiel.de; Tel.: +49-431-880-1137

† These authors contributed equally to this work.

Received: 28 September 2020; Accepted: 22 November 2020; Published: 25 November 2020



**Abstract:** In this study, we aimed at the application of the concept of photopharmacology to the approved vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 kinase inhibitor axitinib. In a previous study, we found out that the photoisomerization of axitinib's stilbene-like double bond is unidirectional in aqueous solution due to a competing irreversible [2+2]-cycloaddition. Therefore, we next set out to azologize axitinib by means of incorporating azobenzenes as well as diazocine moieties as photoresponsive elements. Conceptually, diazocines (bridged azobenzenes) show favorable photoswitching properties compared to standard azobenzenes because the thermodynamically stable Z-isomer usually is bioinactive, and back isomerization from the bioactive E-isomer occurs thermally. Here, we report on the development of different sulfur-diazocines and carbon-diazocines attached to the axitinib pharmacophore that allow switching the VEGFR-2 activity reversibly. For the best sulfur-diazocine, we could verify in a VEGFR-2 kinase assay that the Z-isomer is biologically inactive ( $IC_{50} >> 10,000$  nM), while significant VEGFR-2 inhibition can be observed after irradiation with blue light (405 nm), resulting in an  $IC_{50}$  value of 214 nM. In summary, we could successfully develop reversibly photoswitchable kinase inhibitors that exhibit more than 40-fold differences in biological activities upon irradiation. Moreover, we demonstrate the potential advantage of diazocine photoswitches over standard azobenzenes.

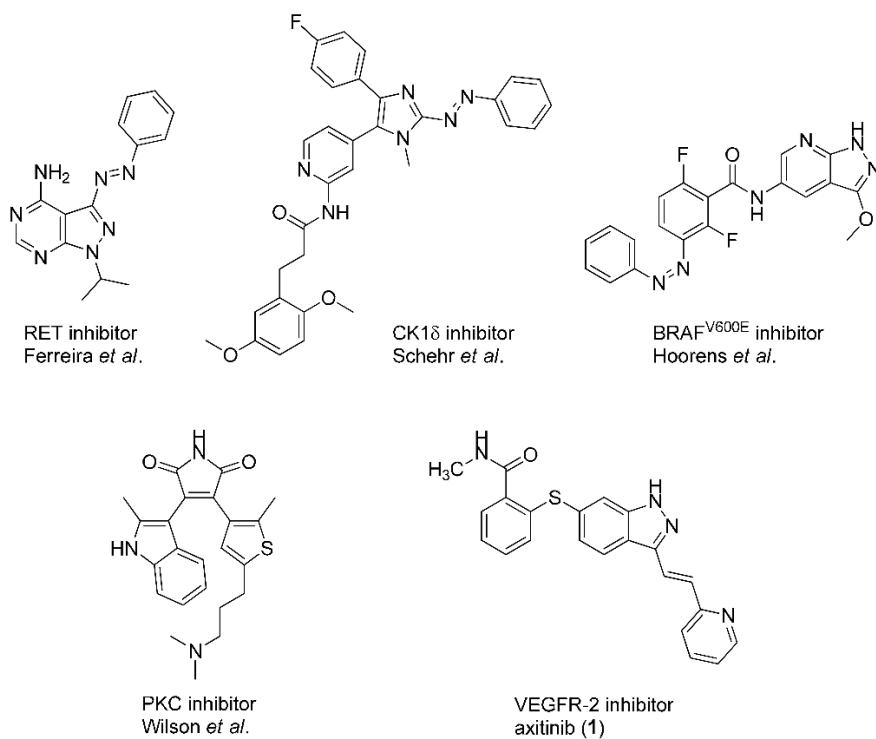
**Keywords:** photopharmacology; diazocine; azobenzene; photoswitchable kinase inhibitor; axitinib; VEGFR

## 1. Introduction

Photopharmacology aims at the spatial and temporal control of the pharmacological activity of a photoresponsive compound in biological settings by irradiation with light. Thereby, the disadvantages of classical pharmacotherapy such as severe side effects, emergence of resistances, and environmental contamination could be reduced [1,2]. For such a photopharmacological approach, photoresponsive groups have to be incorporated into a bioactive molecule. For example, light-induced E/Z isomerizations or ring-closing reactions can be used to switch the configurational/constitutional states of a drug. For reversible photoswitching, irradiation at two different wavelengths is necessary to allow a selective excitation of each state. For molecules with a metastable state, back-switching to the thermodynamically

stable form can also occur thermally. From a pharmacological perspective, one state should ideally be bioinactive, while the other state should be significantly more active. In addition, a high photoconversion from the inactive state to the biologically active state (and vice versa) is mandatory to achieve robust effects in biological assays. For basic in vitro applications, it is desirable to obtain at least a factor of 10, but rather a factor of 100, regarding the biological activity in the thermodynamic equilibrium and the photostationary state (PSS), respectively [3–5].

In addition to these stringent requirements, for in vivo applications, lead-like or even drug-like physicochemical parameters of a compound need to be met, which are typically optimized in medicinal chemistry projects. Against this background, we develop reversibly photoswitchable compounds on the basis of an established bioactive pharmacophore. Recently, our group reported on the photoswitching of the kinase inhibitor axitinib. Axitinib is inherently photoswitchable because it includes a photoisomerizable C=C double bond. Due to their essential role in cellular signaling, kinases have become interesting drug targets. So far, 55 small molecule kinase inhibitors have been approved by the FDA (Food and Drug Administration USA) [6,7]. An oral therapy involving kinase inhibitors may entail problems such as severe side effects or the development of resistances, which could be reduced by a more focused approach involving photoresponsive kinase inhibitors [8]. However, previously reported photoswitchable small molecule kinase inhibitors (Figure 1) exhibited only slight differences in the biological activity between the metastable, irradiated, and the thermodynamically stable state [9]. These examples include three azobenzene-based kinase inhibitors with a 1.6- to 11-fold difference in biological activities upon photoswitching [10–12] and a protein kinase C inhibitor based on a diarylethene-like maleimide showing a higher difference with a factor of 26, but no reversible switching in aqueous solutions (similar to axitinib (1), see next paragraph) [13].



**Figure 1.** Previously reported photoswitchable small molecule kinase inhibitors. Published azobenzene-based kinase inhibitors exhibited only slight differences (1.6- to 11-fold) in the biological activity before and after irradiation [10–12]. Larger differences but no reversible photoswitching in aqueous solutions was shown for a maleimide-based PKC (Protein Kinase C) inhibitor [13] as well as for the approved VEGFR-2 inhibitor axitinib [14].

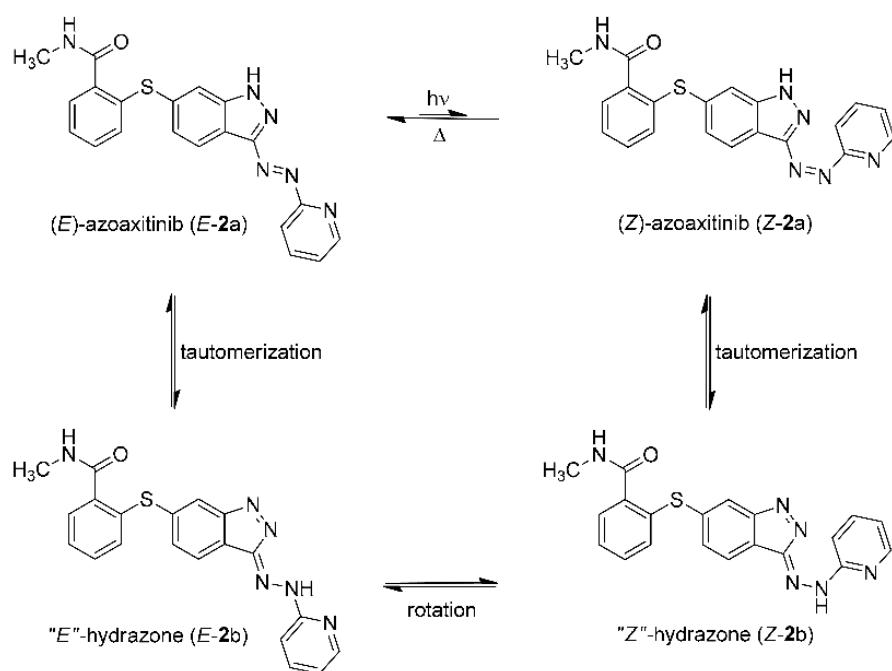
### Axitinib as Template for Photoresponsive Kinase Inhibitors

Axitinib (**1**, Figure 1) has been licensed for second-line therapy of renal cell carcinoma since 2012. It targets receptor tyrosine kinases, especially vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 1–3, which play important roles e.g., in angiogenesis and tumor growth [15]. In our previous study, we were able to photoswitch axitinib, which contains a stilbene-like double bond allowing for *E/Z* isomerization. For *Z*-axitinib and *E*-axitinib, a 43-fold difference in their respective biological activities could be demonstrated. Unfortunately, the photoswitching of axitinib (**1**) is not reversible in aqueous solution due to a competing [2+2]-cycloaddition yielding a bioinactive dimer. Hence, we concluded that the original stilbene-like system of axitinib (**1**) is unsuitable as a reversible photoswitch, at least in aqueous solution [14].

Therefore, in this study, we developed derivatives of axitinib (**1**) showing optimized photochemical features. The most obvious concept to avoid a [2+2]-photocycloaddition of axitinib (**1**) is to replace the C=C double bond by an azo group. This approach has been successfully applied to several other compounds before and was named “azologization” by the Trauner group [3,16]. Indeed, some azo-derivatives of axitinib have already been reported by Wei et al., about two years ago; however, there are no specific data on the photoswitching properties of these compounds [17].

We have also synthesized “azoaxitinib” (**2**, Scheme S1 [18,19] and Figure S9) previously and assumed that *E*-**2** should be biologically active analogous to *E*-axitinib (**1**), whereas the binding of *Z*-azoaxitinib (*Z*-**2**) to the VEGF receptor should be sterically hindered. However, after synthesis, we could not observe the photoswitching of *E*-azoaxitinib (*E*-**2**) by classical UV/VIS spectroscopy (Figure S2) and concluded that the *Z*-isomer *Z*-**2a** is in equilibrium with hydrazone **2b**, resulting in very fast thermal back isomerization (see Figure 2). This phenomenon has been reported for similar indole and imidazole compounds [20–22]. Interestingly, we observed a quite different behavior of isomerization of compound **12** during the synthesis of “azoaxitinib” (Scheme S1). Compound **12** appears to be stabilized as a *2H/Z* tautomer by an intramolecular H-bond. A similar tautomerism within the heterocycle was found for 3(5)-arylazopyrazoles [23]. However, this could not be observed for the final product **2**. Moreover, biological evaluation of the tautomer mixture of *E*-azoaxitinib (*E*-**2a/E**-**2b**) in a VEGFR-2 kinase assay revealed a decrease of the inhibitory activity ( $IC_{50} = 415$  nM, Figure S8) compared to *E*-axitinib ( $IC_{50} = 19$  nM) [14]. In fact, a simple azologization of axitinib is basically only partly useful, as azoaxitinib (**2**) is considered bioactive in the thermodynamically stable *E*-form. Hence, a photoresponsive approach would only allow a temporal reduction of the bioactivity of *E*-azoaxitinib to some degree.

From our point of view, a more expedient way to develop photoswitchable axitinib derivatives is the implementation of diazocines (bridged azobenzenes), which are thermodynamically stable in the (bioinactive) *Z*-form and show higher photoconversion rates compared to classical azobenzenes [24]. Up to now, there are only a few but successful examples of photoswitchable drugs containing diazocines as the switching unit. Diazocines were used to photoswitch peptide conformations [25], DNA hybridization [26], and potassium channel activities [27,28]. Based on these examples, we designed and synthesized diazocene-functionalized derivatives of axitinib. Conceptually, these photoresponsive compounds were designed to be inactive in the thermodynamically stable diazocene *Z*-configuration but bioactive in the metastable and photoinduced *E*-configuration.



**Figure 2.** Azo-hydrazone tautomerization of azoaxitinib (2). Due to the tautomeric equilibrium, the azo double bond is temporally turned into a free rotating single bond. This allows for fast relaxation from *Z*-isomer (Z-2a) to the thermodynamically stable *E*-isomer (E-2a) by rotation and subsequently back tautomerization.

## 2. Results

In order to develop reversibly photoswitchable kinase inhibitors derived from axitinib (1), we designed, synthesized, and characterized three different diazocine-functionalized derivatives (5–7) and compared them with the corresponding classical azobenzene derivatives (3 and 4). Table 1 gives an overview of the compounds and related results discussed below.

### 2.1. Molecular Modeling

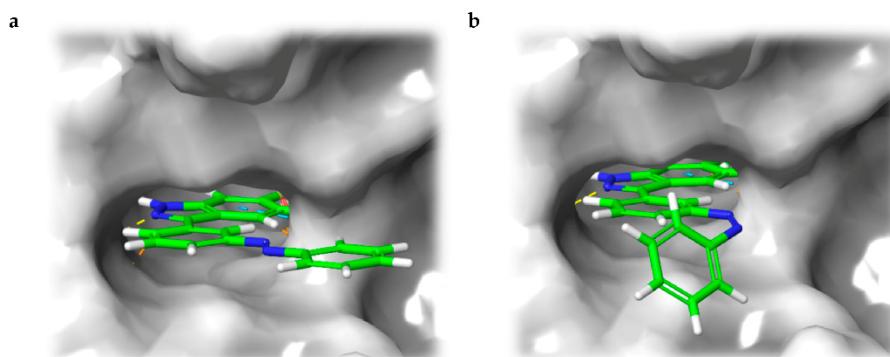
#### 2.1.1. Molecular Modeling of Azobenzene Derivatives 3 and 4 in the ATP Binding Pocket of VEGFR-2

Instead of connecting the azo group directly to the indazole scaffold of axitinib as in compound 2, we appended an azobenzene moiety to the pharmacophore in order to prevent the above described azo-hydrazone tautomerization. Thereby, the azobenzene moiety was either linked in the *meta*- or *para*-position of the azo-group (compounds 3 and 4, Table 1). Prior to synthesis, molecular modeling studies were performed for both azobenzene derivatives 3 and 4 within the binding pocket of VEGFR-2 (pdb: 4AG8) [29]. For each configuration, that is to say for the *E*-isomers as well as for the *Z*-isomers, reasonable binding modes were found. Figure 3 shows the binding modes of *meta*-azobenzene-axitinib (3), which is representative for both azobenzene derivatives. Calculated Glide docking scores [30–32] as an assessment of the binding affinities are also similar for both isomers respectively (*E*-3: −13.9, *Z*-3: −14.0; *E*-4: −13.7, *Z*-4: −13.8). These modeling results suggested that photoswitching will probably not significantly affect the biological activities of both isomers.

**Table 1.** Summary of the synthesized axitinib derivatives and their photochemical and biological characterization.  $\lambda_{\text{exc}}$ : irradiation wavelength, PSS: photostationary state,  $t_{1/2}$ : half-life of the metastable form.

| # | Residue (R) | $\lambda_{\text{exc}}$ (nm) | PSS (E/Z%),<br>DMSO (NMR)  | $t_{1/2}$ (h), 37 °C,<br>DMSO<br>(UV/VIS) | $\text{IC}_{50}$ VEGFR-2 (nM)     |
|---|-------------|-----------------------------|----------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 |             | 385 (Z→E)<br>365 (E→Z)      | 88/12 (Z→E)<br>51/49 (E→Z) | >>12 *                                    | E: 19<br>Z: 817<br>PSS 385 nm: 29 |
| 2 |             | n/a                         | n/a                        | n/a                                       | E: 415                            |
| 3 |             | 365                         | 17/83                      | 43.1                                      | E: 1077 **<br>PSS 365 nm: 1289    |
| 4 |             | 385                         | 20/80                      | 5.7                                       | E: 1020 **<br>PSS 385 nm: 1435    |
| 5 |             | 405                         | 47/53                      | 7.3                                       | Z: >10,000<br>PSS 405 nm: 214     |
| 6 |             | 405                         | 25/75                      | 3.7                                       | Z: >10,000<br>PSS 405 nm: 251     |
| 7 |             | 405                         | 60/40                      | 1.5                                       | Z: n/a **<br>PSS 405 nm: 493      |

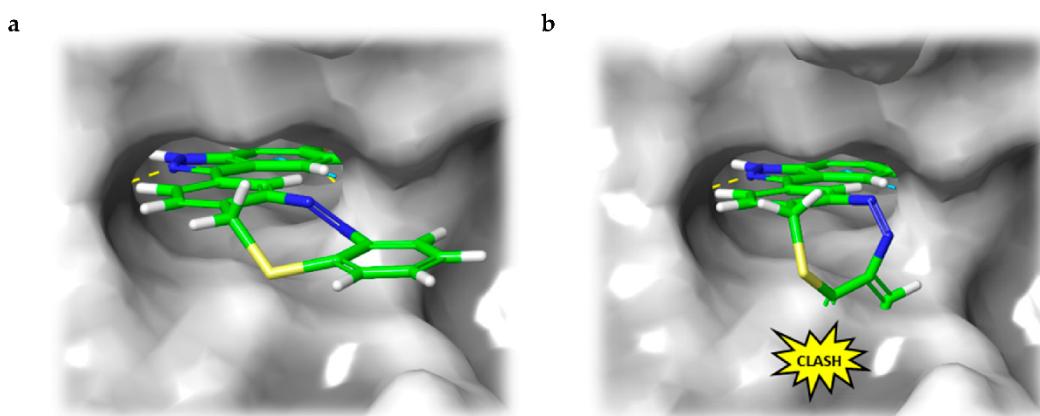
\* No thermal back isomerization could be observed over 12 h. \*\* residual kinase activity  $\geq 33\%$ .



**Figure 3.** Calculated binding mode of *meta*-linked azobenzene-axitinib (3) in vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 (pdb: 4AG8) [29]. Protein surface displayed in gray. For the azobenzene, a plausible binding mode is found in *E*-configuration (a), Glide docking score:  $-13.9$  as well as in *Z*-configuration (b), Glide docking score:  $-14.0$ .

### 2.1.2. Molecular Modeling of Diazocine Derivatives 5–7 in the ATP Binding Pocket of VEGFR-2

In the light of the above-mentioned modeling results, we further attached a photoresponsive element to the pharmacophore of axitinib that causes a more distinct structural change of the molecule geometry upon irradiation. In this context, diazocines are well suited because the thermodynamically stable Z-isomer is considered to be rather biologically inactive due to steric hindrance of the angled Z-structure at the receptor binding pocket (Figure 4). Upon isomerization toward the more leveled E-isomer, a major change in the molecule's total structure is caused. The resulting more planar E-isomer should be able to bind to the target protein. Furthermore, diazocines were described to have suitable switching properties with high switching efficiencies and red shifted excitation wavelengths compared to the azobenzenes [24,33]. For these reasons, we designed and modeled two sulfur-diazocine-functionalized axitinib derivatives linked in *meta* (5) or *para* (6) of the azo-group. Furthermore, we investigated an ethylene-bridged diazocine (7) as a carbon-analogue compound, which usually show slightly higher conversion rates compared to the sulfur-diazocines.



**Figure 4.** (a) Calculated binding mode of S-diazocine-functionalized axitinib (5) in *E*-configuration (*chair*) to VEGFR-2 (pdb: 4AG8) [29]. Shown is the *meta*-linked derivative representative for both sulfur-diazocine compounds. (b) Superposition of Z-5 and VEGFR-2 binding pocket. While retaining the hydrogen bonds of the pharmacophore, the Z-diazocine moiety clashes with the protein. Protein surface displayed in gray. Yellow dotted lines: hydrogen bonds; light blue dotted lines:  $\pi$ - $\pi$  interactions.

In line with the above-mentioned concept, docking analyses of the diazocine compounds in the ATP binding pocket of VEGFR-2 (pdb: 4AG8) [29] revealed plausible binding modes for the stretched *E*-isomers of all three derivatives (5–7). As expected, no compelling binding modes for the Z-isomers could be found. Figure 4 displays the pose of the *meta*-substituted sulfur-diazocine (5) in the binding pocket of VEGFR-2, which is representative for both sulfur-diazocine derivatives. Figure 4a shows the calculated binding mode of the *E*-isomer, 4b illustrates the steric clash of the Z-isomer in a superposition with the protein (the corresponding target interactions of carbon-diazocine (7) to key residues of the binding site are shown in Figure S1).

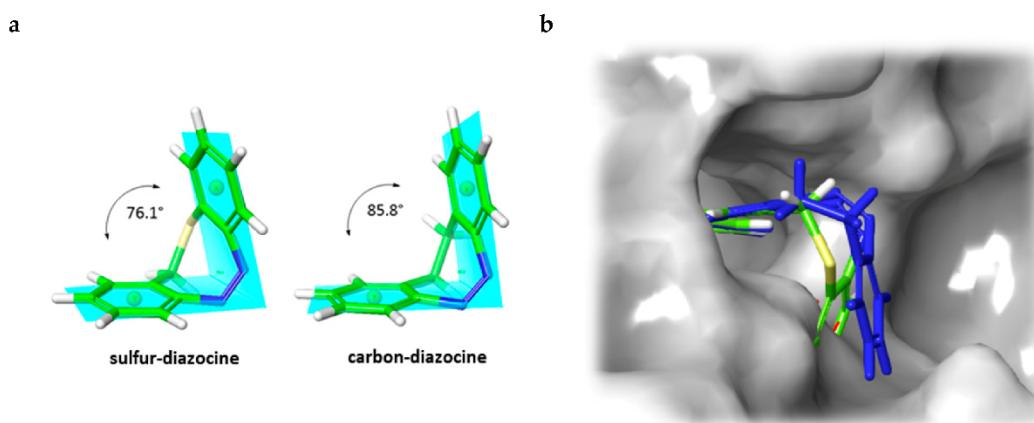
In addition to the docking experiments in which the receptor binding pocket grid is considered to be rigid, we also performed induced-fit docking calculations [34] for compounds 5–7. In the induced-fit model, all amino acid residues in a distance of 5 Å to the ligand are set to be conformationally flexible. Table 2 gives an overview of the docking scores obtained for both rigid Glide docking and induced-fit docking. Interestingly, in the induced-fit mode, a plausible binding pose is also found for the Z-isomer of the carbon-diazocine (7), but not for the sulfur-diazocines 5 and 6. This finding could be explained by the fact that the angle between both phenyl rings of the Z-diazocine configuration is significantly larger for the carbon-diazocine ( $85.8^\circ$ ) compared to the sulfur-diazocine ( $76.1^\circ$ ). Actually, the tighter

sulfur-diazocines clash even with the flexible protein backbone, while the binding pocket residues are able to adapt to the larger carbon-diazocene ligand (Figure 5).

**Table 2.** Overview of the docking results of diazocene-functionalized axitinib derivatives. Calculated *docking scores* from Glide and induced-fit docking are given for *E*- and *Z*-isomer, respectively. As a necessary condition for an allowed binding mode, all four hydrogen bonds of the axitinib pharmacophore were defined (H-bond constraints). For the induced-fit docking, all amino acids in a distance of 5 Å were considered flexible.

| # | Residue (R) | Glide Score                   |                  | Induced-Fit Score             |                  |
|---|-------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
|   |             | <i>E</i> -Isomer <sup>a</sup> | <i>Z</i> -Isomer | <i>E</i> -Isomer <sup>a</sup> | <i>Z</i> -Isomer |
| 5 |             | -14.1                         | X                | -16.2                         | X                |
| 6 |             | -14.0                         | X                | -15.5                         | X                |
| 7 |             | -14.3                         | X                | -16.4                         | -16.0            |

<sup>a</sup> chair conformation; X: No plausible binding mode was found.



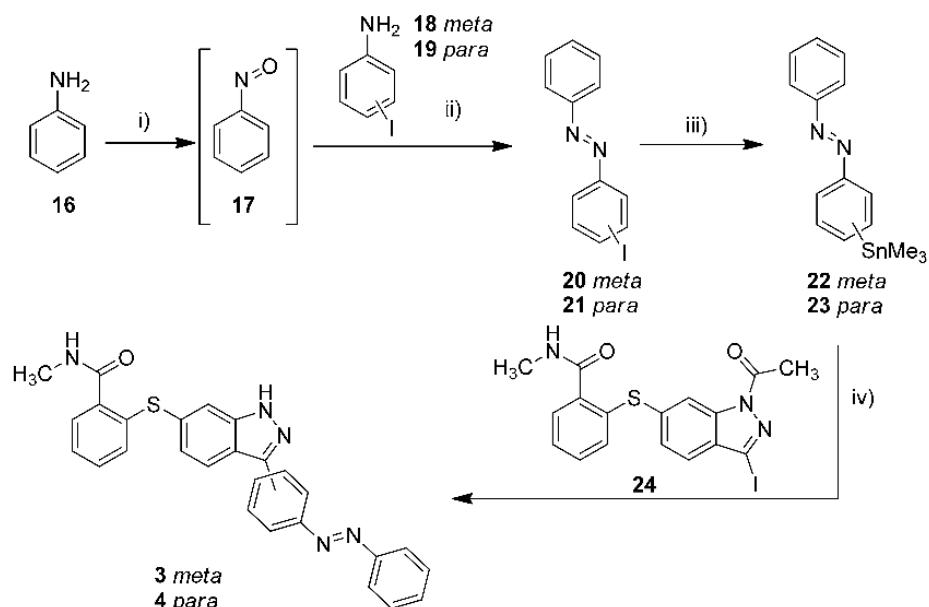
**Figure 5.** (a) B3LYP/631-G\*-optimized structures of sulfur- and carbon-bridged diazocines. The planes opened up by the phenyl rings build an angle of 76.1° and 85.8°, respectively. (b) Induced-fit docking mode of carbon-bridged diazocene Z-7 (blue) in the binding pocket of VEGFR-2 (PDB: 4AG8) [29] superimposed with the corresponding sulfur-diazocene Z-5 (green). The superposition of sulfur-diazocene Z-5 with the adapted protein of the induced-fit calculation results in a steric clash. The protein surface is displayed in gray.

## 2.2. Synthesis

For the synthesis of the diazocene-functionalized axitinib derivatives 5–7, we aimed at the development of a convergent synthetic route due to the typically low reaction yields of diazocines [24,33].

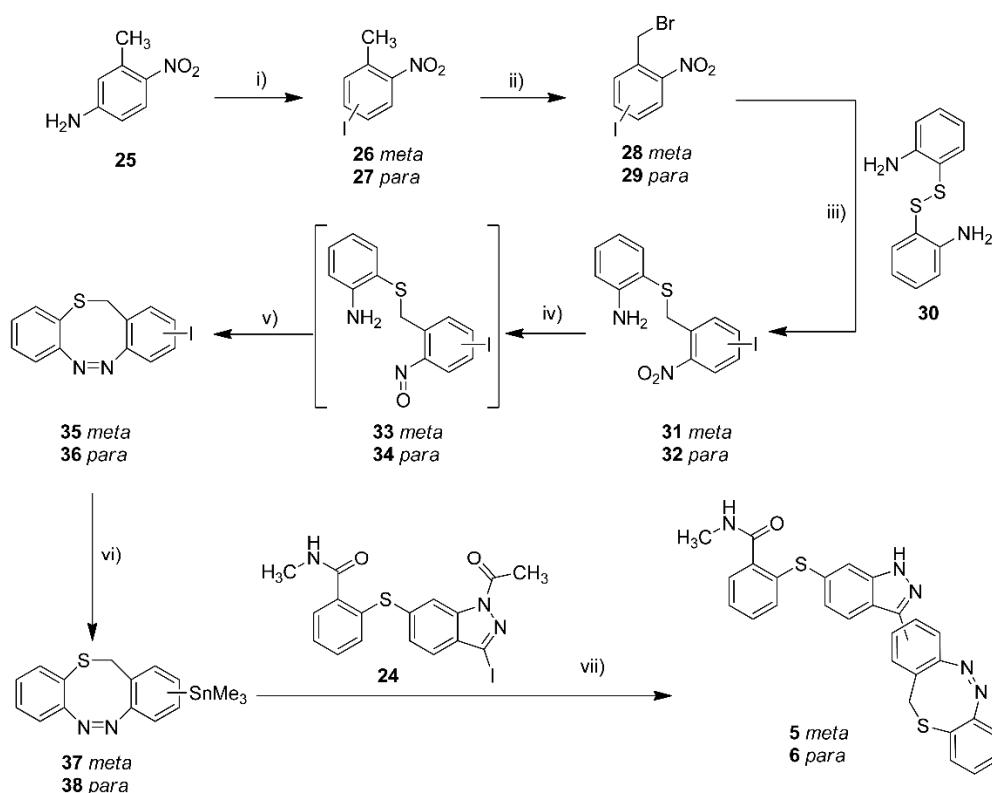
For this purpose, we used acetyl-protected indazole **24** as common building block and tried to cross-couple metalated diazocines and azobenzenes in the final reaction step. Building block **24** is also used in the industrial synthesis of axitinib (**1**) and has been successfully deployed as an electrophile in cross-couplings [35]. The synthesis of building block **24** was performed according to published procedures using methyl 2-sulfanylbenzoate (**14**) and 6-aminoindazole (**45**) as starting materials (Scheme S2) [35–37].

The metalation of azo compounds is generally challenging due to their susceptibility to reduction, e.g., the use of lithium, zinc, or magnesium bases often leads to the formation of the corresponding hydrazine compounds [38,39]. For this reason, we used a stannylation protocol reported to be suitable for azobenzenes [40]. As a start, we tested this procedure for the synthesis of compounds **3** and **4** (Scheme 1). First, 3-iodoaniline (**18**) or 4-iodoaniline (**19**) respectively were converted with nitrosobenzene in a Baeyer–Mills reaction to form iodinated azobenzenes **20** and **21** [41]. The stannylation was finally realized in a microwave reaction using hexamethylditin and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  in dry toluene. The Stille reaction of building block **24** and stannylated azobenzenes **22/23** finally succeeded in DMF at 120 °C and the use of  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  as catalyst [40]. Under these conditions, the acetyl protecting group is cleaved simultaneously.



**Scheme 1.** Synthesis of azobenzene-functionalized axitinib derivatives **3** and **4**. Reaction conditions: (i) aq.  $\text{KHSO}_3$  solution (Oxone®), DCM, RT, 6 h; (ii) glacial acetic acid, RT, 24 h, *meta*: 37%, *para*: 64%; (iii)  $\text{Sn}_2\text{Me}_6$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , dry toluene, 100 °C, microwave, 3 h, *meta*: 86%, *para*: 62%; (iv)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , DMF, 120 °C, 24 h, *meta*: 52%, *para*: 32%. (*meta/para* position of the azo group).

With the standard azobenzene derivatives **3** and **4** in hand, we tried to adopt the stannylation and Stille reaction for the synthesis of the diazocine-functionalized derivatives **5–7**. The required halogenated diazocines **35** and **43** were synthesized using two different synthetic routes (Scheme 2 vs. Scheme 3). The sulfur–diazocines **35** and **36** were synthesized according to the procedure reported by Schehr using an intramolecular Baeyer–Mills reaction [42]. For the metalation of the diazocines, we slightly modified the stannylation protocol described above. Compared to the original procedure of Strueben et al., the temperature was reduced from 150 to 100 °C, and the reaction time was extended from 15 min to 4 h. The stannylated diazocines are relatively stable and were obtained in moderate yields after purification on silica gel.

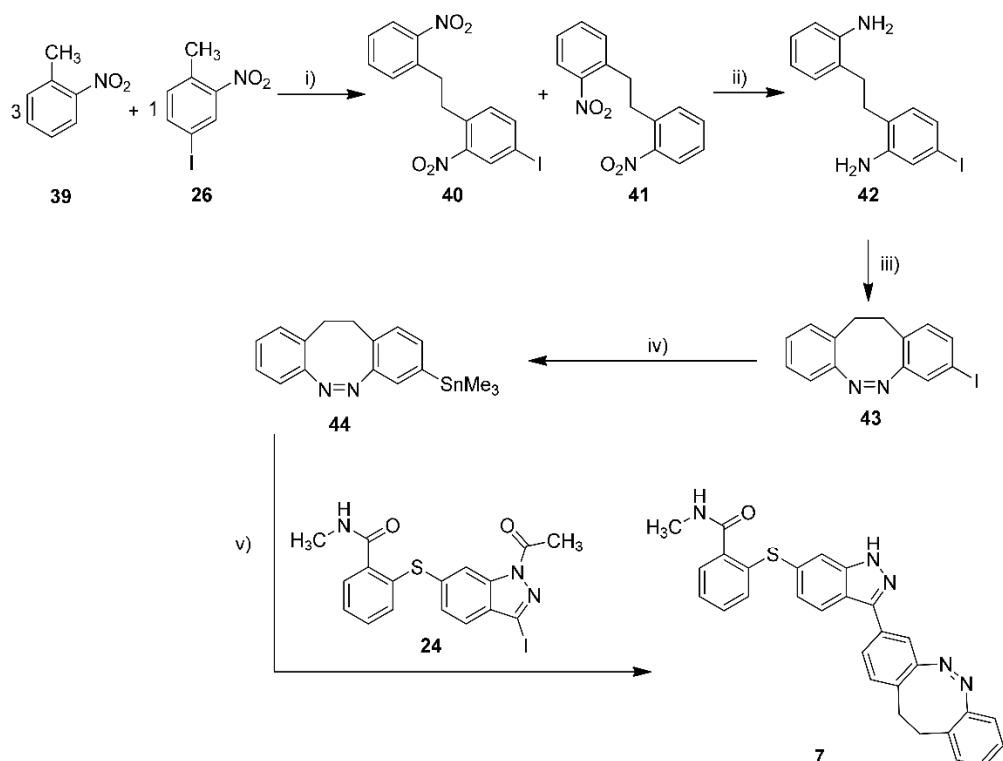


**Scheme 2.** Synthesis of metallated sulfur-diazocines **37/38** and subsequent Stille coupling. Reaction conditions: (i) 1. NaNO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, water, 0 °C, 30 min, 2. KI, RT, 16 h; (ii) NBS, DBPO, CCl<sub>4</sub>, reflux, 16–63 h, *meta*: 30%, *para*: 19%; (iii) 1. 2,2'-disulfanediyldianiline (**30**), NaBH<sub>4</sub>, THF, reflux, 1.5 h, 2. **28/29**, 40 °C, 3 h, *meta*: 56%, *para*: 67%; (iv) 1. Zinc, NH<sub>4</sub>Cl, water/ethanol, 60 °C, 30 min, 2. FeCl<sub>3</sub>, water/ethanol, 0 °C RT, 30 min; (v) glacial acetic acid, RT, 16 h, *meta*: 18%, *para*: 26%; (vi) Sn<sub>2</sub>Me<sub>6</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, dry toluene, 100 °C, microwave, 4 h, *meta*: 71%, *para*: 60%; (vii) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DMF, 120 °C, 24 h, *meta*: 16%, *para*: 17%. (*meta/para* position of nitro or azo group respectively).

The synthesis of the mono-iodinated carbon-diazocine **43** turned out to be more complicated compared to the corresponding sulfur-diazocines **35** and **36** since the ethylene bridge is formed radically [43,44]. The radical reaction mechanism leads to a mixture of unsubstituted product **41**, mono-substituted product **40** and di-substituted product (not shown), which are extremely difficult to separate. Hence, the product mixture was used in the next step without purification. The reduction to the corresponding amino compounds (i.e., **42**) succeeded with tin(II) chloride in refluxing ethyl acetate, whereas a standard hydrogenation using palladium catalyst resulted in dehalogenation. For the ring closure to the diazocine **43**, we used *meta*-chloroperoxybenzoic acid in acetic acid as reported by the Trauner group recently [45]. The stannylation of diazocine **44** and subsequent cross-coupling with building block **24** proceeded as described above.

### 2.3. Photochemical Characterization of the Photoswitchable Compounds 3–7

In order to determine the isomer ratios of the PSS as well as to identify the optimal excitation wavelengths for the *E/Z* isomerizations, compounds 3–7 were characterized by UV/VIS and NMR spectroscopy. Due to their poor water solubility along with the low molar absorption coefficients of diazoines, all compounds were initially analyzed in DMSO.



**Scheme 3.** Synthesis of metallated carbon-diazocine **44** and subsequent Stille coupling. Reaction conditions: (i) 1. KOtBu, THF, 0 °C, 2 min, 2. Br<sub>2</sub>, 0 °C, 5 min; (ii) SnCl<sub>2</sub>, ethyl acetate, reflux, 4 h, 26%; (iii) *m*CPBA, acetic acid, RT, 6 h, 51%; (iv) Sn<sub>2</sub>Me<sub>6</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, dry toluene, 100 °C, microwave, 4 h, 51%; (v) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DMF, 120 °C, 24 h, 31%.

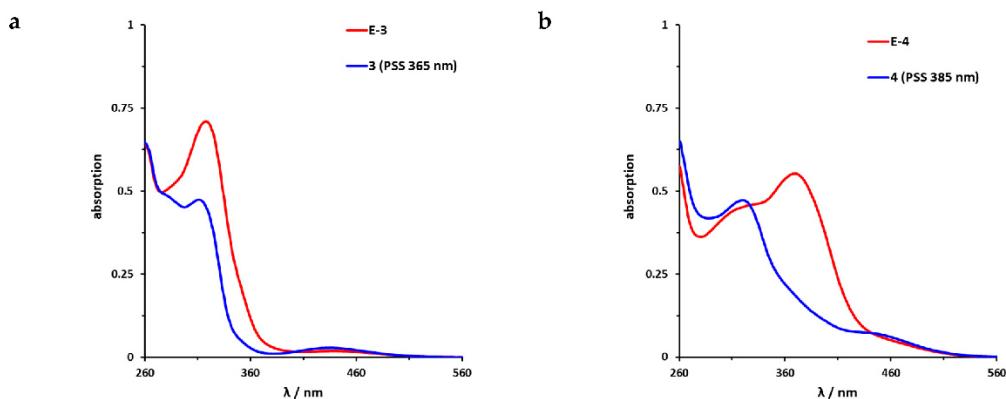
### 2.3.1. Photochemical Characterization of Azobenzene Derivatives **3** and **4**

The UV/VIS spectra of the azobenzene-functionalized axitinib derivatives **3** and **4** show absorption spectra that are typical for azobenzenes (Figure 6) [16,46]. For the *meta*-linked derivative **3** (Figure 6a), a maximum shift of the PSS toward the Z-isomer can be achieved by irradiation at 365 nm. By NMR spectroscopy, a Z-isomer content of 83% was determined in the PSS. In comparison, the *para*-linked derivative **4** (Figure 6b) can be switched at 385 nm and for the resulting PSS, an E/Z ratio 20/80 was measured. Back switching to the E-isomers *E*-**3** and *E*-**4** is possible by irradiation at 435 nm (**3**) or 470 nm (**4**), respectively. In both cases, the photoconversion is almost quantitative (for reasons of clarity not shown in Figure 6). Furthermore, half-lives of the azobenzene derivatives were determined by UV/VIS spectroscopy at 37 °C in DMSO. For the *meta*-linked compound **3**, a half-life of 43.1 h was obtained after fitting the experimental data, while *para*-linked derivative **4** possesses a much shorter half-life of 5.7 h (Figures S3 and S4).

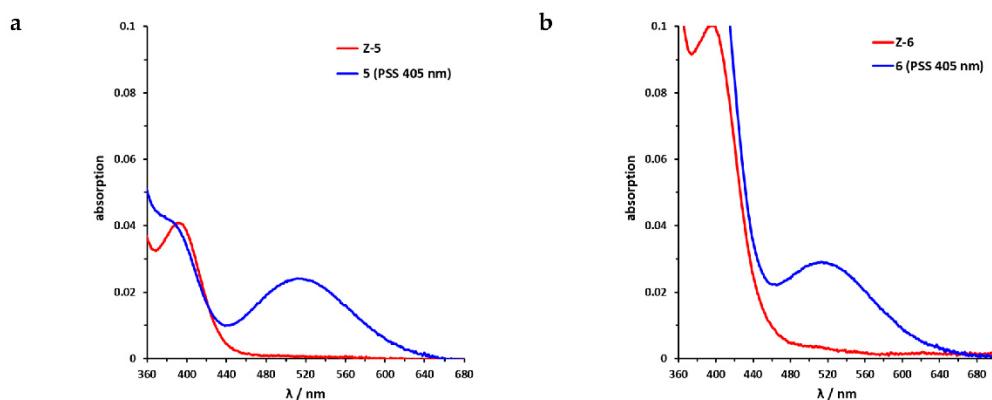
### 2.3.2. Photochemical Characterization of Diazocine Derivatives 5–7

Sulfur-diazocine **5** (linked in *meta*-position of the azo bond) shows a typical switching behavior for diazocines (Figure 7a) [24,33]. After irradiation at 405 nm, a PSS with an *E* content of 47% can be achieved. For *para*-linked derivative **6**, only 25% of the *E*-isomer can be enriched by irradiation at 405 nm. This low photoconversion can be explained by the poorly separated absorption bands (Figure 7b) that may originate from an electronic coupling of the diazocine scaffold with the  $\pi$ -system of the indazole. In contrast, the ethylene-bridged diazocine **7** shows a decent photoconversion leading to 60% of the *E*-isomer in the PSS (Figure 8). This trend correlates with the associated unsubstituted diazocines, where a slightly better switching efficiency is also observed for the carbon-based system.

However, for all three derivatives **5–7**, the determined photoconversions are significantly lower than for the corresponding unsubstituted diazocines, which can be switched to 70% (sulfur-diazocine) and 90% (carbon-diazocine) of the *E*-isomer, respectively [24,33].

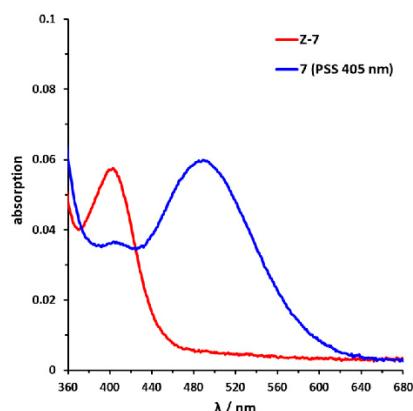


**Figure 6.** UV/VIS spectra of azobenzene-functionalized axitinib derivatives **3** and **4**. (a) UV/VIS-spectrum of *meta*-linked *E*-**3** (red) in DMSO (20  $\mu$ M) as well as photostationary states (PSS) after irradiation at 365 nm (blue). (b) UV/VIS-spectrum of *para*-linked *E*-**4** (red) in DMSO (20  $\mu$ M) as well as PSS after irradiation at 385 nm (blue). Spectra after irradiation at 435 nm (**3**) and 470 nm (**4**) respectively are not shown for reasons of clarity. These spectra overlap with the spectra of the pure *E*-Isomers.



**Figure 7.** UV/VIS spectra of S-diazocine-functionalized axitinib derivatives. (a) Enlarged view of  $n\pi^*$  band of *meta*-linked **Z-5** (red) in DMSO (100  $\mu$ M) as well as photostationary states (PSS) after irradiation at 405 nm (blue). (b) Enlarged view of  $n\pi^*$  band of *para*-linked **Z-6** (red) in DMSO (100  $\mu$ M) as well as PSS after irradiation at 405 nm (blue). Spectra of PSS after irradiation at 530 nm completely overlap with the spectrum of the pure *Z*-isomers (not shown for reasons of clarity).

By irradiation at 530 nm, the diazocine-based compounds **5–7** can be switched back quantitatively to the *Z*-isomer. Since the associated spectra completely overlap with the spectra of the pure *Z*-isomers, they are not shown for reasons of clarity. To check the reversibility of the photoswitching, long-term stability measurements with 20 switching cycles were performed. For this purpose, the compounds were irradiated alternately for 20 s at 405 nm and 530 nm, respectively. After each irradiation, an UV/VIS spectrum was recorded. After 20 switching cycles, none of the three derivatives **5–7** showed significant photofatigue.



**Figure 8.** UV/VIS spectrum of C-diazocine-functionalized axitinib derivative (**7**). Enlarged view of  $n\pi^*$  band of *meta*-linked Z-7 (red) in DMSO (100  $\mu$ M) as well as photostationary states (PSS) after irradiation at 405 nm (blue). Spectrum of PSS after irradiation at 530 nm is identical to the spectrum of the pure Z-isomer (not shown for reasons of clarity).

Half-lives at 37 °C in DMSO were determined as 7.3 h for the *meta*-linked sulfur-diazocine **5** and 3.7 h for the *para*-linked S-diazocine **6**, whereas carbon-diazocine **7** exhibits a comparatively short half-life of 1.5 h (Figures S5–S7). In summary, all compounds showed sufficient half-lives for in vitro kinase testing.

It is noteworthy that the recording of UV/VIS-spectra in aqueous solution failed for the diazocine-functionalized axitinib derivatives **5–7** due to compound precipitation above the minimum detection limit.

#### 2.4. Biological Evaluation

##### 2.4.1. VEGFR-2 Kinase Assays

In a next step, the inhibitory activity of all photoresponsive axitinib derivatives against VEGFR-2 was tested using a luminescence-based ADP-Glo™ kinase assay under controlled light conditions as reported before [14].

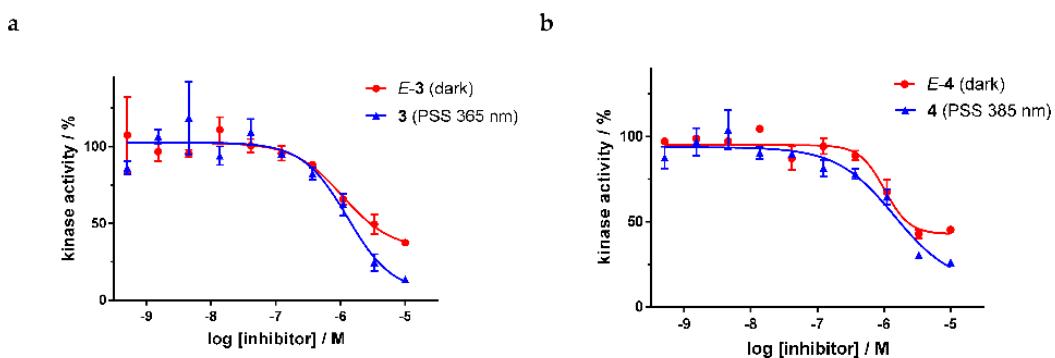
##### VEGFR-2 Kinase Assays of Azobenzene Derivatives **3** and **4**

Dose–response curves of derivatives **3** and **4** (Figure 9) show the moderate potency of both irradiated and unirradiated compounds with IC<sub>50</sub> values around 1000 nM. Overall, no distinct difference in the biological activity of both azobenzene derivatives before and after irradiation could be demonstrated. These findings are consistent with the modeling results, where plausible binding modes were found for both isomers. However, for the two highest concentrations of both azobenzenes, the kinase inhibition seems to be slightly stronger after irradiation (PSS 365 nm and 385 nm respectively) than before irradiation. If one considers the high level of the plateaus in the dose–response curves of the *E*-isomers, this effect might be caused by a limiting solubility of the *E*-isomer compared to the Z-isomer.

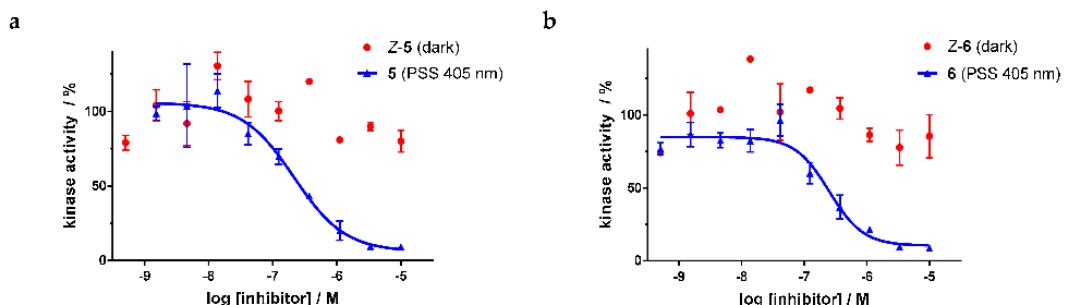
##### VEGFR-2 Kinase Assay of Diazocine Derivatives **5–7**

For the sulfur-diazocine compounds, the Z-isomers (illustrated in red) do not have any impact on VEGFR-2 activity up to compound concentrations of 10,000 nM (Figure 10). In contrast, for the irradiated compounds (PSS 405 nm, in blue), a significant decrease of the kinase activity with IC<sub>50</sub> values of 214 nM for the *meta*-substituted diazocine (**5**) and 251 nM for the *para*-substituted diazocine (**6**) respectively could be demonstrated. Considering that the IC<sub>50</sub> values of the Z-isomers are higher than 10,000 nM, a difference in the biological activity before and after irradiation of at least a factor of 47 and

40 can be observed respectively. These phototherapeutic indices are the highest differences reported for reversibly switchable small molecule kinase inhibitors so far [10–12]. Beyond that, it has to be taken into account that the present PSS contain only about 47% (5) or 25% (6) of the bioactive *E*-isomers, respectively. Hence, we assume that the isolated isomers *E*-5 and *E*-6 are presumably quite potent with  $IC_{50}$  values in the low nanomolar range. As a technical note, due to the poor water solubility of the diazocine-functionalized axitinib derivatives 5–7, the kinase assay had to be performed with a final DMSO concentration of 10%. It is noteworthy that we confirmed that this high DMSO concentration in the final kinase assay mixture does not affect VEGFR-2 kinase activity.

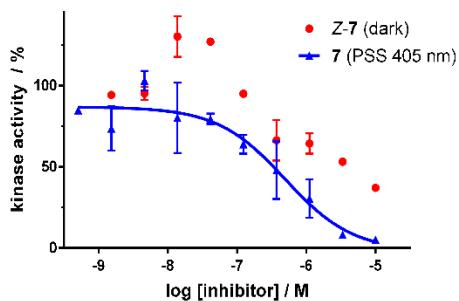


**Figure 9.** Dose–response curves of azobenzene-functionalized axitinib derivatives 3 and 4 in an in vitro VEGFR-2 kinase assay with and without irradiation. Data points are means of double determinations with their standard deviation as error bars. (a) *E*-3 in the dark (red,  $IC_{50} = 1077$  nM, residual activity (plateau): 33%,  $R^2 = 0.90$ ) as well as after irradiation at 365 nm (blue,  $IC_{50} = 1289$  nM, residual activity (plateau): 5%,  $R^2 = 0.90$ ). (b) *E*-4 in the dark (red,  $IC_{50} = 1020$  nM, residual activity (plateau): 43%,  $R^2 = 0.95$ ) as well as after irradiation at 385 nm (blue,  $IC_{50} = 1435$  nM, residual activity (plateau): 13%,  $R^2 = 0.93$ ).



**Figure 10.** Dose–response curves of sulfur–diazocine–functionalized axitinib derivatives 5 and 6 in an in vitro VEGFR-2 kinase assay with and without irradiation. Data points are means of double determinations with their standard deviation as error bars. Final DMSO concentration 10%. (a) *Z*-5 in the dark (red,  $IC_{50} > 10,000$  nM) as well as after irradiation at 405 nm (blue,  $IC_{50} = 214$  nM, residual activity (plateau): 6%,  $R^2 = 0.94$ ). (b) *Z*-6 in the dark (red,  $IC_{50} > 10,000$  nM) as well as after irradiation at 405 nm (blue,  $IC_{50} = 251$  nM, residual activity (plateau): 10%,  $R^2 = 0.94$ ).

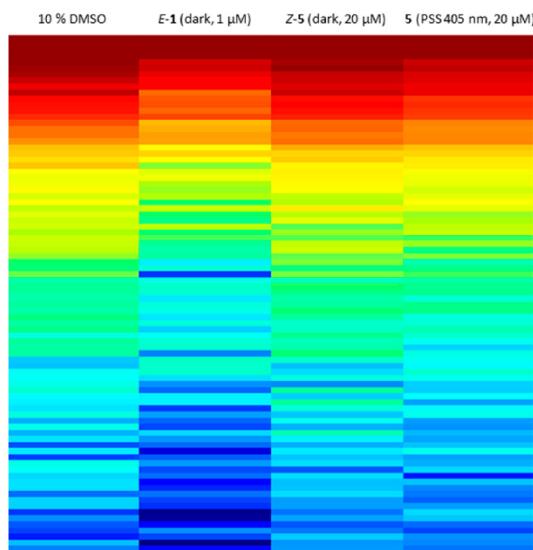
Dose–response analysis of the carbon–diazocine derivative 7 reveals a weak activity for the *Z*-isomer (Figure 11, red circles, residual activity: ≥37%) as well, which correlates with the results of the induced-fit docking (Table 2). Therefore, the activation effect after irradiation is comparatively low (PSS 405 nm,  $IC_{50} = 493$  nM). While the PSS of compound 7 possesses the highest *E* ratio (60%), only a weak inhibition of the kinase can be observed compared to the sulfur–diazocines 5 and 6.



**Figure 11.** Dose–response curves of carbon–diazocine–functionalized axitinib derivative **7** in an in vitro VEGFR-2 kinase assay with and without irradiation. Data points are means of double determinations with their standard deviation as error bars. Final DMSO concentration 10%. Z-7 in the dark (red, residual activity:  $\geq 37\%$ ) as well as after irradiation at 405 nm (blue,  $IC_{50} = 493 \text{ nM}$ ,  $R^2 = 0.89$ ).

#### 2.4.2. Kinome Profiling (PamGene) of Sulfur–diazocine Derivative **5**

Since sulfur–diazocine **5** showed the best efficacy in the VEGFR-2 kinase assay, we further tested this compound on a kinase profiling panel (PamGene [47–49]) using lysates of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). By using the PamGene technology, kinase activities are studied via the phosphorylation degree of over 144 substrate peptides fixed in arrays. In our testing, the profiling reveals strong kinase inhibition after treatment with *E*-axitinib (**1**) compared to DMSO (negative control). This result is in agreement with our findings in the previous axitinib study [14]. In contrast, HUVEC lysate treated with unirradiated derivative **5** shows similar kinase activities as the DMSO control, demonstrating the Z-isomer to be biologically inactive (Figure 12). Irradiation compound **5** leads to a moderate decrease of kinase activities, indicating a modest cellular effectiveness of the PSS of diazocine **5** with a trend toward the positive control *E*-axitinib (**1**). As described above, 10% DMSO as co-solvent was also necessary in this assay to avoid compound precipitation of the micromolar compound solution.



**Figure 12.** Kinome activity profiling of treated human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) cell lysate. Heat map shows the phosphorylation degree of affected peptides from red (high phosphorylation degree) to blue (low phosphorylation degree). A lower phosphorylation degree confirms more inhibited protein kinases. Lysates were treated with  $20 \mu\text{M}$  diazocine-functionalized axitinib derivative **5** with or without irradiation at 405 nm,  $1 \mu\text{M}$  axitinib or 10% DMSO as negative control.

### 3. Discussion

In this study, a small set of azobenzene- and diazocene-functionalized derivatives of the approved VEGFR kinase inhibitor axitinib was designed, synthesized, and characterized. For sulfur-diazocene derivatives **5** and **6**, irradiation induced significant biological effects in an *in vitro* VEGFR-2 kinase assay. In agreement with the data of the molecular modeling studies, the Z-isomers of diazocene derivatives **5** and **6** are biologically inactive, while strong kinase inhibition could be measured for the PSS after irradiation at 405 nm, resulting in IC<sub>50</sub> values of 214 nM (**5**) and 251 nM (**6**) respectively. Hence, phototherapeutic indices of 47 and 40 are attained, with regard to the difference between the non-irradiated and irradiated compounds. This is a major improvement compared to previously reported photoswitchable kinase inhibitors with 1.6- to 11-fold differences [10–12]. Furthermore, a modest difference in the phosphorylation profiles of HUVEC cell lysates with and without irradiation could be demonstrated for compound **5**. Remarkably, for the carbon-diazocene **7**, the Z-isomer also shows moderate kinase inhibition. Modeling data suggest that this result could be explained by the larger angle between both phenyl rings of the carbon-diazocene in the Z-configuration.

For the azobenzene derivatives **3** and **4**, both molecular modeling and biological testing revealed no significant differences in the binding affinities of the *E/Z*-isomers. Regarding biological applications of photoresponsive compounds, these results suggest diazocines to have advantages over standard azobenzenes: Due to large changes of the molecular geometry upon irradiation, diazocines are promising photoswitches compared to the less rigid azobenzenes, where the rotation of a C–N single bond can weaken photoinduced effects toward ligand–target binding. However, the physicochemical parameters of the diazocene-functionalized compounds such as poor water solubility have to be optimized. In this context, Lentes et al., published e.g., a nitrogen-bridged diazocene that shows great switching properties as well as improved water solubility [50]. Thus, a key challenge for the development of photoresponsive diazocines toward biological applications will be to focus on both the optimization of photochemical properties and physicochemical parameters.

### 4. Materials and Methods

#### 4.1. Computational Chemistry

For molecular modeling studies, the software Maestro (v.11.7, Release 2018-03), Schrödinger LLC (New York, NY, USA) was used. Calculations were run on a DELL Precision T3610 computer (Round Rock, Texas, USA). The protein structure 4AG8 of the RCSB protein data bank (PDB) was used as a VEGFR-2 model. The protein structure was prepared with the Protein Preparation Wizard prior to docking. Bond orders were adjusted, hydrogen atoms were added, disulfide bonds were optimized, and water molecules within a distance > 5 Å to heteroatoms were deleted. Missing residues and missing loops were added using the tool Prime. H-bonding within the protein structure was optimized using the standard protocol in Glide. The geometry of the protein was improved in a simplified, restricted optimization using an OPLS3e force field. In the process, heavy atoms within an RMSD of 0.3 Å were converged. Receptor Grids were created using the tool Glide.

Geometries of *E*- and *Z*-azobenzene moieties as well as all diazocenes structures were optimized using DFT on B3LYP/6-31G\* level of theory. Binding modes were calculated with the tool Glide using Extra Precision (XP) mode. The options Canonicalize input conformation and post-docking minimization were deactivated to prevent conformational changes of the quantum-mechanically optimized structures. In addition, quantum-mechanically optimized diazocene- and azobenzene moieties were frozen during Glide dockings using torsional constraints. For dockings into the VEGFR-2 crystal structure (PDB: 4AG8), H-bond constraints to the residues Cys-919, Asp-1046, Glu-917 und Glu-885 were defined. Induced-fit binding modes were calculated with the tool Induced-fit-docking (IFD) using the standard protocol and OPLS3e force field. Torsional constraints for diazocene- and azobenzene moieties during IFD dockings were defined programmatically.

#### 4.2. Synthesis

Detailed synthesis descriptions and analytical data of all compounds can be found in the Supplementary Materials. NMR spectra were recorded either on a Bruker Avance III 300 ( $^1\text{H}$ -NMR: 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 75 MHz,  $^{15}\text{N}$ -NMR: 30 MHz,  $^{119}\text{Sn}$ -NMR: 112 MHz), a Bruker Ascend 400 ( $^1\text{H}$ -NMR: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 100 MHz,  $^{19}\text{F}$ -NMR: 377 MHz,  $^{119}\text{Sn}$ -NMR: 149 MHz), or a Bruker AV 600 ( $^1\text{H}$ -NMR: 600 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 150 MHz) (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). The spectra are referenced to the residual signals of the deuterated solvents: Aceton-d<sub>6</sub>: 2.05 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR), 29.84 ppm ( $^{13}\text{C}$ -NMR); Chloroform: 7.26 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR), 77.16 ppm ( $^{13}\text{C}$ -NMR); DMSO-d<sub>6</sub>: 2.50 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR), 39.52 ppm ( $^{13}\text{C}$ -NMR); Methanol-d<sub>4</sub>: 3.31 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR), 49.0 ppm ( $^{13}\text{C}$ -NMR). NMR signals were analyzed using the following abbreviations: singlet (s), broad singlet (bs), doublet (d), doublet of doublets (dd), doublet of doublets of doublets (ddd), doublet of triplets (dt), triplet (t), triplet of doublets (td), quartet (q), multiplet (m), centered multiplet (m<sub>c</sub>). For explicit assignments of signals 2D NMR spectra (COSY, HSQC, HMBC) were used. The actual  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of key compounds (azobenzene derivatives **3** and **4** as well as diazocine derivatives **5–7**) are shown in Figures S10–S19.

LC-MS spectra were recorded on a Bruker Esquire LC ion trap mass spectrometer (Bremen, Germany) in the positive ion mode (dry gas 6.5 L/min, nebulizer 25 psi, drying temperature 250 °C) after chromatographic separation using an Agilent 1100 HPLC system (Waldbronn, Germany) with an RP-8 column (Waters Xterra MS C8, 50 × 4.6 mm, 3.5 μm, Milford, MA, USA) and a 0.1% acetic acid/acetonitrile gradient. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a JEOL AccuTOF GCv 4G electron ionization time of flight (EI-TOF) mass spectrometer (Freising, Germany). ESI mass spectra were recorded on a ThermoFisher Q Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap spectrometer (Dreieich, Germany).

HPLC analysis was performed on a Hewlett-Packard 1050 Series system (Palo Alto, CA, USA) using a ZORBAX Eclipse XDB-C8 column (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

#### 4.3. Photochemical Characterization

UV/VIS spectra were measured using a Varian Cary® 50 Scan UV/VIS photometer from Agilent (Waldbronn, Germany) equipped with a Varian Cary PCB 150 thermostat either at 25 °C or 37 °C. For irradiation experiments, the following custom-made light sources have been used: 365 nm LED reactor (Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg, Germany, 12 × 450 mW Nichia NCSU033B LEDs, dimmable to 25%, 50%, 75% or 100%), 385 nm LED lamp (Sahlmann Photochemical Solutions, 3 × 2430 mW Nichia NC4U134 LEDs, not dimmable), 405 nm LED lamp (Sahlmann Photochemical Solutions, 3 × 2430 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, not dimmable), 420 nm LED lamp (Sahlmann Photochemical Solutions, 1 × 2300 mW Marubeni 420-66-60 LED, not dimmable), 530 nm LED lamp (Sahlmann Photochemical Solutions, 8 × 575 mW Nichia NCSG219-V1 LEDs, dimmable to 25%, 50%, 75% or 100%). The fitting of thermal relaxations was done with GraphPad Prism® (v.7.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### 4.4. Kinase Assays

Kinase activity of VEGFR-2 (purified kinase domain, KDR active, Promega) was determined using a luminescence based ADP-Glo™ kinase assay (Promega, Madison, WI, USA). In this assay, ADP generated during the kinase reaction is transformed into a luminescence signal, which is then proportional to the kinase activity. The assay was performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, white 96-well CulturePlates™ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) were used with kinase reaction mixtures of total 25 μL. Kinase reactions were run with 10 μM ATP, 0.4 ng/μL kinase and 0.25 mg/mL substrate (Poly(4:1 Glu, Tyr)Peptide) in kinase buffer (40 mM Tris (pH 7.5), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/mL BSA, 2 mM DTT, 2 mM MnCl<sub>2</sub> and 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Test compounds were dissolved in DMSO, and 1:3 serial dilutions were prepared. As described previously [14], compound handling took place under controlled light conditions. Since it was not possible to examine switching behavior of the

axitinib derivatives in aqueous solution, compound irradiation was first performed in DMSO before adding this solution to the aqueous kinase assay mixture. Azobenzene **3** was irradiated at 365 nm using a dimmable custom-made lamp for 96-well plates, consisting of 16 LEDs in the distance of the wells (Sahlmann Photochemical Solutions, 16 × 750 mW Nichia NCSU276A LEDs). Every well was irradiated for 20 s at 5% power. Azobenzene **4** was irradiated at 385 nm using a hand lamp consisting of three LEDs (Sahlmann Photochemical Solutions, 3 × 2430 mW Nichia NC4U134 LEDs). Here, the whole plate was irradiated for 2 min. Diazocines **5–7** were irradiated at 405 nm using a custom-made 96-well plate lamp (Sahlmann Photochemical Solutions, 16 × 980 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, dimmable). Every well was irradiated for 20 s at 5% power. Diazocines **5–7** were additionally irradiated every 30 min during the assay procedure due to the short half-life of compound **7**. For diazocine testing, the 405 nm lamp was used as the only light source. Before kinase addition starts the reaction, compounds were added to the reaction mixture resulting in final concentrations of 1% (azo-compounds **2–4**) or 10% (diazocines **5–7**) DMSO and inhibitor concentrations ranging from 10 μM to 0.5 nM. It was verified that 10% DMSO in the final kinase assay mixture does not affect VEGFR-2 kinase activity. Luminescence intensities were recorded on a FLUOstar® Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Kinase activity was calculated in percent of control without inhibitor (DMSO only) and plotted against logarithm of inhibitor concentration. Data points are means of double measurements with standard deviation as error bars. Sigmoidal fitting (log(inhibitor) vs. response–variable slope) and calculation of IC<sub>50</sub> values was performed using GraphPad Prism® (v.7.03).

#### 4.5. Kinase Selectivity Profiling (PamGene)

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany) and cultivated with ECGM2 (PromoCell) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in humidified atmosphere. For kinome profiling, HUVECs were seeded in cell culture flasks (25 cm<sup>2</sup>) to 90% confluence. After cell lysis with M-Per and centrifugation at 4 °C, cell lysates were immediately stored at –80 °C [14]. Protein concentration was determined with Bradford assay (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Samples for profiling were prepared according to manufacturer's protocol. For kinome profiling, PamStation® 12 was used (PamGene, 's-Hertogenbosch, Netherlands). Protein tyrosine kinase PamChips® were used with a total of 5 μg protein and 100 μM ATP per array. The microchip for kinome profiling contains 144 peptides linked to a porous surface. These peptides can be phosphorylated by cell lysate kinases. Readout was achieved by washing microchips with fluorescent antibodies. Compounds in DMSO as well as lysate master mix (including compounds) were irradiated at 405 nm (irradiation of reaction tubes with 405 nm well plate lamp, Sahlmann Photochemical Solutions, 16 × 980 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, 20% power, for 30 s), while compound handling was established under controlled lighting. Profiling was performed at a final DMSO concentration of 10%. Data analysis was performed as previously described by Labots et al. [51].

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/8961/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.S., L.H., C.P. and R.H.; methodology, D.S., L.H., T.R., L.W. and J.E.; software, D.S.; validation, L.H. and T.R.; formal analysis, D.S., L.H., T.R., L.W. and J.E.; resources, C.P., R.H. and M.K.; data curation, D.S., L.H., T.R. and L.W.; writing—original draft preparation, D.S., L.H. and T.R.; writing—review and editing, C.P., L.W. and R.H.; visualization, D.S., L.H. and T.R.; supervision, C.P., R.H. and M.K.; project administration, D.S.; funding acquisition, C.P. and R.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by DFG (German Research Society) grant Collaborative Research Centre 677 “Function by Switching” and DFG grant PE1605\_2\_2.

**Acknowledgments:** We thank Martin Schütt (Institute of Pharmacy, Kiel University) and Konstantin Hoffer (University Medical Center Hamburg) for excellent technical assistance and Fynn Röhricht (Otto-Diels-Institute of Organic Chemistry, Kiel University) for providing quantum mechanically optimized diazocine structures. We gratefully acknowledge the support of Dieter Schollmeyer (Institute for Organic Chemistry, University of Mainz, Germany) for X-ray analysis of small molecule compounds.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

|       |   |
|-------|---|
| BSA   | Bovine serum albumin                        |
| DBPO  | Dibenzoyl peroxide                          |
| DCM   | Dichloromethane                             |
| DMF   | Dimethylformamide                           |
| DMSO  | Dimethyl sulfoxide                          |
| DTT   | Dithiothreitol                              |
| FDA   | Food and Drug Administration                |
| HUVEC | Human umbilical vein endothelial cell       |
| LED   | Light-emitting diode                        |
| NBS   | N-Bromosuccinimide                          |
| pdb   | Protein Data Bank                           |
| PKC   | Protein kinase C                            |
| PSS   | Photostationary state                       |
| RMSD  | Root mean square deviation                  |
| RT    | Room temperature                            |
| THF   | Tetrahydrofuran                             |
| VEGFR | Vascular endothelial growth factor receptor |

## References

1. Velema, W.A.; Szymanski, W.; Feringa, B.L. Photopharmacology: Beyond proof of principle. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2178–2191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lerch, M.M.; Hansen, M.J.; van Dam, G.M.; Szymanski, W.; Feringa, B.L. Emerging Targets in Photopharmacology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 10978–10999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Broichhagen, J.; Frank, J.A.; Trauner, D. A roadmap to success in photopharmacology. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947–1960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. In Vivo Photopharmacology. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10710–10747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Szymański, W.; Beierle, J.M.; Kistemaker, H.A.V.; Velema, W.A.; Feringa, B.L. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bournez, C.; Carles, F.; Peyrat, G.; Aci-Sèche, S.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. Comparative Assessment of Protein Kinase Inhibitors in Public Databases and in PKIDB. *Molecules* **2020**, *25*, 3226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Carles, F.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials. *Molecules* **2018**, *23*, 908. [[CrossRef](#)]
8. Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol. Res.* **2020**, *152*, 104609. [[CrossRef](#)]
9. Fleming, C.L.; Grøtli, M.; Andréasson, J. On-Command Regulation of Kinase Activity using Photonic Stimuli. *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 318–326. [[CrossRef](#)]
10. Ferreira, R.; Nilsson, J.R.; Solano, C.; Andréasson, J.; Grøtli, M. Design, Synthesis and Inhibitory Activity of Photoswitchable RET Kinase Inhibitors. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9769. [[CrossRef](#)]
11. Schehr, M.; Ianes, C.; Weisner, J.; Heintze, L.; Müller, M.P.; Pichlo, C.; Charl, J.; Brunstein, E.; Ewert, J.; Lehr, M.; et al. 2-Azo-, 2-diazocine-thiazols and 2-azo-imidazoles as photoswitchable kinase inhibitors: Limitations and pitfalls of the photoswitchable inhibitor approach. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1398–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hoorens, M.W.H.; Ourailidou, M.E.; Rodat, T.; van der Wouden, P.E.; Kobauri, P.; Kriegs, M.; Peifer, C.; Feringa, B.L.; Dekker, F.J.; Szymanski, W. Light-controlled inhibition of BRAFV600E kinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 133–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Wilson, D.; Li, J.W.; Branda, N.R. Visible-Light-Triggered Activation of a Protein Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 284–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Schmidt, D.; Rodat, T.; Heintze, L.; Weber, J.; Horbert, R.; Girreser, U.; Raeker, T.; Bußmann, L.; Kriegs, M.; Hartke, B.; et al. Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2415–2426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mittal, K.; Wood, L.S.; Rini, B.I. Axitinib in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Biol. Ther.* **2012**, *2*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Beharry, A.A.; Woolley, G.A. Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437. [[CrossRef](#)]
17. Wei, N.; Liang, J.; Peng, S.; Sun, Q.; Dai, Q.; Dong, M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Axitinib Derivatives. *Molecules* **2018**, *23*, 747. [[CrossRef](#)]
18. Weston, C.E.; Richardson, R.D.; Fuchter, M.J. Photoswitchable basicity through the use of azoheteroarenes. *Chem. Commun. (Camb)* **2016**, *52*, 4521–4524. [[CrossRef](#)]
19. Leippe, P. Tethered Photopharmacology. Ph.D. Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany, 2018.
20. Simeth, N.A.; Crespi, S.; Fagnoni, M.; König, B. Tuning the Thermal Isomerization of Phenylazoindole Photoswitches from Days to Nanoseconds. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2940–2946. [[CrossRef](#)]
21. Otsuki, J.; Suwa, K.; Sarker, K.K.; Sinha, C. Photoisomerization and thermal isomerization of arylazomidazoles. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1403–1409. [[CrossRef](#)]
22. Crespi, S.; Simeth, N.A.; Bellisario, A.; Fagnoni, M.; König, B. Unraveling the Thermal Isomerization Mechanisms of Heteroaryl Azoswitches: Phenylazoindolets as Case Study. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123*, 1814–1823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rustler, K.; Nitschke, P.; Zahnbrecher, S.; Zach, J.; Crespi, S.; König, B. Photochromic Evaluation of 3(5)-Arylazo-1H-pyrazoles. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 4079–4088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Siewertsen, R.; Neumann, H.; Buchheim-Stehn, B.; Herges, R.; Näther, C.; Renth, F.; Temps, F. Highly efficient reversible Z-E photoisomerization of a bridged azobenzene with visible light through resolved S(1)(n pi\*) absorption bands. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15594–15595. [[CrossRef](#)]
25. Samanta, S.; Qin, C.; Lough, A.J.; Woolley, G.A. Bidirectional photocontrol of peptide conformation with a bridged azobenzene derivative. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 6452–6455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Eljabu, F.; Dhruval, J.; Yan, H. Incorporation of cyclic azobenzene into oligodeoxynucleotides for the photo-regulation of DNA hybridization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5594–5596. [[CrossRef](#)]
27. Trads, J.B.; Hüll, K.; Matsuura, B.S.; Laprell, L.; Fehrentz, T.; Görldt, N.; Kozek, K.A.; Weaver, C.D.; Klöcker, N.; Barber, D.M.; et al. Sign Inversion in Photopharmacology: Incorporation of Cyclic Azobenzenes in Photoswitchable Potassium Channel Blockers and Openers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 15421–15428. [[CrossRef](#)]
28. Thapaliya, E.R.; Zhao, J.; Ellis-Davies, G.C.R. Locked-Azobenzene: Testing the Scope of a Unique Photoswitchable Scaffold for Cell Physiology. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 2481–2488. [[CrossRef](#)]
29. McTigue, M.; Murray, B.W.; Chen, J.H.; Deng, Y.-L.; Solowiej, J.; Kania, R.S. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 18281–18289. [[CrossRef](#)]
30. Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; et al. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749. [[CrossRef](#)]
31. Halgren, T.A.; Murphy, R.B.; Friesner, R.A.; Beard, H.S.; Frye, L.L.; Pollard, W.T.; Banks, J.L. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759. [[CrossRef](#)]
32. Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P.C.; Mainz, D.T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hammerich, M.; Schütt, C.; Stähler, C.; Lentes, P.; Röhricht, F.; Höppner, R.; Herges, R. Heterodiazocines: Synthesis and Photochromic Properties, Trans to Cis Switching within the Bio-optical Window. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13111–13114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M.P.; Friesner, R.A.; Farid, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 534–553. [CrossRef] [PubMed]
35. Chekal, B.P.; Guinness, S.M.; Lillie, B.M.; McLaughlin, R.W.; Palmer, C.W.; Post, R.J.; Sieser, J.E.; Singer, R.A.; Slaggert, G.W.; Vaidyanathan, R.; et al. Development of an Efficient Pd-Catalyzed Coupling Process for Axitinib. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *18*, 266–274. [CrossRef]
36. Zhai, L.-H.; Guo, L.-H.; Luo, Y.-H.; Ling, Y.; Sun, B.-W. Effective Laboratory-Scale Preparation of Axitinib by Two CuI-Catalyzed Coupling Reactions. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 849–857. [CrossRef]
37. Correa, A.; Tellitu, I.; Domínguez, E.; SanMartin, R. Novel Alternative for the N – S Bond Formation and Its Application to the Synthesis of Benzisothiazol-3-ones. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4811–4813. [CrossRef]
38. Sridhara, M.B.; Srinivasa, G.R.; Channe Gowda, D. Ammonium chloride mediated reduction of azo compounds to hydrazo compounds. *J. Chem. Res.* **2004**, *74*–75. [CrossRef]
39. Koźlecki, T.; Syper, L.; Wilk, K.A. 4-Lithio-4'-alkylazobenzenes as Convenient Intermediates for the Preparation of Azobenzene Derivatives. *Synthesis* **1997**, 681–684. [CrossRef]
40. Strueben, J.; Gates, P.J.; Staubitz, A. Tin-functionalized azobenzenes as nucleophiles in Stille cross-coupling reactions. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1719–1728. [CrossRef]
41. Strueben, J.; Lipfert, M.; Springer, J.-O.; Gould, C.A.; Gates, P.J.; Sönnichsen, F.D.; Staubitz, A. High-yield lithiation of azobenzenes by tin-lithium exchange. *Chemistry* **2015**, *21*, 11165–11173. [CrossRef]
42. Schehr, M.; Hugenbusch, D.; Moje, T.; Näther, C.; Herges, R. Synthesis of mono-functionalized S-diazocines via intramolecular Baeyer–Mills reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 2799–2804. [CrossRef] [PubMed]
43. Moormann, W.; Langbehn, D.; Herges, R. Synthesis of functionalized diazocines for application as building blocks in photo- and mechanoresponsive materials. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 727–732. [CrossRef]
44. Moormann, W.; Langbehn, D.; Herges, R. Solvent-Free Synthesis of Diazocene. *Synthesis* **2017**, *49*, 3471–3475. [CrossRef]
45. Maier, M.S.; Hüll, K.; Reynders, M.; Matsuura, B.S.; Leippe, P.; Ko, T.; Schäffer, L.; Trauner, D. Oxidative Approach Enables Efficient Access to Cyclic Azobenzenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 17295–17304. [CrossRef]
46. Bléger, D.; Hecht, S. Visible-Light-Activated Molecular Switches. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 11338–11349. [CrossRef] [PubMed]
47. Tahiri, A.; Røe, K.; Ree, A.H.; de Wijn, R.; Risberg, K.; Busch, C.; Lønning, P.E.; Kristensen, V.; Geisler, J. Differential inhibition of ex-vivo tumor kinase activity by vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF wild-type metastatic malignant melanoma. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72692. [CrossRef] [PubMed]
48. Arni, S.; Le, T.H.N.; de Wijn, R.; Garcia-Villegas, R.; Dankers, M.; Weder, W.; Hillinger, S. Ex vivo multiplex profiling of protein tyrosine kinase activities in early stages of human lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 68599–68613. [CrossRef] [PubMed]
49. Baharani, A.; Trost, B.; Kusalik, A.; Napper, S. Technological advances for interrogating the human kinome. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 65–77. [CrossRef]
50. Lentes, P.; Stadler, E.; Röhricht, F.; Brahms, A.; Gröbner, J.; Sönnichsen, F.D.; Gescheidt, G.; Herges, R. Nitrogen Bridged Diazocines: Photochromes Switching within the Near-Infrared Region with High Quantum Yields in Organic Solvents and in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13592–13600. [CrossRef]
51. Labots, M.; Gotink, K.J.; Dekker, H.; Azijli, K.; van der Mijn, J.C.; Huijts, C.M.; Piersma, S.R.; Jiménez, C.R.; Verheul, H.M.W. Evaluation of a tyrosine kinase peptide microarray for tyrosine kinase inhibitor therapy selection in cancer. *Exp. Mol. Med.* **2016**, *48*, e279. [CrossRef]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

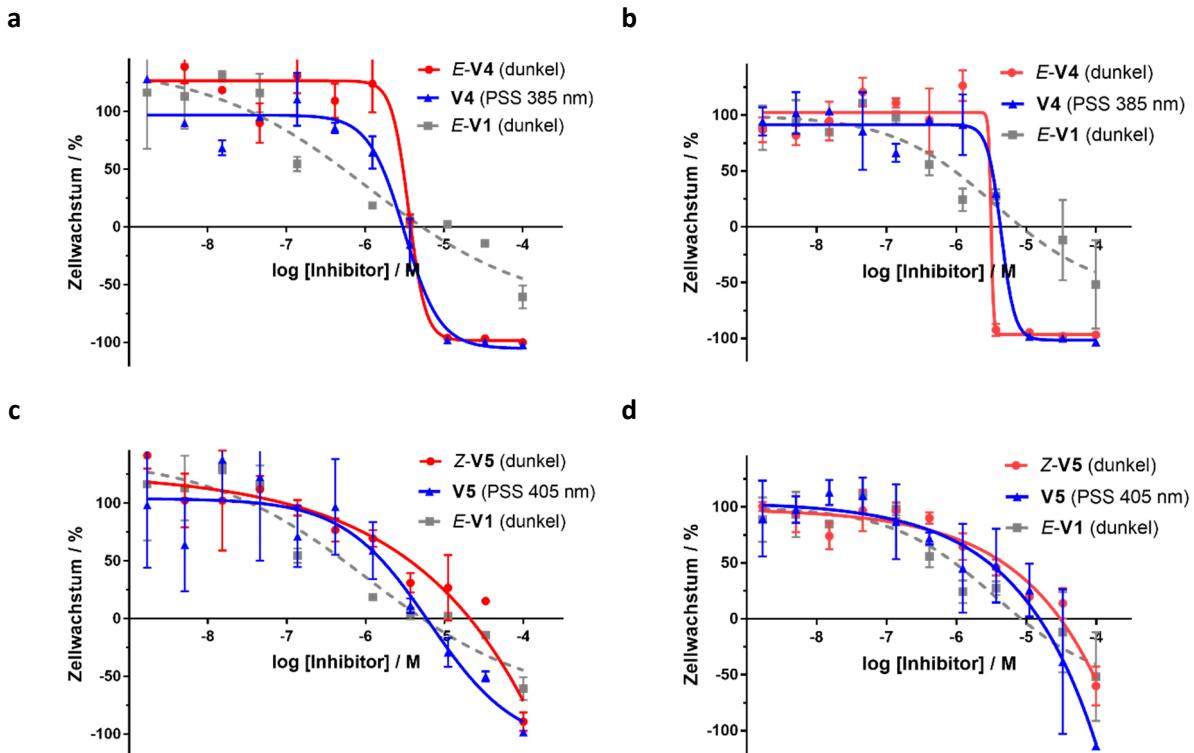
### 3.2.3 Zusätzliche Zelltestungsdaten

Um die zelluläre Wirksamkeit der photoschaltbaren Axitinib-Derivate im Vergleich zum Kinaseassay weitergehend zu untersuchen, wurden über die publizierten Daten hinaus Proliferationsassays mit HUVEC durchgeführt. VEGFR-2 abhängige HUVEC stellen ein Modelsystem für Angiogenese dar und wurden von unserer und anderen Arbeitsgruppen bereits für Axitinib-Studien verwendet.<sup>[69, 119–121]</sup> Dabei wurden exemplarisch Dosis-Wirkungskurven für das Azobenzol-Derivat **V4** sowie das Schwefel-Diazocin-Derivat **V5** aufgenommen (Abbildung 3.14). Beide Derivate wurden unter kontrollierten Lichtbedingungen jeweils unbestrahlten und bestrahlten mit 385 nm bzw. 405 nm getestet. Die Testsubstanzen sowie die Referenz Axitinib (**V1**) wurden in einem Konzentrationsbereich von 100 µM - 1.7 nM mit einer DMSO-Konzentration von 1 % eingesetzt und für 48 h mit den Zellen inkubiert. Die Auslesung der Zellviabilität erfolgt mittels eines Fluoreszenz-basierten Resazurinassays.

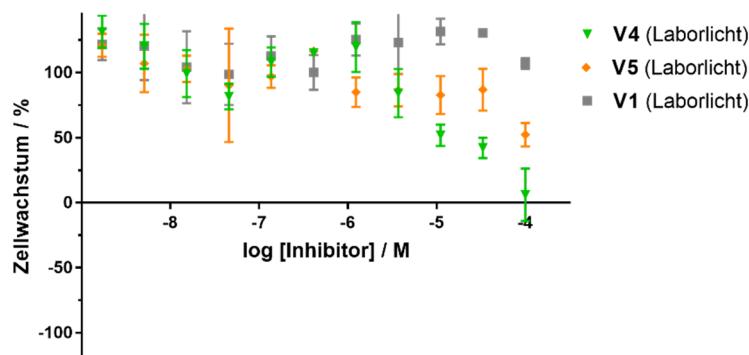
Die für *E*-Axitinib (*E*-**V1**) erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte (1.1 µM und 3.6 µM) liegen im Bereich der Literaturwerte.<sup>[69, 120, 121]</sup> Für das Azobenzol-Axitinib-Derivat **V4** zeigt sich sowohl für das unbestrahlte *E*-Isomer als auch nach Bestrahlung mit 385 nm (PSS 385 nm) bis zu einer Konzentration von 1 µM keine Hemmung des Zellwachstums. Oberhalb dieser Konzentration kommt es zu einem schlagartigen Abfall der Kurve hin zu stark zytotoxischen Wirkungen ab 10 µM (Abbildung 3.14 a, IC<sub>50</sub>(*E*-**V4**) = 3.6 µM, IC<sub>50</sub>(**V4** PSS 385 nm) = 3.1 µM). Dieser Kurvenverlauf lässt auf eine Präzipitation der Substanz schließen, die den Auslesungsassay stört und/oder zu einer unspezifischen Zelltoxizität führt. Die Bestrahlung des photoschaltbaren Inhibitors erfolgte dabei zunächst nur einmalig vor Zugabe zu den Zellen in reinem DMSO, da in diesem Lösungsmittel auch die Schalteigenschaften charakterisiert werden konnten. Aus dem Grund, dass die Halbwertszeit des Azobenzol-Derivates **V4** (5.7 h in DMSO bei 37 °C) jedoch deutlich kürzer ist als die Inkubationszeit im Proliferationsassay (48 h), wurde in einem weiteren Assay zusätzlich die Zellplatte ca. alle 6 h für 1 min mit 385 nm bestrahlten (Abbildung 3.14 b). Hierbei zeigt sich allerdings keine signifikante Veränderung gegenüber dem vorherigen Assay. Die IC<sub>50</sub>-Werte liegen auch hier sowohl mit als auch ohne Bestrahlung im Bereich von 3-4 µM. Für beide Zellassays gilt demnach, dass kein Unterschied in der Wirksamkeit beider Isomere (*E/Z*) festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der VEGFR-2 Kinasetestung, bei der ebenfalls eine vergleichbare Wirkung mit und ohne Bestrahlung beobachtet wurde.

Die Zelltestung des Diazocin-Axitinib-Derivates **V5** zeigt für das unbestrahlte *Z*-Isomer ab einer Konzentration von ca. 1 µM eine zytostatische Wirkung. Bei Konzentrationen über 30 µM treten zunehmend stärkere zytotoxische Wirkungen ein. Nach einer zunächst einmaligen Bestrahlung der DMSO-Lösungen mit 405 nm erweisen sich die höchsten Konzentrationen im Vergleich zum *Z*-Isomer etwas stärker zytotoxisch (Abbildung 3.14 c). Insgesamt lässt sich jedoch kein eindeutiger Unterschied vor und nach Bestrahlung feststellen. IC<sub>50</sub> Werte können aufgrund des Fehlens der unteren Plateaus der Dosis-Wirkungskurven nicht zuverlässig bestimmt werden. Insbesondere die moderate Wirksamkeit des *Z*-Diazocins im Proliferationsassay steht im Gegensatz zu den Ergebnissen des VEGFR-2 Kinaseassays und des PamGene Profilings, die eine Inaktivität des *Z*-Isomers auf Kinase-Ebene vorhersagten. Die Aktivität im Zellassay könnte zum einen wie beim Azobenzol-Derivat auf eine Präzipitation der Substanz zurückzuführen sein, zum anderen aber auch auf *off-target* Effekte oder eine unspezifische Toxizität der Azofunktion. Aufgrund der im Vergleich zum Proliferationsassay kurzen Halbwertszeiten des Diazocin-Derivates **V5** (7.3 h in DMSO bei 37 °C), wurde analog zur Azobenzoltestung ein zweiter Assay mit mehrfacher Bestrahlung (alle 6 h) durchgeführt

(Abbildung 3.14 d). Auch in diesem Fall konnte durch die Mehrfach-Bestrahlung keine Veränderung gegenüber dem ersten Assay erreicht werden. Insgesamt ist unklar, inwieweit sich das Schaltverhalten in wässriger Lösung sowie die Halbwertszeiten der Kinase-gebundenen Photoschalter möglicherweise von den in DMSO bestimmten photochemischen Parametern unterscheiden. Als besonders problematisch ist die schlechte Wasserlöslichkeit bzw. die Bioverfügbarkeit der Verbindungen zu betrachten. Im Gegensatz zum Kinaseassay ist es im Zellassay nicht möglich, 10 % DMSO einzusetzen, da dies für die Zellen toxisch ist.<sup>[122]</sup> Um zu untersuchen, ob die Testsubstanzen (möglicherweise in präzipitierter Form) einen Einfluss auf den Resazurin-Assay haben, wurde ein Wechselwirkungsassay durchgeführt, bei dem die Substanzen erst kurz vor der Auswertung mittels Resazurin-Assay zu den Zellen gegeben wurden. Wie Abbildung 3.15 zu entnehmen ist, zeigt sich insbesondere für das Azobenzol-Axitinib-Derivat **V4** (grüne Dreiecke), aber auch für das Diazocin-Derivat **V5** (orangene Rauten) in Konzentrationen über 3 µM eine vermeintlich zytostatische Wirkung. Dieser Effekt könnte auf Präzipitat zurückzuführen sein, welches die Signalauslesung stört oder toxisch für die Zellen ist. Des Weiteren könnte es zu einem Quenching der Auslesungsfluoreszenz durch die photoschaltbaren Testsubstanzen kommen. Im Resazurin-Assay wird das reduzierte Resorufin mit 544 nm zur Fluoreszenz angeregt und bei 590 nm detektiert. Diese Wellenlängen liegen im Bereich des Absorptionsmaximums des *E*-Diazocins.



**Abbildung 3.14.** Testung des Azobenzol-Axitinib-Derivates **V4** und des Diazocin-Axitinib-Derivates **V5** im HUVEC-Proliferationsassay jeweils mit und ohne Bestrahlung. Zugabe der Testsubstanzen erfolgte 24 h nach Zellaussaat mit einer finalen DMSO-Konzentration von 1 %. Nach weiteren 48 h Inkubation erfolgte die Auswertung mittels Resazurin-Assay. (a) Azobenzol-Derivat **E-V4** im Dunkeln (rot,  $IC_{50} = 3.6 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.96$ ) sowie nach einmaliger Bestrahlung der DMSO-Lösung mit 385 nm (blau,  $IC_{50} = 3.1 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.97$ ) im Vergleich zur Referenz **E-Axitinib** (**E-V1**, grau,  $IC_{50} = 1.1 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.90$ ). (b) Azobenzol-Derivat **E-V4** im Dunkeln (rot,  $IC_{50} = 3.2 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.97$ ) sowie nach mehrfacher Bestrahlung der Zellplatte (ca. alle 6 h) mit 385 nm (blau,  $IC_{50} = 4.4 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.97$ ) im Vergleich zur Referenz **E-Axitinib** (**E-V1**, grau,  $IC_{50} = 3.6 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.86$ ). (c) Diazocin-Derivat **Z-V5** im Dunkeln (rot,  $IC_{50}$  nicht bestimmbar) sowie nach einmaliger Bestrahlung der DMSO-Lösung mit 405 nm (blau,  $IC_{50}$  nicht bestimmbar) im Vergleich zur Referenz **E-Axitinib** (**E-V1**, grau,  $IC_{50} = 1.1 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.90$ ). (d) Diazocin-Derivat **Z-V5** im Dunkeln (rot,  $IC_{50}$  nicht bestimmbar) sowie nach mehrfacher Bestrahlung der Zellplatte (ca. alle 6 h) mit 405 nm (blau,  $IC_{50}$  nicht bestimmbar) im Vergleich zur Referenz **E-Axitinib** (**E-V1**, grau,  $IC_{50} = 3.6 \mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.86$ ). Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.



**Abbildung 3.15.** Wechselwirkungsassay des Azobenzol-Axitinib-Derivates **V4**, des Diazocin-Axitinib-Derivates **V5** und der Referenz Axitinib (**V1**) mit dem Resazurin-Assay im Laborlicht. Nach 72 h Zellproliferation wurden die Testsubstanzen kurz vor der Auswertung mittels Resazurin-Assay zu den Zellen gegeben. Finale DMSO-Konzentration 1 %. Während Axitinib (**V1**) keinen Einfluss auf das Auslesungssignal hat, zeigt sich für das Diazocin-Derivat **V5** (orangene Rauten) und im noch größeren Maße für das Azobenzol-Derivat **V4** (grüne Dreiecke) in Konzentrationen > 3  $\mu\text{M}$  eine vermeintlich zytostatische Wirkung. Diese Wechselwirkung mit dem Resazurin-Assay ist eventuell auf Präzipitation der Testsubstanzen zurückzuführen. Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.3 Photoschaltbare Azoanaloga von Imatinib und Nilotinib

Im nachfolgenden Projekt sollte untersucht werden, ob das Konzept der Photopharmakologie analog zum Axitinib-Projekt auch auf die Kinaseinhibitoren Imatinib (**4**) und Nilotinib (**5**, Tabelle 3.2) angewendet werden kann. Die beiden strukturell eng verwandten Inhibitoren sind für die CML-Therapie zugelassen und inhibieren u.a. BCR-ABL und PDGFR- $\beta$ .<sup>[61]</sup> Trotz großer Therapieerfolge gibt es immer wieder Probleme mit Resistenzbildungen.<sup>[123]</sup> Vor diesem Hintergrund wurden von Schmidt reversibel schaltbare Azoanaloga von Imatinib und Nilotinib entwickelt.<sup>[124]</sup> Bisher sind keine Publikationen über photoschaltbare Imatinib- oder Nilotinib-Derivate bekannt. Obwohl es ein chinesisches Patent für die Synthese verschiedener Azo-Derivate von Imatinib gibt, sind keine photochemischen oder biologischen Daten verfügbar.<sup>[125]</sup>

Hier soll zunächst auf das Design photoschaltbarer Azobenzol- und Diazocin-Derivate von Imatinib und Nilotinib sowie deren photochemische Charakterisierung durch Schmidt<sup>[124]</sup> eingegangen werden, bevor der Fokus auf der biologischen Testung liegt.

#### 3.3.1 Molecular Modelling

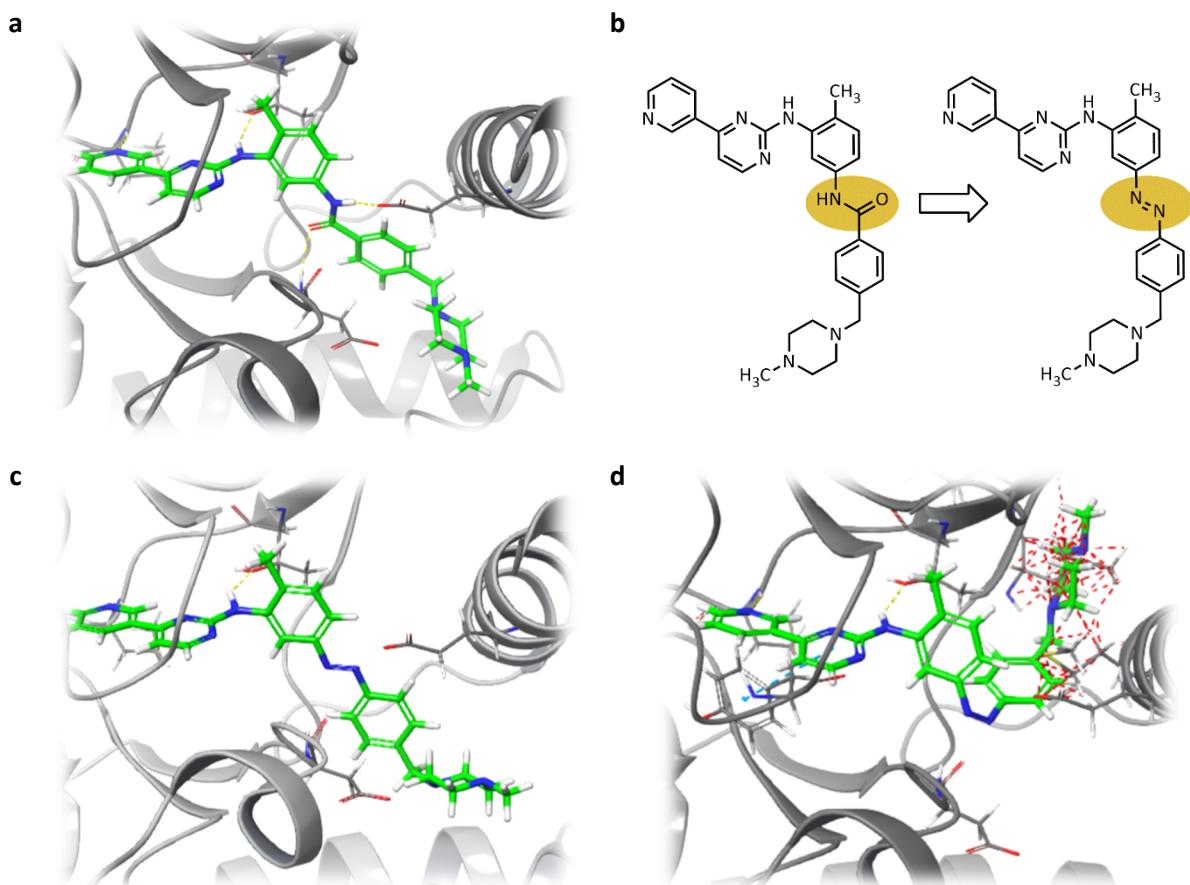
Um geeignete Positionen für die Azologisierung in den Imatinib (**4**)- und Nilotinib (**5**)-Strukturen ausfindig zu machen, wurden von Schmidt *molecular modelling* Studien mit den Bindetaschen der target-Kinasen ABL-1 und PDGFR- $\beta$  durchgeführt.<sup>[124]</sup> Abbildung 3.16 a zeigt den Bindemodus von Imatinib (**4**) in der Bindetasche von ABL-1 (PDB: 2HYY<sup>[126]</sup>), der für beide Typ II DFG<sub>out</sub> Inhibitoren analog ist<sup>[39]</sup>: Der Pyridinrest bindet an die *hinge*-Region der Kinase, während der Aminopyrimidinrest eine weitere Wasserstoffbrückenbindung im hinteren Teil der ATP-Bindetasche ausbildet. Die *N*-Arylbenzamid Struktur besetzt die tiefe Bindetasche (*deep pocket*), die nur in der DFG<sub>out</sub>-Konformation der Kinase zugänglich ist und bildet zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Amidbindung des *N*-Arylbenzamids scheint ein gutes Element für den Austausch durch eine photoschaltbare Azobindung zu sein (siehe Abbildung 3.16 b), da Amidbindungen aufgrund ihres Doppelbindungs-charakters generell als gut geeignet für die Azologisierung gelten.<sup>[15]</sup> Da die Amidbindung tief in der Bindetasche lokalisiert ist, würde ein photoschaltbares Element an dieser Stelle vermutlich einen signifikanten Unterschied in der pharmakologischen Wirkung beider Isomere verursachen. Auf der anderen Seite gehen jedoch die zwei Wasserstoffbrückenbindungen, die von der Amidbindung ausgebildet werden verloren, was sich negativ auf die Bindungsaffinität auswirken könnte. Daher wurden von Schmidt sowohl photoschaltbare Derivate von Imatinib und Nilotinib entwickelt, bei denen die Amidbindung des *N*-Phenylbenzamid-Restes durch eine Azobindung ersetzt wurden (Azoinatinib **6** und Azonilotinib **7**), als auch zwei Imatinib-Derivate mit denen die Amidbindung erhalten wurden (Azobenzol-gekoppeltes Derivat **8** und Diazocin-gekoppeltes Derivat **9**). Für die jeweiligen *E*- und *Z*-Isomere der Azo-Derivate **6-9** wurde ein *Glide docking*<sup>[127-129]</sup> im Vergleich zu Imatinib (**4**) und Nilotinib (**5**) durchgeführt. Die dabei erhaltenen *docking scores* als Beurteilungen der Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 3.2 gegeben.

An ABL-1 (PDB: 2HYY<sup>[126]</sup> für **4**, **6**, **8** und **9** und 3CS9<sup>[63]</sup> für **5** und **7**) wurden für *E*-Azoinatinib (*E*-**6**) und *E*-Azonilotinib (*E*-**7**) *docking scores* erhalten, die vergleichbar mit denen der jeweiligen Referenz **4** bzw. **5** sind, obwohl die Wasserstoffbrückenbindungen an der Azologisierungsposition verloren gehen (Bindemodus von *E*-**6** siehe Abbildung 3.16 c). Für die zugehörigen *Z*-Isomere (*Z*-**6** und *Z*-**7**) konnten

keine plausiblen Bindungsmodi gefunden werden. Die endständigen Arylreste scheinen in der Z-Konfiguration nicht in die schmale *deep pocket* zu passen (vergleiche Überlagerung von Z-6 und ABL-1 in Abbildung 3.16 d).

Die Derivate mit erhaltener Amidbindung (**8** und **9**) haben den Vorteil, dass auch die zugehörigen Wasserstoffbrückenbindungen erhalten bleiben. Gleichzeitig stellt sich jedoch der Nachteil heraus, dass die photoschaltbare Einheit nun an der zum Lösungsmittel hin gerichteten Öffnung der Bindetasche lokalisiert ist und die Arylreste teilweise aus der Bindetasche herausragen. Dementsprechend wurden für das Azobenzol-Derivat **8** sowohl für das E- als auch für das Z-Isomer plausible Bindemodi gefunden. Hingegen wurde für das Diazocin **9** nur ein Bindemodus für die E-Konfiguration gefunden.

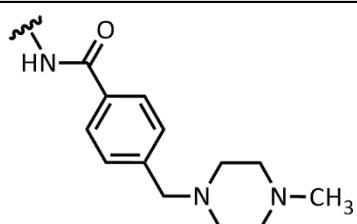
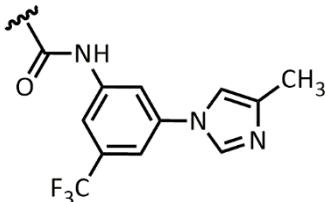
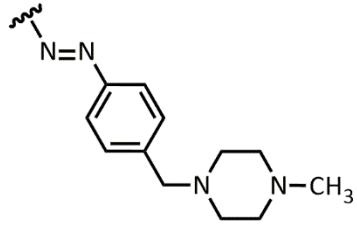
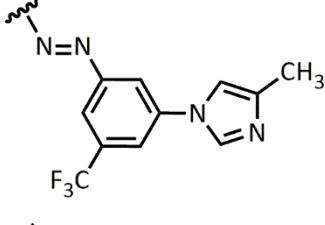
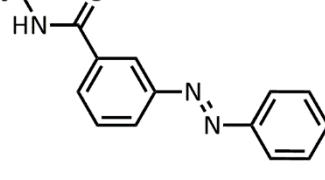
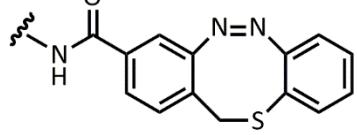
Für das PDGFR- $\beta$  *modelling* wurde ein Homologie-Model basierend auf PDB: 1T46<sup>[130]</sup> verwendet.<sup>[131, 132]</sup> Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit dem ABL-1 *modelling*, mit der Ausnahme von Azonilotinib (**7**) für das auch in der E-Konfiguration kein Bindemodus gefunden werden konnte. Grund dafür ist, dass sich die PDGFR- $\beta$  *deep pocket* etwas vom ABL-1 Modell unterscheidet.



**Abbildung 3.16.** *Molecular modelling* von Imatinib (**4**) und Azoinatinib (**6**) in der DFG<sub>out</sub>-Konformation der Tyrosinkinase ABL-1 (PDB: 2HYY<sup>[126]</sup>). (a) Bindemodus von Imatinib (**4**) in der Bindetasche von ABL-1. Gelb gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen. *Glide docking score*: -13.9. (b) Azologisierung von Imatinib (**4**): Ersatz der Amidbindung des N-Arylbenzamids durch eine photoschaltbare Azobindung führt zu Azoinatinib (**6**). (c) Berechneter Bindemodus von E-Azoinatinib (*E*-**6**) in der Bindetasche von ABL-1. Der Bindemodus ist vergleichbar zu Imatinib (**4**), aber die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Glu-286 und Asp-381 gehen durch den Austausch der Amidbindung verloren. *Glide docking score*: -13.1. (d) Überlagerung von Z-Azoinatinib (Z-**6**) und ABL-1. In Z-Konfiguration ist der Azobenzolrest nicht in der Lage die *deep pocket* der DFG<sub>out</sub>-Konformation zu besetzen. Die Überlagerung mit dem Protein zeigt erhebliche sterische Konflikte (rot gestrichelte Linien). Im *Glide docking* konnte kein Bindemodus gefunden werden.<sup>[124]</sup>

**Tabelle 3.2.** Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem *molecular modelling* der Azoanaloga von Imatinib und Nilotinib. Berechnete *docking scores* sind jeweils für das *E*- und *Z*-Isomer aufgeführt. *Glide docking* wurde sowohl mit ABL-1 Kinase (PDB: 2HYY<sup>[126]</sup> bzw. 3CS9<sup>[63]</sup>) als auch mit PDGFR- $\beta$  (Homologie-Modell basierend auf PDB: 1T46<sup>[130, 132]</sup>) durchgeführt.<sup>[124]</sup>

x: kein Bindemodus gefunden

| # | Rest (R)  | <i>Docking Score (ABL-1)</i> |                    | <i>Docking Score (PDGFR-<math>\beta</math>)</i> |                  |
|---|---|------------------------------|--------------------|---|------------------|
|   |   | <i>E</i> -Isomer             | <i>Z</i> -Isomer   | <i>E</i> -Isomer                                | <i>Z</i> -Isomer |
| 4 |    |                              | -13.9 <sup>a</sup> |   | -12.1            |
| 5 |   |                              | -15.9 <sup>b</sup> |   | -11.9            |
| 6 |  | -13.1 <sup>a</sup>           |                    | x   | -11.6            |
| 7 |  | -13.1 <sup>b</sup>           |                    | x   | x                |
| 8 |  | -12.8 <sup>a</sup>           | -14.9 <sup>a</sup> | -12.1   | -12.8            |
| 9 |  | -14.1 <sup>a</sup>           |                    | x   | x                |

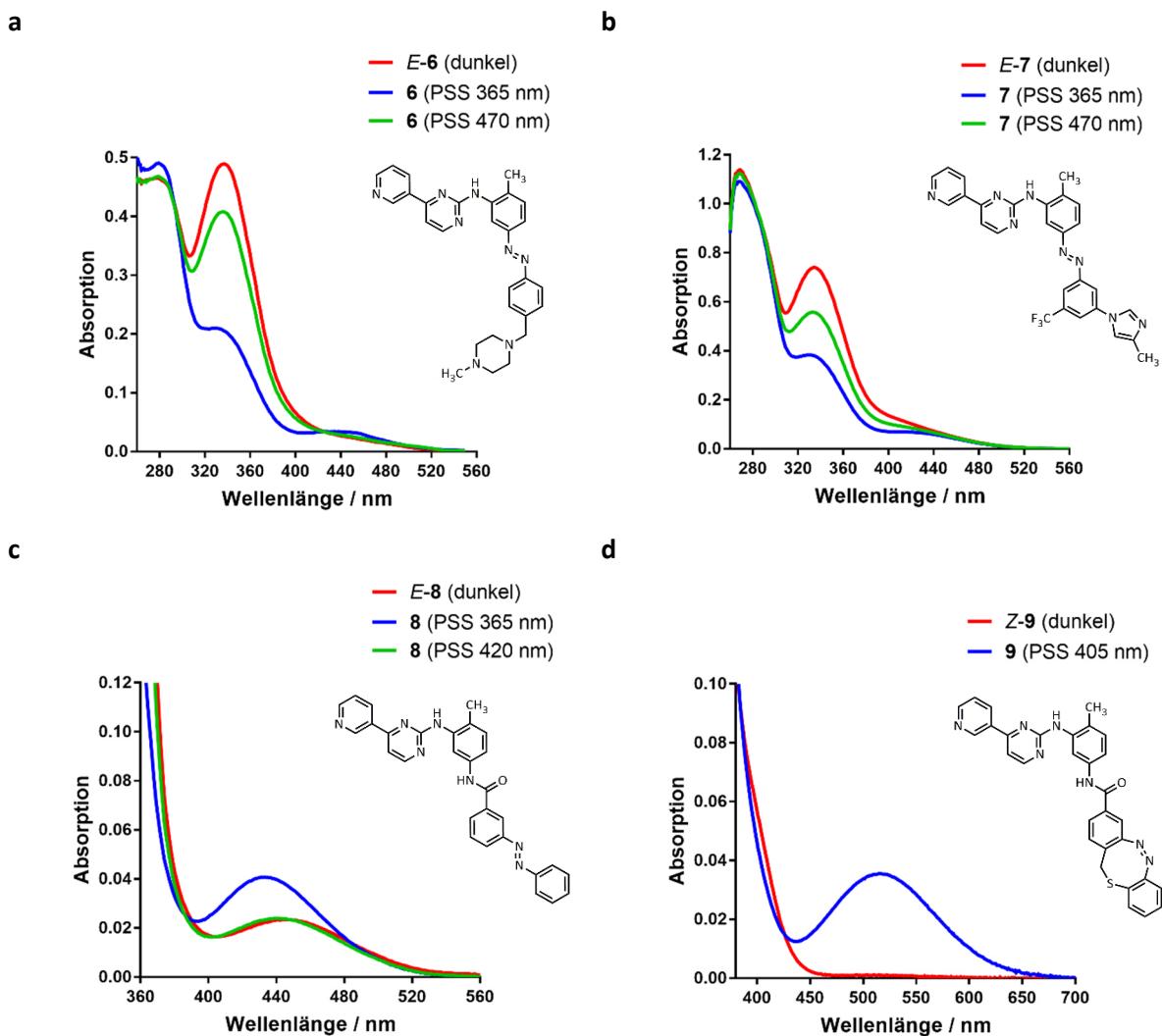
<sup>a</sup> basierend auf Kristallstruktur 2HYY. <sup>b</sup> basierend auf Kristallstruktur 3CS9.

### 3.3.2 Photochemische Charakterisierung

Nach erfolgreicher Synthese wurden von Schmidt mittels UV/VIS-Spektroskopie die optimalen Anregungswellenlängen sowie die thermischen Halbwertszeiten der Azo-Derivate in DMSO bestimmt. Zudem wurden die jeweiligen Anteile der Isomere im PSS per NMR-Spektroskopie ermittelt.<sup>[124]</sup>

Die drei Azobenzol-Derivate **6-8** zeigen vergleichbare Schalteigenschaften. Wie in den UV/VIS-Spektren in Abbildung 3.17 a-c zu sehen, können sie durch Bestrahlung mit 365 nm zum jeweiligen Z-Isomer geschaltet werden. Dabei kann ein Anteil der Z-Isomere zwischen 59-68 % im PSS erreicht werden (siehe Tabelle 3.3). Rückisomerisierung zu den E-Isomeren durch Bestrahlung mit 470 nm (**6** und **7**) bzw. 420 nm (**8**) ist nur teilweise möglich. Die Halbwertszeiten der jeweiligen Z-Isomere bei 37 °C liegen für Azoimatinib (**6**) und Azonilotinib (**7**) mit 10 h und 14.3 h in der gleichen Größenordnung, während das Azobenzol-Derivat mit der erhaltenen Amidbindung (**8**) eine deutlich längere Halbwertszeit von 44.6 h aufweist.

Das Diazocin-funktionalisierte Imatinib-Derivat (**9**) zeigt die für Diazocene typischen photochemischen Eigenschaften.<sup>[21, 22, 118]</sup> Durch Bestrahlung mit 405 nm kann es zum zugehörigen E-Isomer mit einem Anteil von 58 % im PSS geschaltet werden. Eine quantitative Rückschaltung zum Z-Isomer kann durch Bestrahlung mit 520 nm erreicht werden (zur besseren Übersichtlichkeit nicht gezeigt in Abbildung 3.17 d). Die Halbwertszeit von E-**9** bei 37 °C wurde mit 6.1 h bestimmt.



**Abbildung 3.17.** UV/VIS-Spektren der Azobenzol- und Diazocin-funktionalisierten Imatinib- und Nilotinib-Derivate. (a) UV/VIS-Spektrum von Azoimatinib (**6**) unbestrahlt (*E*-Isomer, rot) sowie nach Bestrahlung mit 365 nm (PSS 365 nm, blau) und 470 nm (PSS 470 nm, grün) in DMSO (20 µM). (b) UV/VIS-Spektrum von Azonilotinib (**7**) unbestrahlt (*E*-Isomer, rot) sowie nach Bestrahlung mit 365 nm (PSS 365 nm, blau) und 470 nm (PSS 470 nm, grün) in DMSO (40 µM). (c) Vergrößerte Ansicht der  $\pi\pi^*$ -Bande des Azobenzols **8** unbestrahlt (*E*-Isomer, rot) sowie nach Bestrahlung mit 365 nm (PSS 365 nm, blau) und 470 nm (PSS 420 nm, grün) in DMSO (40 µM). (d) Vergrößerte Ansicht der  $\pi\pi^*$ -Bande des Diazocins **9** unbestrahlt (*Z*-Isomer, rot) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (PSS 405 nm, blau) in DMSO (100 µM). Das Spektrum nach Bestrahlung mit 520 nm ist deckungsgleich mit dem Spektrum des *Z*-Isomers und wurde daher zur besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet.<sup>[124]</sup>

**Tabelle 3.3.** Übersicht der photochemischen Eigenschaften der Azobenzol- und Diazocin-funktionalisierten Imatinib- und Nilotinib-Derivate.  $\lambda_{exc}$ : optimale Anregungswellenlänge, PSS: photostationäres Gleichgewicht,  $t_{1/2}$ : Halbwertszeit der metastabilen Form.<sup>[124]</sup>

| #        | $\lambda_{exc}$ (nm) | PSS ( <i>E/Z</i> %),<br>DMSO (NMR) | $t_{1/2}$ (h), 37 °C,<br>DMSO (UV/VIS) |
|----------|----------------------|------------------------------------|--|
| <b>6</b> | 365                  | 32/68                              | 10.0                                   |
| <b>7</b> | 365                  | 38/62                              | 14.3                                   |
| <b>8</b> | 365                  | 41/59                              | 44.6                                   |
| <b>9</b> | 405                  | 58/42                              | 6.1                                    |

### 3.3.3 Biologische Testung

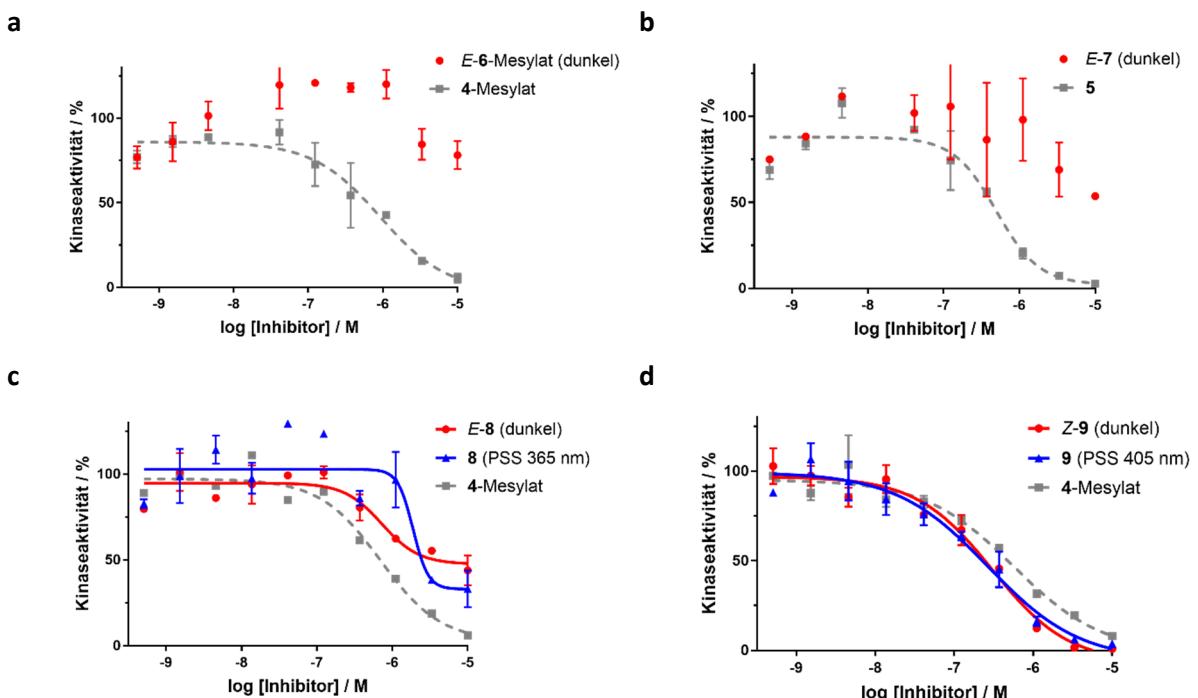
#### 3.3.3.1 PDGFR- $\beta$ Kinaseassay

Die Azoanaloge von Imatinib (**4**) und Nilotinib (**5**) wurden in zwei verschiedenen *in vitro* Kinaseassays auf ihre inhibitorische Aktivität im Vergleich zu den Ursprungssubstanzen getestet. Zunächst wurden PDGFR- $\beta$  Kinaseassays durchgeführt, die bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert waren.<sup>[69, 132, 133]</sup> Diese basieren wie die zuvor beschriebenen BMX, IGFR-1 und VEGFR-2 Assays auf der Umsetzung von ATP (ADP-Glo™ Kinase Assay, Promega). Dadurch, dass hyperphosphorylierte Kinase im Assay verwendet wird, war es zwingend erforderlich, die DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren mit der dauerhaft aktiven (DFG<sub>in</sub>) Kinase für 1 h zu präinkubieren, um das Gleichgewicht in Richtung der inaktiven DFG<sub>out</sub>-Konformation der Kinase zu verschieben.<sup>[132, 134]</sup> Die Handhabung der photosensitiven Testsubstanzen erfolgte in einem abgedunkelten Labor unter Rotlicht.

Dosis-Wirkungsanalysen von Azomatinib (**6**)-Mesylat und Azonilotinib (**7**) (unbestrahlte *E*-Isomere) zusammen mit ihren jeweiligen Referenzen sind in Abbildung 3.18 a und b gezeigt. Leider hat die Azologisierung in beiden Fällen zu einem Verlust der inhibitorischen Aktivität geführt. Für die Azoderivate konnte keine signifikante Kinaseinhibition in Konzentrationen bis zu 10  $\mu$ M gemessen werden. Für die Referenzsubstanzen konnten hingegen moderate Potenzen gegen PDGFR- $\beta$  mit IC<sub>50</sub>-Werten von 726 nM für Imatinib (**4**)-Mesylat und 496 nM für Nilotinib (**5**) ermittelt werden. Die Literaturwerte für Imatinib (**4**) zeigen eine große Spannweite (59 nM bis 607 nM)<sup>[132, 135–138]</sup>, die sich durch die DFG<sub>out</sub>-Problematik von *in vitro* Kinaseassays, in denen phosphorylierte (aktive) Kinase verwendet wird, erklären lässt.<sup>[132]</sup> Für Nilotinib (**5**) lässt sich in der Literatur nur schwerlich ein IC<sub>50</sub>-Wert auf PDGFR- $\beta$  finden (60 nM)<sup>[135]</sup>. Hier sollen in erster Linie die relativen Aktivitäten der Azoderivate im Vergleich zu den jeweiligen Referenzen betrachtet werden. Ein Ersatz der Amidbindungen und damit verbundener Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen scheint dabei, im Gegensatz zu den *modelling* Ergebnissen, zu einer Inaktivierung der Kinaseinhibitoren zuführen.

Folglich wurden zwei Imatinib-Derivate, bei denen die Amidbindungen erhalten wurden, auf ihre inhibitorischen Aktivitäten vor und nach Bestrahlung getestet. Das Azobenzol-funktionalisierte Imatinib-Derivat (**8**) zeigt eine leichte Inhibition von PDGFR- $\beta$ , aber keinen eindeutigen Unterschied in den biologischen Aktivitäten beider Isomere (Abbildung 3.18 c). Nach Bestrahlung mit 365 nm (blau) zeigt das photoschaltbare Imatinib-Derivat zwar eine höhere maximale Kinaseinhibition in den beiden höchsten Testkonzentrationen (10  $\mu$ M und 3  $\mu$ M), aber gleichzeitig auch eine insgesamt geringere Potenz verglichen mit dem unbestrahlten *E*-Isomer (rot). Des Weiteren ist die Restaktivität der Kinase für beide Isomere in der höchsten Konzentration immer noch 30-50 %. Dies deutet auf eine schlechte Wasserlöslichkeit des Azobenzol-Derivates **8** hin.

Das Diazocin-funktionalisierte Imatinib-Derivat (**9**) ist überraschenderweise sogar potenter als das ursprüngliche Imatinib und zeigt keine Anzeichen von Löslichkeitsproblemen (Abbildung 3.18 d). Jedoch kann kein Unterschied in der pharmakologischen Wirkung vor und nach Bestrahlung beobachtet werden (Z-**9**: IC<sub>50</sub> = 305 nM, **9** PSS 405 nm: IC<sub>50</sub> = 268 nM). Die extrem hohe Potenz des Z-Diazocines steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem *Glide docking*, in dem kein Bindemodus für das Z-Isomer gefunden werden konnte. Da im *Glide docking* die Aminosäureketten als rigide betrachtet werden<sup>[127]</sup>, deuten diese biologischen Testdaten auf eine höhere Proteinflexibilität an der zum Lösungsmittel gerichteten Öffnung der Bindetasche hin, die auch eine Bindung des Z-Isomers ermöglicht.



**Abbildung 3.18.** Dosis-Wirkungskurven der Azobenzol- und Diazocin-funktionalisierten Imatinib- und Nilotinib-Derivate in einem *in vitro* PDGFR- $\beta$  Kinaseassay mit einer finalen DMSO-Konzentration von 1 %. (a) E-Azomatinib (**E-6**)-Mesylat unter Lichtausschluss (rot,  $IC_{50} > 10000$  nM) im Vergleich zu Imatinib-Mesylat (**4**, grau gestrichelte Linie,  $IC_{50} = 918$  nM,  $R^2 = 0.93$ ). (b) E-Azonilotinib (**E-7**) unter Lichtausschluss (rot,  $IC_{50} > 10000$  nM) im Vergleich zu Nilotinib (**5**, grau gestrichelte Linie,  $IC_{50} = 496$  nM,  $R^2 = 0.91$ ). (c) Azobenzol-funktionalisiertes Imatinib-Derivat (**8**) unter Lichtausschluss (**E-8**, rot,  $IC_{50} = 723$  nM, Restaktivität (Plateau): 48 %,  $R^2 = 0.85$ ) sowie bestrahlt mit 365 nm (PSS 365 nm, blau,  $IC_{50} = 1889$  nM, Restaktivität (Plateau): 33 %,  $R^2 = 0.77$ ) im Vergleich zu Imatinib-Mesylat (**4**, grau gestrichelte Linie,  $IC_{50} = 694$  nM,  $R^2 = 0.96$ ). (d) Diazocin-funktionalisiertes Imatinib-Derivat (**9**) unter Lichtausschluss (**Z-9**, rot,  $IC_{50} = 305$  nM,  $R^2 = 0.97$ ) sowie bestrahlt mit 405 nm (PSS 405 nm, blau,  $IC_{50} = 268$  nM,  $R^2 = 0.97$ ) im Vergleich zu Imatinib-Mesylat (**4**, grau gestrichelte Linie,  $IC_{50} = 565$  nM,  $R^2 = 0.96$ ). Datenpunkte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar, mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

### 3.3.3.2 ABL-1 Kinaseassay

Ergänzend zu den PDGFR- $\beta$  Kinaseassays, wurden die Bindungsaffinitäten von Azomatinib (**6**), Azonilotinib (**7**) und dem Diazocin-funktionalisierten Imatinib-Derivat (**9**) an ABL-1 Kinase von dem kommerziellen Anbieter DiscoverX (Eurofins, San Diego, USA) ermittelt. ABL-1 kann als ein gut geeignetes Modell für das CML-assoziierte Fusionsprotein BCR-ABL angesehen werden.<sup>[62]</sup> Unter Einsatz von nicht-phosphorylierter ABL-1 wurden in einem kompetitiven Bindungsassay (KINOMEscan™) Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) bestimmt. Die Funktionsweise des Assays beruht hier auf der Verdrängung eines immobilisierten Liganden aus der ATP-Bindetasche der Kinase durch den Inhibitor. Die Menge noch gebundener Kinase wird mittels quantitativer PCR eines DNA-tags der Kinase bestimmt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des PDGFR- $\beta$  Kinaseassays, wurden für Azomatinib (**6**) und Azonilotinib (**7**) sehr hohe  $K_d$ -Werte von 1600 nM bzw.  $> 10000$  nM bestimmt. Ebenfalls wurde für das Diazocin-Derivat (**9**) ein sehr niedriger  $K_d$ -Wert von 3.9 nM bestimmt, der vergleichbar mit dem  $K_d$ -Wert der Referenz Imatinib (1.3 nM<sup>[139]</sup>) ist. Für Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Abschnitt 9.3. Da die Lichtbedingungen während der Assay-Durchführung unklar sind, muss davon ausgegangen

werden, dass ein Gemisch aus beiden Isomeren getestet wurde. Die Ergebnisse aus beiden *in vitro* Assays sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

**Tabelle 3.4.** Kinaseassay-Daten der Imatinib- und Nilotinib-Derivaten aus einem aktivitätsbasierten PDGFR- $\beta$  Kinaseassay (Promega) sowie einem affinitätsbasierten ABL-1 Kinaseassay (DiscoverX).

| # | IC <sub>50</sub> PDGFR- $\beta$ , phosphoryliert (nM) | K <sub>d</sub> ABL-1, nicht-phosphoryliert (nM) |
|---|---|---|
| 4 | 726   | 1.3 <sup>[139]</sup>                            |
| 5 | 496   | 2.9 <sup>[139]</sup>                            |
| 6 | E: > 10000  | 1600 <sup>a</sup>                               |
| 7 | E: > 10000  | > 10000 <sup>a</sup>                            |
| 8 | E: 786 <sup>b</sup><br>PSS 365 nm: 1793 <sup>b</sup>  | n/a   |
| 9 | Z: 305<br>PSS 405 nm: 268                             | 3.9 <sup>a</sup>                                |

<sup>a</sup> unklare Lichtverhältnisse. <sup>b</sup> Restaktivität der Kinase  $\geq 33\%$ .

Im Nachhinein stellte sich heraus, dass die NMR-Auswertung von Azonilotinib (7) aufgrund von geringer Substanzmenge nicht ganz eindeutig ist, sodass nicht mit 100-prozentiger Sicherheit bestätigt werden kann, dass es sich bei der synthetisierten Verbindung wirklich um Azonilotinib (7) handelt. Dies ist entsprechend auch für die biologischen Testergebnisse zu berücksichtigen.

Des Weiteren werden zurzeit noch Messungen zur Stabilität der Verbindungen gegenüber des in beiden Kinaseassays eingesetzten Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Reduktionen photoschaltbarer Azoderivate in biologischen Assays wurden u.a. bereits von Samanta *et al.*, Schehr *et al.* und Kolarski *et al.* beobachtet.<sup>[71, 140, 141]</sup> Während in unseren Experimenten für die Azobenzol-derivate 6, 7 und 8 bisher keine Reduktion beobachtet werden konnte, sind die Ergebnisse für das Diazocin-funktionalisierte Imatinibderivat (9) noch uneindeutig. NMR- sowie LC-MS-Daten liefern erste Hinweise auf eine Konzentrations- und Lösungsmittelabhängigkeit der Reduktion durch DTT.<sup>[142]</sup> Hier müssen weitere Messungen durchgeführt werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Dabei besteht die Schwierigkeit, die Bedingungen des Kinaseassays möglichst genau nachzustellen. Eine Reduktion des Diazocins zum Hydrazin könnte neben der Proteinflexibilität eine weitere Erklärung darstellen, weshalb im PDGFR- $\beta$  Kinaseassay kein Unterschied zwischen bestrahlt und unbestrahlt beobachtet werden kann.

### 3.4 Photoschaltbare Diazocin-basierte Estrogenrezeptor-Agonisten

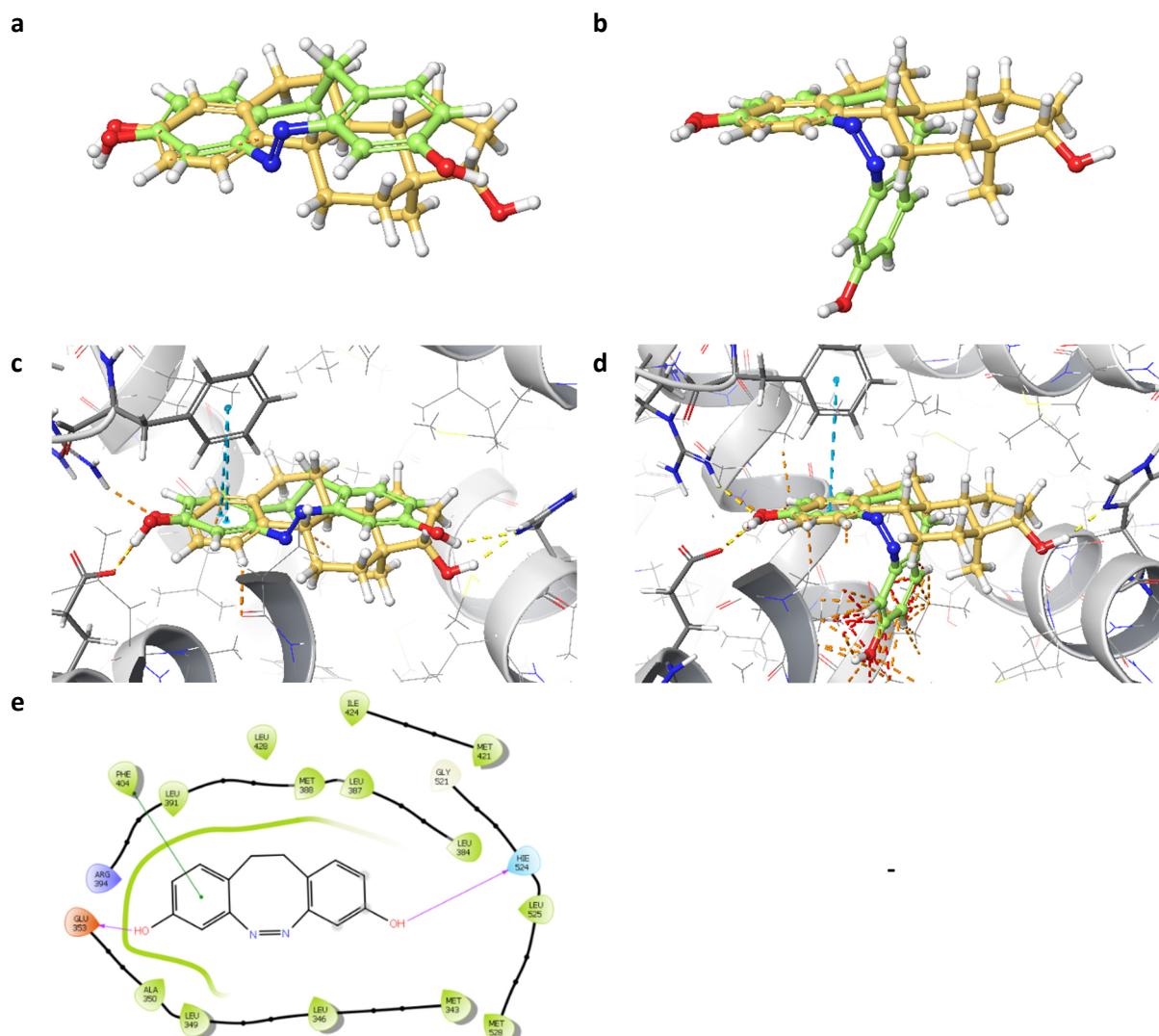
In den vorangegangenen Projekten hat sich gezeigt, dass die Kopplung von Diazocinen an Wirkstoff-Pharmakophore in manchen Fällen zur Inaktivierung des Wirkstoffs führen kann oder dazu, dass trotz guter Schalteigenschaften (in DMSO) kein Unterschied in der biologischen Wirkung der *E*-/*Z*-Konfiguration beobachtet wird. Zudem können Löslichkeitsprobleme im Wässrigen, wie im Beispiel der Diazocin-funktionalisierten Axitinib-Derivate, eine limitierende Rolle spielen. Diese Problematiken sind vermutlich unter anderem auf die Gesamtgröße und geringe Polarität der verknüpften Verbindungen zurückzuführen. Außerdem ist die photoschaltbare Einheit teilweise am Rande der Bindetasche in Richtung der Lösungsmittel-exponierten Öffnung lokalisiert, wo eine höhere Proteinflexibilität möglicherweise eine Adaption an beide Konfigurationen des photoschaltbaren Wirkstoffs erlaubt.

Daher sollte im folgenden Projekt erstmalig das photosensitive Element selbst als Pharmakophor eingesetzt werden, um somit einen erheblichen Strukturunterschied durch die Photoisomerisierung und folglich einen deutlichen Unterschied in den biologischen Aktivitäten beider Isomere zu erzielen. Auf der Suche nach Wirkstoffstrukturen, die eine strukturelle Ähnlichkeit zur *E*-Konfiguration des Diazocins aufweisen und sich zur Entwicklung eines solchen Modellsystems eignen würden, fiel die Ähnlichkeit der räumlichen Anordnung der Benzylringe und des Achtrings des *E*-Diazocins zum Steroidgerüst von Estrogenen auf, insbesondere im Bezug auf die Planarität.

Im *molecular modelling* zeigte sich, dass durch Funktionalisierung des Diazocins mit Hydroxygruppen eine sehr gute strukturelle Übereinstimmung des *E*-Diazocins mit  $\beta$ -Estradiol (hochpotentes, natürlich vorkommendes Estrogen<sup>[143]</sup>) erreicht werden kann. Der Überlagerung des in *meta*-Position zur Azogruppe difunktionalisierten Diazocins **10** in *E*-Konfiguration mit der Struktur des  $\beta$ -Estradiols in Abbildung 3.19 a ist zu entnehmen, dass die Position und der Abstand der Hydroxygruppen analog ist. Für die *Z*-Konfiguration des Diazocins geht diese Übereinstimmung weitestgehend verloren (Abbildung 3.19 b).

*Docking* Studien in der Bindetasche des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (PDB: 1ERE<sup>[144]</sup>) zeigen für den Bindemodus des *E*-Isomers des Diazocins **10** eine hohe Vergleichbarkeit zum Bindemodus des  $\beta$ -Estradiols mit analogen Ligand-Protein Interaktionen. Die Hydroxygruppen beider Liganden bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu denselben Aminosäuren (Glutamat 353 und Histidin 524) aus, zudem gehen beide Liganden ein  $\pi$ - $\pi$  stacking mit Phenylalanin 404 ein (Abbildung 3.19 c; zugehöriges 2D-Ligand-Interaktionsdiagramm für Diazocin **10** Abbildung 3.19 e). Für das *Z*-Isomer des Diazocins **10**, konnte hingegen kein plausibler Bindemodus gefunden werden. Es kommt zu erheblichen sterischen Konflikten in der Rezeptorbindetasche (rot/orange gestrichelte Linien, Abbildung 3.19 d) und die Wasserstoffbrückenbindung zu Histidin 524 geht verloren. Daher ist anzunehmen, dass das *Z*-Diazocin biologisch inaktiv ist, während das *E*-Isomer eine estrogene Aktivität aufweisen sollte.<sup>[145]</sup>

Eine Wirkung am Estrogenrezeptor ist ebenfalls für verschiedene (Hydroxy-funktionalisierte) Stilben- und Azobenzol-Derivate bekannt.<sup>[146]</sup> Dazu gehören u.a. auch Resveratrol und Clomifen, die isomerspezifische estrogene bzw. antiestrogenen Wirkungen zeigen.<sup>[147, 148]</sup> Des Weiteren wurden kürzlich photoschaltbare, Azobenzol-basierte Estrogenrezeptor-Liganden von Tsuchiya und Umeno *et al.* publiziert.<sup>[88]</sup>



**Abbildung 3.19.** Molecular modelling des meta-Dihydroxydiazocins **10** in der Bindetasche des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (PDB: 1ERE<sup>[144]</sup>) im Vergleich zu  $\beta$ -Estradiol. (a) Strukturelle Überlagerung von Diazocin **10** in *E*-Konfiguration (braun) und  $\beta$ -Estradiol (hellblau) zeigt eine hohe Übereinstimmung. (b) Überlagerung von Diazocin **10** in *Z*-Konfiguration (grau) und  $\beta$ -Estradiol (hellblau), zeigt hingegen deutlich weniger Ähnlichkeit. (c) Berechneter Bindemodus von *E*-**10** (braun) in der Rezeptorbindetasche in Überlagerung mit dem originalen Bindemodus von  $\beta$ -Estradiol (hellblau) zeigt für beide Liganden vergleichbare Interaktionen mit den Aminosäureresten der Bindetasche. Wasserstoffbrückenbindungen in Gelb,  $\pi$ - $\pi$  stacking in hellblau. (d) Ungünstiger Bindemodus von *Z*-**10** (grau) in der Rezeptorbindetasche in Überlagerung mit dem originalen Bindemodus von  $\beta$ -Estradiol (hellblau). Für *Z*-**10** zeigt sich eine deutliche sterische Hinderung (rot/orange gestrichelte Linien). (e) 2D-Ligand-Interaktionsdiagramm visualisiert die wichtigsten Interaktionen von *E*-**10** in der Bindetasche.<sup>[145]</sup>

Hydroxy-funktionalisierte Diazocene sollen zunächst ein Modellsystem für den Einsatz des Photoschalters als Pharmakophor darstellen. Gleichzeitig können diese photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Modulatoren aber auch als ein Beispiel für ökotoxikologisch kompatible Wirkstoffe betrachtet werden, die für die Therapie aktiviert werden können, aber inaktiv in die Umwelt entlassen werden (vgl. Ökotoxizität endokriner Disruptoren Kapitel 1.3.4).

Von Ewert wurden verschiedene Hydroxy-funktionalisierte Diazocin-Derivate mit Substitutionen in *meta*- und *para*-Position zur Azogruppe hergestellt (Tabelle 3.5), um deren photochemische Eigenschaften sowie deren Struktur-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen.<sup>[149]</sup>

Da für die Diazocine mit Hydroxygruppen in *para*-Position möglicherweise eine Azo-Hydrazone-Tautomerie auftreten könnte, wie sie für Hydroxyazobenzole bekannt ist<sup>[150, 151]</sup>, wurden zusätzlich Derivate mit einer CH<sub>2</sub>-Brücke zwischen Hydroxygruppe und Benzolring des Diazocins hergestellt. In diesen Benzylalkoholdiazocinen ist die Ausbildung eines chinoiden Systems und die damit einhergehende Hydrazinbildung verhindert. *meta*-Disubstituiertes Diazocin **14** ist analog zu Diazocin **10** und wurde bereits von Moermann aus der Arbeitsgruppe Herges synthetisiert. Gleiches gilt für Amin-Derivat **15**.<sup>[152]</sup> Um deren estrogene Aktivitäten mit Diazocin **10** zu vergleichen, sollten sie ebenfalls charakterisiert werden. Die Benzylalkoholdiazocine **16** und **17** sind analog zu den Verbindungen **12** und **13** mit zusätzlichen CH<sub>2</sub>-Linkern in *para*-Position.

**Tabelle 3.5.** Übersicht der Hydroxy- und Benzylalkohol/amin-diazocine, hergestellt von Ewert<sup>[149]</sup> bzw. Moermann (**14** und **15**)<sup>[152]</sup>.

| #         | Hydroxydiazocene | #         | Benzylalkohol/amin-diazocene |
|-----------|------------------|-----------|------------------------------|
| <b>10</b> |                  | <b>14</b> |                              |
| <b>11</b> |                  | <b>15</b> |                              |
| <b>12</b> |                  | <b>16</b> |                              |
| <b>13</b> |                  | <b>17</b> |                              |

Im Folgenden wird zunächst eine Übersicht über die für die biologische Testung relevanten Schalteigenschaften gegeben, bevor detailliert auf die biochemische Charakterisierung in einem Estrogen-Reporterassay eingegangen wird.

### 3.4.1 Photochemische Charakterisierung

Zur photochemischen Charakterisierung der synthetisierten Diazocine wurden von Ewert mittels UV/VIS-Spektroskopie die optimalen Anregungswellenlängen sowie die Halbwertszeiten bestimmt. Zudem wurden die jeweiligen PSS mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Da die Hydroxyfunktionalisierten Diazocine im Vergleich zu den Verbindungen der vorherigen Projekte eine relativ gute Wasserlöslichkeit zeigten, konnte die Charakterisierung hier neben DMSO auch in wässriger

Lösung durchgeführt werden, um möglichst physiologische Bedingungen nachzustellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Exemplarische UV/VIS-Spektren sind für die Verbindungen **10**, **12** und **16** in Abbildung 3.20 gezeigt. Alle Diazocin-Derivate zeigen in DMSO Diazocin-typische Absorptionsbanden für die jeweiligen *E*-/*Z*-Isomere, mit Absorptionsmaxima der  $n\pi^*$ -Banden des *Z*-Isomers zwischen 403 nm und 414 nm und des *E*-Isomers zwischen 487 nm und 497 nm. Die Verbindungen lassen sich durch Bestrahlung mit 405 nm bzw. 385 nm zum jeweiligen *E*-Isomer schalten und alle können durch Bestrahlung mit 525 nm quantitativ zum *Z*-Isomer zurückgeschaltet werden.<sup>[149]</sup>

Insgesamt fällt auf, dass die Schalteigenschaften der Diazocene stark abhängig von Lösungsmittel und Temperatur sind. So kommt es beim Übergang von DMSO in wässrige Lösung weitestgehend zu einer Verschlechterung des PSS und mit Ausnahme der *para*-substituierten Hydroxydiazocene **12** und **13** bei gleichbleibender Temperatur zunächst zu einer Verlängerung der Halbwertszeiten (Tabelle 3.6). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Lentes *et al.* gemacht.<sup>[153]</sup> Bei einer Erhöhung der Temperatur auf die physiologischen 37 °C kommt es durchgängig zu einer starken Reduktion der Halbwertszeiten. Besonders auffällig ist, dass die *para*-substituierten Hydroxydiazocene **12** und **13** bereits in DMSO sehr kurze Halbwertszeiten (2.4 min bzw. 19.9 s) aufweisen, weshalb auch die PSS im NMR nur unzuverlässig bestimmt werden konnten. Wie dem UV/VIS-Spektrum von Verbindung **12** in Abbildung 3.20 b zu entnehmen ist, tritt hier eine zusätzliche Absorptionsbande bei ca. 610 nm auf. Diese kann dem Hydrazon zugeordnet werden, welches durch eine Azo-Hydrazon-Tautomerie aufgrund der *para*-ständigen Hydroxygruppe angereichert wird (Abbildung 3.20 c).<sup>[151]</sup> Die Azo-Hydrazon-Tautomerie und damit einhergehende Hydrazinbildung ist verantwortlich für die schnelle Rückisomerisierung der *para*-Hydroxydiazocene. Zudem zeigt sich eine Lösungsmittelabhängigkeit der Rückisomerisierung, im protisch polaren Wasser sind die Halbwertszeiten von **12** und **13** zu kurz, um diese mit den gewöhnlichen analytischen Methoden messen zu können. Daher wurden Messungen per Laser-Blitzlichtphotolyse von der Arbeitsgruppe Nonell Marrugat an der Ramon-Llull-Universität in Barcelona<sup>[154]</sup> durchgeführt, bei denen Halbwertszeiten von wenigen Millisekunden erhalten wurden (Tabelle 3.6).

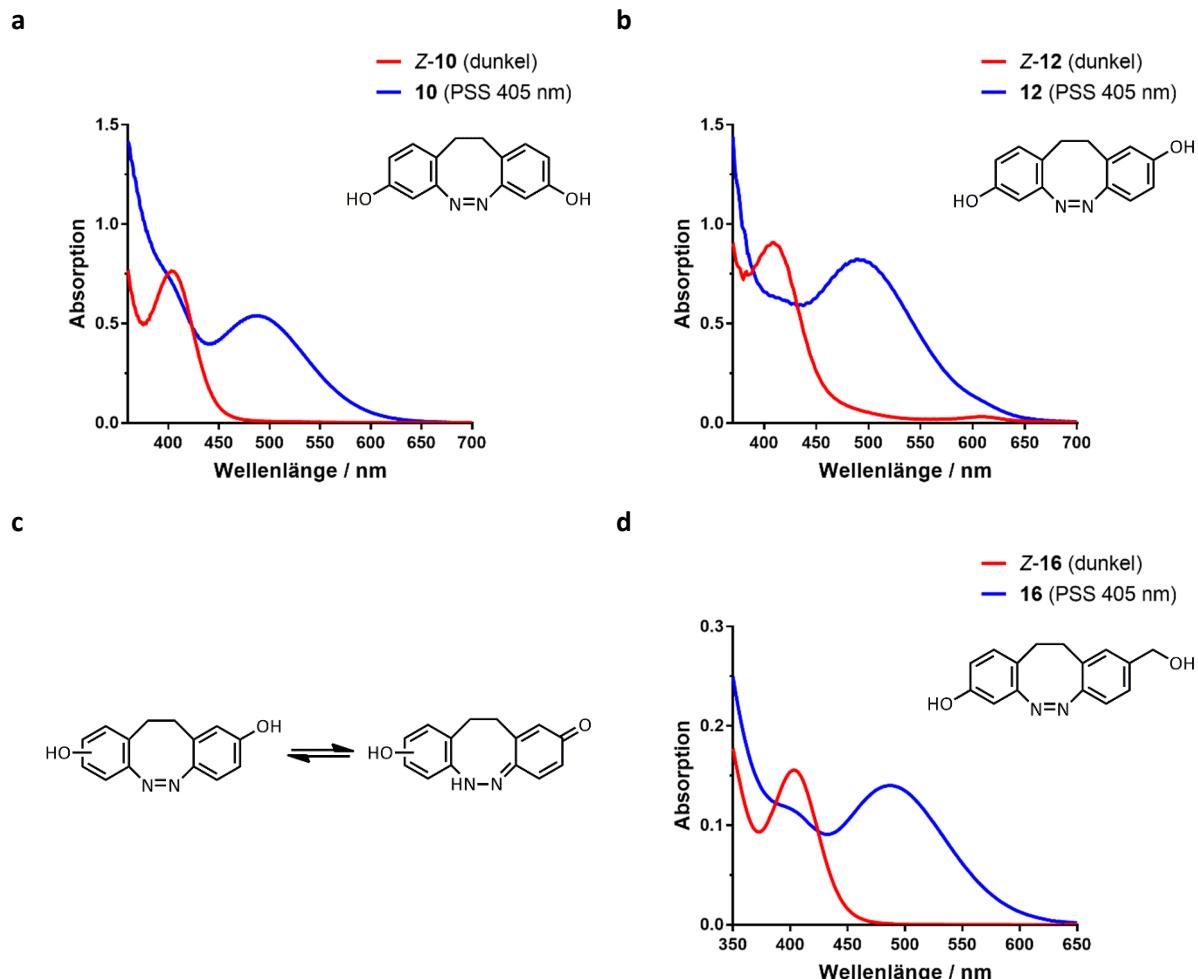
Außerdem wurde die Kinetik des thermischen Relaxationsprozesses genauer untersucht. Dabei wurde zum einen festgestellt, dass der Austausch von H<sub>2</sub>O gegen D<sub>2</sub>O zu einer zwei- bis dreifach langsameren Rückisomerisation führt, was darauf hindeutet, dass der Protonentransfer auf die Azogruppe der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Zum anderen lassen Messungen der Aktivierungsentropien in wässrigem Medium auf einen hochgeordneten Übergangszustand unter Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen schließen.<sup>[154]</sup> Eine Erklärung für die schnelle Rückisomerisierung in Wasser wäre demnach, dass die Azo-Hydrazon-Tautomerie in Wasser durch einen Protonentransfer mittels Grotthuß-Mechanismus beschleunigt ist. Folglich lässt sich festhalten, dass die molekulare Umgebung einen sehr großen Einfluss auf die Halbwertszeit der Diazocene haben kann.

Bei den zu **12** und **13** analogen Benzylalkoholdiazocinen **16** und **17** ist die Azo-Hydrazon-Tautomerie unterbunden, wodurch die Halbwertszeiten auf Größenordnung der *meta*-substituierten Diazocene verlängert werden. Insgesamt zeigen die Benzylalkoholdiazocene gegenüber den Hydroxydiazocinen verbesserte PSS (Tabelle 3.6). Die phenolische Hydroxygruppe bewirkt eine Rotverschiebung der  $\pi\pi^*$ -Bande, was dazu führt, dass diese mit der  $n\pi^*$ -Bande des *Z*-Isomers überlagert. Durch Entkopplung der Hydroxygruppe vom Benzylring kommt es zu einer besseren Bandenseparation und folglich zu einer höheren *Z*→*E* Konversionsrate.

**Tabelle 3.6.** Zusammenfassung der photochemischen Eigenschaften der Hydroxy- bzw. Benzylalkohol-diazocine. Photostationäres Gleichgewicht (PSS) und Halbwertszeiten( $t_{1/2}$ ) wurden jeweils in DMSO sowie in wässriger Lösung bei 25 °C bzw. 37 °C gemessen.<sup>[149]</sup>

| #  | $\lambda_{\text{exc}} (\text{Z} \rightarrow \text{E})$ | PSS <sub>(Z → E)</sub><br>DMSO | $t_{1/2}$ (Konz.)<br>DMSO, 25 °C | PSS <sub>(Z → E)</sub><br>D <sub>2</sub> O <sup>a</sup> | $t_{1/2}$ (Konz.)<br>H <sub>2</sub> O <sup>b</sup> , 25 °C | $t_{1/2}$ (Konz.)<br>H <sub>2</sub> O <sup>b</sup> , 37 °C |
|----|--|--------------------------------|----------------------------------|---|--|--|
| 10 | 405 nm   | 43 % E                         | 12.7 h (1.7 mM)                  | 28 % E  | 42.4 h (200 μM)  | 9.6 h (200 μM)   |
| 11 | 405 nm   | 54 % E                         | 6.6 h (1.0 mM)                   | 39 % E  | 40.7 h (200 μM)  | 5.3 h (200 μM)   |
| 12 | 405 nm   | 55 % E                         | 2.4 min (0.5 mM)                 | n/a   | 35.7 ms (420 μM) <sup>c</sup>                              | 20.9 ms (420 μM) <sup>c</sup>                              |
| 13 | 405 nm   | 29 % E                         | 19.9 s (1.0 mM)                  | n/a   | 14.6 ms (420 μM) <sup>c</sup>                              | 9.2 ms (420 μM) <sup>c</sup>                               |
| 14 | 385 nm   | 81 % E                         | 11.4 h (200 μM)                  | 64 % E  | 31.7 h (200 μM)  | 5.9 h (200 μM)   |
| 15 | 385 nm   | 75 % E                         | 10.1 h (200 μM)                  | 63 % E  | n/a  | 4.8 h (200 μM) <sup>d</sup>                                |
| 16 | 385 nm   | 58 % E <sup>e</sup>            | 11.2 h (200 μM) <sup>e</sup>     | 40 % E  | 26.1 h (200 μM)  | 6.1 h (200 μM)   |
| 17 | 385 nm   | 83 % E                         | 4.0 h (200 μM)                   | 71 % E  | 15.2 h (200 μM)  | 4.5 h (200 μM)   |

<sup>a</sup> D<sub>2</sub>O enthält aus Löslichkeitsgründen 10 % DMSO. <sup>b</sup> H<sub>2</sub>O enthält 2 % DMSO. <sup>c</sup> Messung mittels Laser-Blitzlichtphotolyse<sup>[154]</sup>. <sup>d</sup> H<sub>2</sub>O enthält 6 % DMSO. <sup>e</sup> In DMSO Bestrahlung mit 405 nm.



**Abbildung 3.20.** UV/VIS-Spektren der Hydroxy-funktionalisierten Diazocine **10**, **12** und **16** in DMSO. (a) UV/VIS-Spektrum des *meta*-Dihydroxydiazocins **10**, unbestrahlt (Z-Isomer) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (PSS 405 nm) in DMSO (1.7 mM). (b) UV/VIS-Spektrum des asymmetrischen Diazocins **12**, unbestrahlt (Z-Isomer) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (PSS 405 nm) in DMSO (0.5 mM). (c) Azo-Hydrazo-Tautomerie der in *para*-Position zur Azogruppe funktionellisierten Diazocine **12** und **13**. (d) UV/VIS-Spektrum des Benzylalkoholdiazocins **16**, unbestrahlt (Z-Isomer) sowie nach Bestrahlung mit 405 nm (PSS 405 nm) in DMSO (200 µM).<sup>[149]</sup>

### 3.4.2 Biologische Testung

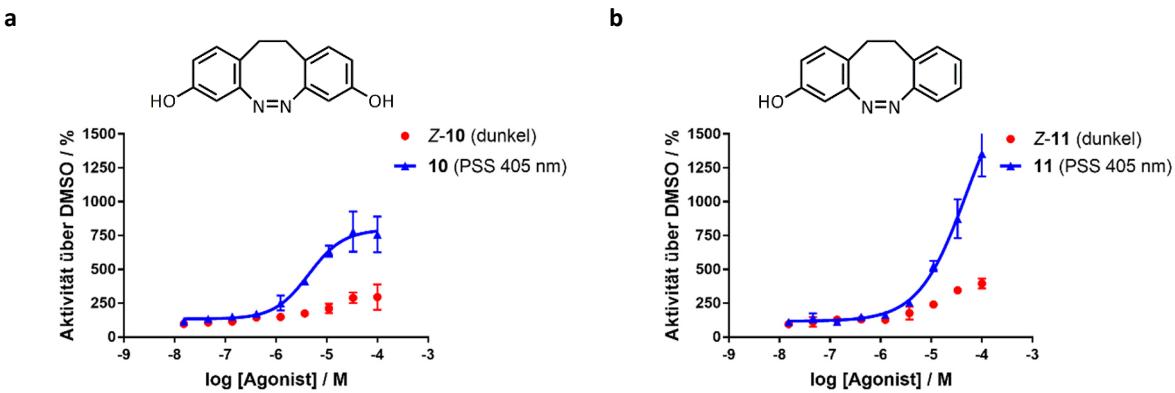
Um die estrogenen Aktivitäten der *E*- und *Z*-Konfigurationen der verschiedenen Diazocine zu messen, wurde ein zellbasierter Reportergen Assay vergleichbar zu Literaturmethoden etabliert.<sup>[155–159]</sup> Dafür wurden Estrogenrezeptor (ER)-positive MCF-7 Brustkrebszellen verwendet und mit Plasmiden transfiziert, die die Gensequenz für *firefly*-Luciferase unter der Kontrolle des *estrogen response element* (ERE) enthalten. Wenn ein ER-Ligand estrogene Aktivität aufweist, wird das ERE aktiviert und führt zur Expression der *firefly*-Luciferase. Die Lumineszenz, die bei der Luciferase-katalysierten Reaktion entsteht, wurde schließlich ausgelesen. Dieses Lumineszenzsignal ist proportional zur estrogenen Aktivität des Liganden. Dieser zellbasierte Assay bietet zum einen den Vorteil, dass zwischen agonistischer und antagonistischer Wirkung unterschieden werden kann. Zum anderen besteht hier keine Problematik einer Interferenz zwischen Diazocinen und Auslesungsassay, wie es bei kommerziell erhältlichen Fluoreszenz-basierten ER-Ligand-Bindungsassays der Fall sein könnte.

Zunächst wurde der Reportergen Assay für die Referenz  $\beta$ -Estradiol etabliert, dabei konnte die Inkubationszeit des Estrogens mit den transfizierten Zellen auf 15 h minimiert werden. Der für  $\beta$ -Estradiol bestimmte EC<sub>50</sub>-Wert ( $13.4 \pm 1.7$  pM, exemplarische Dosis-Wirkungskurve siehe Anhang Abbildung 9.2) ist in Übereinstimmung mit der Literatur ( $15 \pm 2$  pM)<sup>[85]</sup>. Außerdem konnte für *para*-Hydroxyazobenzol-Derivate im zellulären Reportergen Assay eine starke estrogene Aktivität nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung 9.3), die literaturbekannt ist.<sup>[146, 160]</sup>

Dosis-Wirkungsuntersuchungen der photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Modulatoren wurden wie zuvor in einem abgedunkelten Labor unter Rotlicht durchgeführt, um unkontrollierte Isomerisierung zu vermeiden. Jede Verbindung wurde unbestrahlt (dunkel, Z-Isomer) sowie bestrahlt (PSS 405 nm bzw. 385 nm) getestet. Für die PSS Testung wurden die Substanzen zunächst in DMSO vor Zugabe zu den Zellen bestrahlt wegen des besseren PSS in DMSO gegenüber wässrigem Medium. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten der *E*-Diazocine bei 37 °C war eine lediglich einmalige Bestrahlung nicht ausreichend, um eine estrogene Wirkung im Zellassay nachzuweisen (siehe Anhang Abbildung 9.4). Folglich wurde der Zellassay daher alle 3 h während der 15-stündigen Inkubationszeit bestrahlt. Zu diesem Zweck wurde eine speziell angefertigte Lampe für den Zellinkubator verwendet, die mit Hilfe eines Timers programmiert werden konnte (für Lampenspezifikationen siehe Abschnitt 5.6). Vorab wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie die Intensität und Dauer der Bestrahlung bestimmt, die notwendig ist, um das PSS der Diazocine zu erreichen (siehe Anhang Abschnitt 9.5). Des Weiteren wurde die Bestrahlungstoleranz des Zellassays überprüft, indem Dosis-Wirkungskurven der Referenz  $\beta$ -Estradiol mit und ohne Bestrahlung aufgenommen wurden (siehe Anhang Abbildung 9.5 bis Abbildung 9.8). In jedem Assay wurde die Referenz  $\beta$ -Estradiol, als eine Orientierung für die maximale estrogene Aktivität mitgeführt, da die Expression des ER von Zellpassage zu Zellpassage variiert. Maximale relative Aktivitäten (max. rel. Akt.) in Bezug auf die maximale Aktivität von  $\beta$ -Estradiol sind für alle Testverbindungen mit und ohne Bestrahlung in Tabelle 3.7 gegeben.

### 3.4.2.1 Hydroxydiazocine im Reportergen Assay

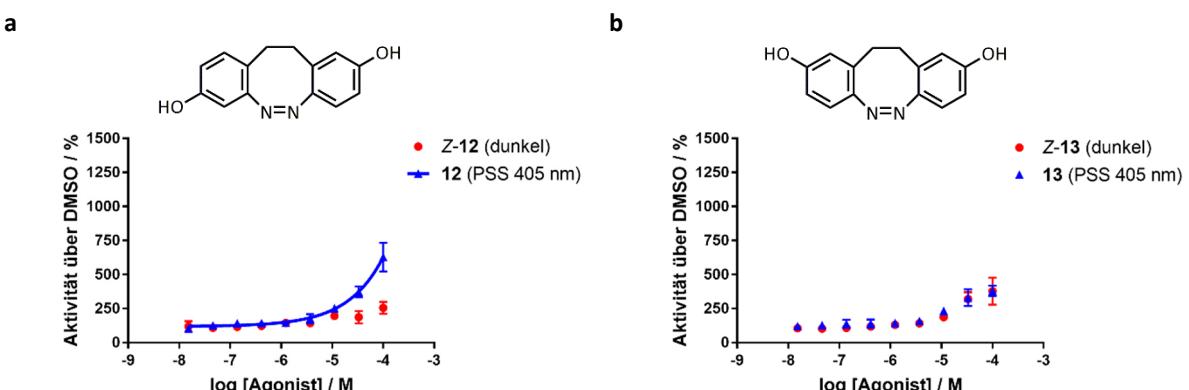
Die *meta*-substituierten Diazocine **10** und **11** (Abbildung 3.21) zeigen deutliche Anstiege in der estrogenen Aktivität nach Bestrahlung mit 405 nm alle 3 h (blaue Dreiecke, max. rel. Akt.:  $68.2 \pm 10.8\%$  (**10**) bzw.  $114.2 \pm 17.9\%$  (**11**)). Hingegen weisen die unbestrahlten Verbindungen nur geringfügige estrogene Aktivitäten in den höchsten Konzentrationen auf (rote Kreise, max. rel. Akt.:  $27.1 \pm 2.6\%$  (**10**) bzw.  $38.8 \pm 6.4\%$  (**11**)). Das bestrahlte disubstituierte Diazocin **10** zeigt dabei einen besseren EC<sub>50</sub>-Wert ( $4.7 \pm 1.2$   $\mu$ M) als das monosubstituierte Diazocin **11** ( $EC_{50} = 38.0 \pm 13.1$   $\mu$ M). Verglichen mit dem extrem potenten  $\beta$ -Estradiol ( $EC_{50} = 13.4 \pm 1.7$  pM), scheinen die Diazocine nur schwache Estrogenrezeptor Agonisten zu sein. Beachtet man jedoch, dass im PSS in wässriger Lösung nur 28% (**10**) bzw. 39% (**11**) *E*-Isomer vorliegen, ist davon auszugehen, dass die *E*-Diazocine ebenfalls hochpotent sind.



**Abbildung 3.21.** Estrogene Aktivitäten der *meta*-substituierten Diazocine **10** und **11** in einem zellbasierten Reportergen Assay. (a) Disubstituiertes Diazocin **10**, unbestrahlten (**Z-10**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlten mit 405 nm alle 3 h (PSS 405 nm, blaue Dreiecke,  $EC_{50} = 4.7 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ). (b) Monosubstituiertes Diazocin **11**, unbestrahlten (**Z-11**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlten mit 405 nm alle 3 h (PSS 405 nm, blaue Dreiecke,  $EC_{50} = 38.0 \pm 13.1 \mu\text{M}$ ). Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für mindestens drei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.  $EC_{50}$ -Werte sind Mittelwerte der biologischen Replikate  $\pm$  SD.

Überraschenderweise zeigt auch das asymmetrische Diazocin **12** eine moderate estrogene Aktivität nach Bestrahlung im 3 h-Takt (Abbildung 3.22 a, max. rel. Akt.:  $52.3 \pm 5.2 \%$ ,  $EC_{50}$  kann nicht zuverlässig bestimmt werden). Trotz der extrem kurzen Halbwertszeit (2.4 min in DMSO, 20.9 ms in Wasser bei  $37^\circ\text{C}$ ), kann im Assay ein Effekt beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass das *E*-Diazocin möglicherweise in der hydrophoben Rezeptorbindetasche stabilisiert wird, was zu einer Verlängerung der Halbwertszeit führt. Bereits in der photochemischen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit stark abhängig von der molekularen Umgebung ist. Eine noch häufigere Bestrahlung des Diazocins **12** (alle 30 min anstatt alle 3 h), führte nicht zu einem weiteren Anstieg der estrogenen Aktivität (siehe Anhang Abbildung 9.9 a).

Für das *para*-disubstituierte Diazocin **13** konnte hingegen keine deutliche estrogene Aktivität beobachtet werden, weder nach Bestrahlung im 3 h-Takt (Abbildung 3.22 b) noch nach Bestrahlung alle 30 min (Anhang Abbildung 9.9 b). Dies lässt vermuten, dass die Halbwertszeit des *E*-Isomers (19.9 s in DMSO, 9.2 ms in Wasser bei  $37^\circ\text{C}$ ) zu kurz ist für eine effektive Bindung am Rezeptor.

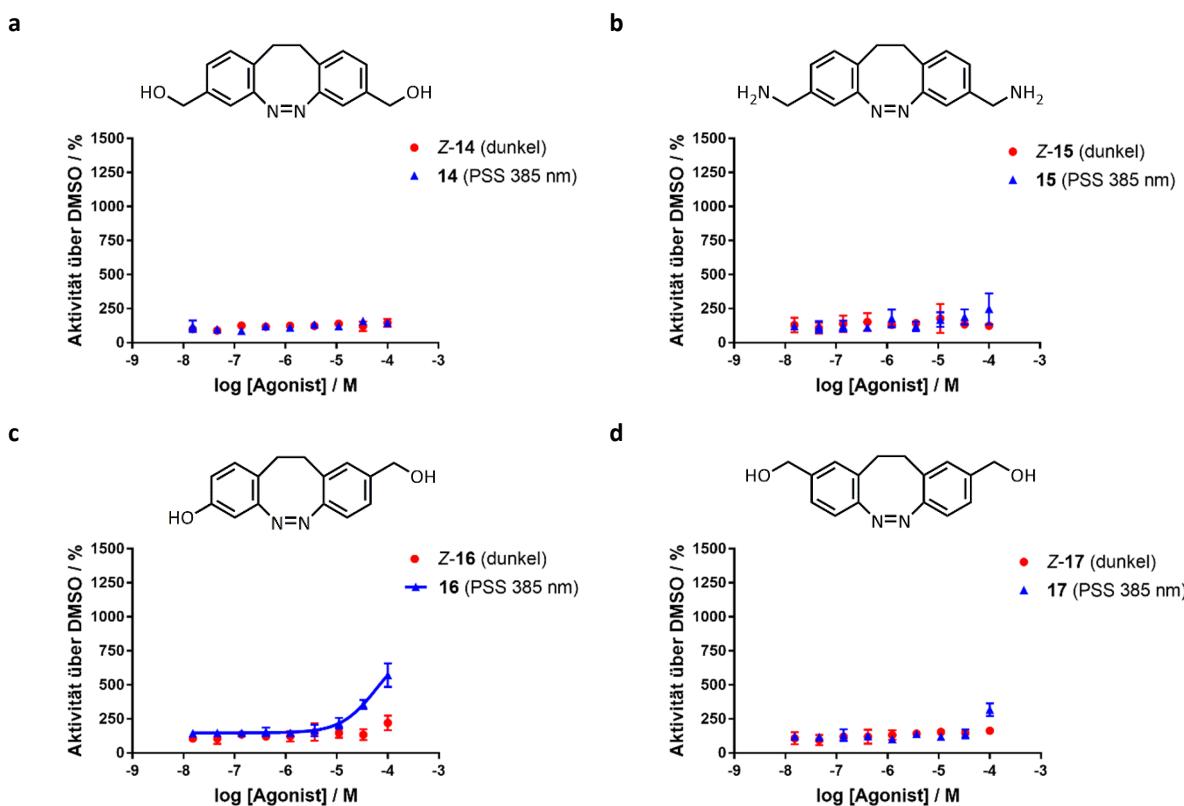


**Abbildung 3.22.** Estrogene Aktivitäten der *para*-substituierten Diazocine **12** und **13** in einem zellbasierten Reportergen Assay. (a) Asymmetrisches Diazocin **12**, unbestrahlten (**Z-12**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlten mit 405 nm alle 3 h (PSS 405 nm, blaue Dreiecke,  $EC_{50}$  ist nicht zuverlässig bestimmbar). (b) *para*-disubstituiertes Diazocin **13**, unbestrahlten (**Z-13**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlten mit 405 nm alle 3 h (PSS 405 nm, blaue Dreiecke). Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für mindestens drei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.

### 3.4.2.2 Benzylalkoholdiazocine im Reportergen Assay

Im Anschluss wurden die Benzylalkoholdiazocine **14-17** getestet, die in der photochemischen Charakterisierung verbesserte Halbwertszeiten für die *para*-substituierten Diazocine sowie vielversprechende PSS zeigten. Leider scheint die Einführung des CH<sub>2</sub>-Linkers mit einem Verlust der estrogenen Aktivität einherzugehen, wie für die Diazocine **14**, **15** und **17** (Abbildung 3.23 a, b und d) beobachtet wurde. Trotz der verbesserten photochemischen Eigenschaften konnte kein signifikanter Anstieg in der estrogenen Aktivität nach Bestrahlung mit 385 nm alle 3 h detektiert werden. Ursächlich dafür könnte zum einen die größere Distanz zwischen den Hydroxygruppen in den Benzylalkoholdiazocinen sein und zum anderen die geringere Acidität dieser Hydroxygruppen im Vergleich zu den phenolischen Hydroxygruppen, die dazu führt, dass schwächere Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden.

Nur die asymmetrische Verbindung **16** (Abbildung 3.23 c), in der eine Hydroxygruppe noch direkt mit dem Benzolring verknüpft ist, zeigt einen deutlichen Anstieg in der estrogenen Aktivität nach Bestrahlung mit 385 nm alle 3 h (max. rel. Akt.: 81.4 ± 1.1 %, EC<sub>50</sub> kann nicht zuverlässig bestimmt werden), der vergleichbar zu den Diazocinen **10-12** ist.



**Abbildung 3.23.** Estrogene Aktivitäten der Benzylalkoholdiazocine **14-17** in einem zellbasierten Reportergen Assay. (a) *meta*-disubstituiertes Diazocin **14**, unbestrahl (Z-**14**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 385 nm alle 3 h (PSS 385 nm, blaue Dreiecke). (b) Aminderivat **15**, unbestrahl (Z-**15**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 385 nm alle 3 h (PSS 385 nm, blaue Dreiecke). (c) Asymmetrisches Diazocin **16**, unbestrahl (Z-**16**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 385 nm alle 3 h (PSS 385 nm, blaue Dreiecke, EC<sub>50</sub> nicht zuverlässig bestimmbar). (d) *para*-disubstituiertes Diazocin **17**, unbestrahl (Z-**17**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 385 nm alle 3 h (PSS 385 nm, blaue Dreiecke). Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für drei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten ± Standardabweichung dar.

**Tabelle 3.7.** Übersicht der maximalen relativen Aktivitäten der Hydroxy- bzw. Benzylalkohol-diazocene **10–17** in Bezug auf die maximale Aktivität von  $\beta$ -Estradiol im jeweiligen Estrogen-Reporterassay. Jede Verbindung wurde unbestrahlert (dunkel, Z-Isomer) sowie bestrahlt im 3 h-Takt (PSS 405 nm bzw. 385 nm) getestet. Die Angaben stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar. Jede Verbindung wurde in technischen Triplikaten in mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten getestet.

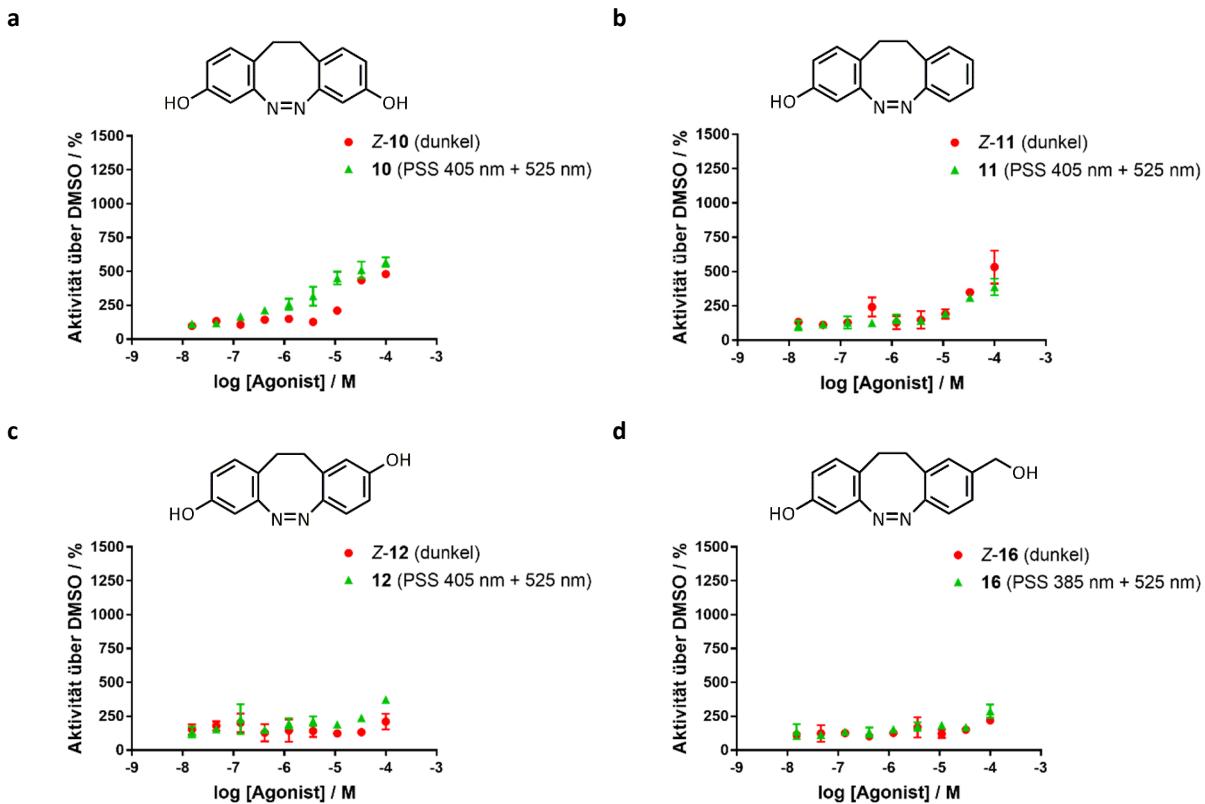
| #         | max. relative Aktivität<br>Z-Isomer (dunkel) | max. relative Aktivität<br>PSS 405 nm / 385 nm |
|-----------|--|--|
| <b>10</b> | 27.1 $\pm$ 2.6 %                             | 68.2 $\pm$ 10.8 %                              |
| <b>11</b> | 38.8 $\pm$ 6.4 %                             | 114.2 $\pm$ 17.9 %                             |
| <b>12</b> | 20.5 $\pm$ 2.9 %                             | 52.3 $\pm$ 5.2 %                               |
| <b>13</b> | 46.3 $\pm$ 16.2 %                            | 44.5 $\pm$ 17.7 %                              |
| <b>14</b> | 16.0 $\pm$ 4.9 %                             | 19.7 $\pm$ 10.7 %                              |
| <b>15</b> | 13.7 $\pm$ 4.8 %                             | 34.0 $\pm$ 22.2 %                              |
| <b>16</b> | 33.0 $\pm$ 4.3 %                             | 81.4 $\pm$ 1.1 %                               |
| <b>17</b> | 23.7 $\pm$ 3.9 %                             | 45.4 $\pm$ 9.4 %                               |

Für die Verbindungen, die keinen estrogenen Effekt im Reportergen Assay zeigten, wurden exemplarisch die *para*-disubstituierten Diazocene **13** und **17** auf eine antagonistische Wirkung getestet. Dafür wurden die funktionalisierten Diazocene zusammen mit  $\beta$ -Estradiol im Reportergen Assay getestet, um zu untersuchen, ob die Diazocene die estrogene Aktivität des  $\beta$ -Estradiols herabsetzen können. Als Positivkontrolle für eine antagonistische Wirkung wurde Raloxifen verwendet (siehe Anhang Abbildung 9.10). Für beide Diazocene **13** und **17** konnte kein antagonistischer Effekt beobachtet werden, weder für die unbestrahlten Z-Isomere, noch nach Bestrahlung alle 3 h (Abbildung 9.11).

### 3.4.2.3 Aktive Rückschaltung der Diazocene im Reportergen Assay

Zusätzlich sollte nachgewiesen werden, dass die Diazocene nicht nur thermisch durch Isomerisierung zum Z-Isomer inaktiviert werden können, sondern auch durch Bestrahlung mit 525 nm während des Zellassays. Eine kontrollierte Inaktivierung zusammen mit der bereits gezeigten kontrollierten Aktivierung würde diese Diazocene zu wertvollen *tool*-Verbindungen für Studien von z.B. Signaltransduktionskaskaden machen.

Zu diesem Zweck wurde der Zellassay zusätzlich ca. 10 min nach der üblichen Bestrahlung mit 405 nm bzw. 385 nm mit 525 nm bestrahlt (alle 3 h). Alle vier Diazocin-Derivate, die eine estrogene Wirkung im Reporterassay zeigten (*meta*-substituierte Diazocene **10** und **11** sowie asymmetrische Diazocene **12** und **16**), konnten durch die zusätzliche Bestrahlung mit 525 nm erfolgreich inaktiviert werden. Dabei konnten die Dosis-Wirkungskurven der unbestrahlten Z-Diazocene nahezu reproduziert werden (siehe Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24.** Inaktivierung der *meta*-substituierten Diazocine **10** und **11** sowie der asymmetrischen Diazocine **12** und **16** in einem zellbasierten Reportergen Assay durch Bestrahlung mit 525 nm. (a) Disubstituiertes Diazocin **10**, unbestrahlt (Z-**10**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 405 nm und 525 nm (ca. 10 min später) alle 3 h (PSS 405 nm + 525 nm, grüne Dreiecke). (b) Monosubstituiertes Diazocin **11**, unbestrahlt (Z-**11**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 405 nm und 525 nm (ca. 10 min später) alle 3 h (PSS 405 nm + 525 nm, grüne Dreiecke). (c) Diazocin **12**, unbestrahlt (Z-**12**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 405 nm und 525 nm (ca. 10 min später) alle 3 h (PSS 405 nm + 525 nm, grüne Dreiecke). (d) Diazocin **16**, unbestrahlt (Z-**16**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 385 nm und 525 nm (ca. 10 min später) alle 3 h (PSS 385 nm + 525 nm, grüne Dreiecke). Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für zwei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Photopharmakologie verfolgt eine einmalige oder reversible Kontrolle von Wirkstoffaktivitäten mit hoher zeitlicher und räumlicher Präzision durch den Einsatz von Licht. Damit soll eine Minimierung von Nebenwirkungen und Umweltbelastungen erreicht sowie die Entwicklung photoschaltbarer *tool*-Verbindungen zur Erforschung von Signalkaskaden gefördert werden.

Ziel dieser Arbeit war die biologische Charakterisierung verschiedener Photoschalter mit besonderem Hinblick auf die Eignung von Diazocinen für photopharmakologische Anwendungen. In diesem Zusammenhang wurden drei Projekte zu photoschaltbaren Kinaseinhibitoren sowie ein Projekt zu photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Agonisten bearbeitet. Während die Kinaseinhibitor-Pharmakophore vorrangig mit Azobenzolen bzw. Diazocinen funktionalisiert wurden, wurde im Estrogen-Projekt ein neues Photoschalter-Design verfolgt; hier stellt das photoschaltbare Element (Diazocin) selbst das Pharmakophor dar.

### 4.1 Photoschaltbare Diazocin-funktionalisierter CK1 $\delta$ -Inhibitoren

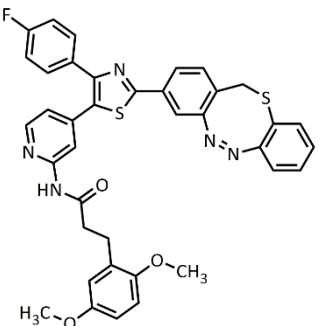
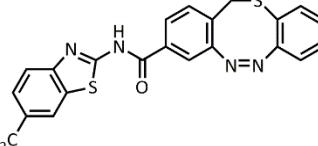
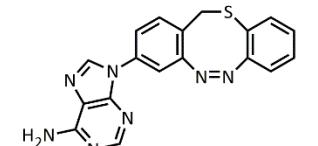
Im ersten Projekt stand die *target*-Identifizierung dreier ursprünglich als CK1 $\delta$ -Inhibitoren entwickelter, Diazocin-basierter Photoschalter im Fokus. Die Ergebnisse der photochemischen und biologischen Charakterisierung sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Unter anderem BMX und IGF-1R, die als *hits* aus einem Kinase-*screening* für das Diazocin-funktionalisierte 4,5-Diaryl-thiazol **1** sowie das Diazocin-funktionalisierte Benzthiazol-Derivat **2** hervorgingen, konnten in separaten Kinaseassays nicht bestätigt werden. Die falsch-positiven *hits* im *high throughput screening* können eventuell auf eine Aktivität der Verbindungen als *pan-assay interference compounds* (PAINS) zurückzuführen sein.<sup>[112, 113]</sup> Das Diazocin-funktionalisierte Adenin **3** ergab im Kinase-*screening* keinen einzigen *hit*, allerdings konnte mittels Ligand-*alignment* in einem virtuellen *screening* eine gute strukturelle Übereinstimmung mit einem Adenosin-Desaminase (ADA)-Inhibitor gefunden werden. Im daraufhin durchgeföhrten ADA-Assay konnte jedoch auch dieses *target* nicht bestätigt werden. Vermutlich wurde im virtuellen *screening* nicht ausreichend berücksichtigt, dass das Diazocin im Vergleich zum Referenzinhibitors eine deutlich geringere Flexibilität aufweist.

Bei der Zelltestung an HUVECs zeigte Verbindung **1** ebenfalls keine Wirkung. Für die Verbindungen **2** und **3** waren in erster Linie zytotoxische Effekte ohne Unterschied zwischen bestrahlt und unbestrahlt zu beobachten. Die Zellassays sollten nochmal mit mehrfacher Zwischenbestrahlung während der 48-stündigen Inkubationszeit wiederholt werden, aufgrund der unzureichenden Halbwertszeiten der Verbindungen.

Das gekoppelte Diazocin scheint in den meisten Fällen sterisch zu anspruchsvoll für die Bindung im Protein zu sein mit der Ausnahme von Derivat **2**, welches eine Inhibition von CK1 $\delta$  zeigte. Allerdings konnte dabei kein Unterschied in der photopharmakologischen Wirkung mit und ohne Bestrahlung beobachtet werden. Somit scheint ein sehr schmaler Justierungsbereich zwischen kompletter Inaktivität und Aktivität beider Isomere vorzuliegen. Derzeit wird im Arbeitskreis Baumann an der Universität Köln versucht, eine Röntgenkristallstruktur von Verbindung **2** unter Belichtung in CK1 $\delta$  aufzunehmen, um den Bindemodus des Inhibitors genauer analysieren zu können.<sup>[161]</sup>

Zudem lieferten NMR-spektroskopische Untersuchungen, die im Arbeitskreis Dötsch an der Universität Frankfurt durchgeführt wurden, Hinweise auf eine kovalente Bindung des Diazocins **2** an CK1 $\delta$  nach Bestrahlung.<sup>[162]</sup>

**Tabelle 4.1.** Zusammenfassung der photochemischen sowie biologischen Charakterisierung der Diazocin-funktionalisierten CK1 $\delta$ -Inhibitoren **1-3**.

| #        | Struktur  | $\lambda_{\text{exc}}$ (nm) | PSS (E/Z %),<br>DMSO<br>(NMR) | $t_{1/2}$ (h),<br>DMSO<br>(UV/VIS) | biologische Testung  |
|----------|---|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
| <b>1</b> |    | 405                         | 47/53                         | 19                                 | inaktiv auf CK1 $\delta$ , p38 $\alpha$<br>MAPK, SCR, BMX und<br>IGF-1R  |
| <b>2</b> |   | 405                         | 57/43                         | 18                                 | aktiv auf CK1 $\delta$ , aber<br>kein Unterschied<br>bestrahlt/unbestrahlt;<br>inaktiv auf p38 $\alpha$ MAPK,<br>SCR, BMX und IGF-1R |
| <b>3</b> |  | 405                         | 60/40                         | 21                                 | inaktiv auf ADA und<br>allen Kinasen im<br>ProQinase-Screening   |

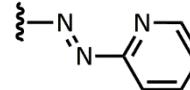
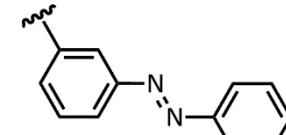
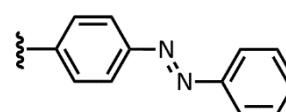
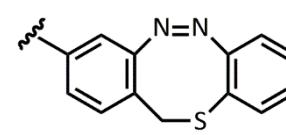
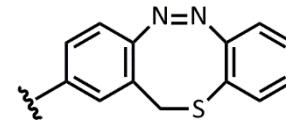
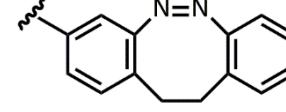
## 4.2 Photoschaltbare Azo- und Diazocin-funktionalisierte Derivate des VEGFR-2 Inhibitors Axitinib

Für verschiedene Azo- und Diazocin-funktionalisierte Derivate des zugelassenen VEGFR-2 Inhibitors Axitinib konnte geschlussfolgert werden, dass die Diazocin-Derivate im Hinblick auf ihre photopharmakologische Wirkung den Azoderivaten deutlich überlegen sind (Tabelle 4.2).<sup>[118]</sup> Für die Schwefel-Diazocene **V5** und **V6** konnten dabei phototherapeutische Indices (Faktor Unterschied in der biologischen Potenz mit und ohne Bestrahlung) > 40 erreicht werden. Im Vergleich zu bereits publizierten Azo-basierten *small molecule* Kinaseinhibitoren mit phototherapeutischen Indices zwischen 1.6 und 11<sup>[70-72]</sup> ist dies eine deutliche Verbesserung und ein erster Schritt auf dem Weg hin zu möglichst großen photopharmakologischen Wirkunterschieden.

Als problematisch ist allerdings die schlechte Wasserlöslichkeit der Verbindungen anzusehen. Daher sollten hier weitere Bemühungen angestrebt werden, physikochemische Parameter wie die Wasserlöslichkeit zu verbessern. Dabei besteht die Schwierigkeit darin, die Schalteigenschaften sowie die biologische Aktivität zu erhalten. Insbesondere die von Lentes *et al.* publizierten -NAc-CH<sub>2</sub>- und

$-\text{NCHO}-\text{CH}_2-$  verbrückten Diazocine zeigen gute Wasserlöslichkeiten sowie sehr gute Schalt-eigenschaften auch in wässriger Lösung.<sup>[23, 153, 163]</sup> Entsprechend könnte versucht werden, diese Diazocine an das Axitinib-Pharmakophor zu koppeln. Mit einem gut wasserlöslichen Inhibitor könnte dann auch die photopharmakologische Wirkung auf Zellebene geprüft werden. Der Zellassay des Schwefel-Diazocins **V5** mit 1 % DMSO zeigte Hinweise auf Präzipitation der Verbindung.

**Tabelle 4.2.** Zusammenfassung der photochemischen Charakterisierung sowie biologischen Testung im VEGFR-2 Kinaseassay der Azo- und Diazocin-funktionalisierten Axitinib-Derivate **V2-V7**. Angelehnt an<sup>[118]</sup>.

| #         | Rest (R)  | $\lambda_{\text{exc}}$ (nm) | PSS (E/Z %),<br>DMSO<br>(NMR) | $t_{1/2}$ (h),<br>37 °C,<br>DMSO<br>(UV/VIS) | IC <sub>50</sub> VEGFR-2 (nM) |
|-----------|---|-----------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|
|           |   |                             |                               | un-<br>bestrahlt                             | bestrahlt<br>(PSS)            |
| <b>V2</b> |   | n/a                         | n/a                           | n/a  | 415 n/a                       |
| <b>V3</b> |  | 365                         | 17/83                         | 43.1   | 1077 <sup>a</sup> 1289        |
| <b>V4</b> |  | 385                         | 20/80                         | 5.7  | 1020 <sup>a</sup> 1435        |
| <b>V5</b> |  | 405                         | 47/53                         | 7.3  | > 10000 214                   |
| <b>V6</b> |  | 405                         | 25/75                         | 3.7  | > 10000 251                   |
| <b>V7</b> |  | 405                         | 60/40                         | 1.5  | n/a <sup>a</sup> 493          |

<sup>a</sup> Restaktivität der Kinase ≥ 33 %.

### 4.3 Photoschaltbare Azoanaloga von Imatinib und Nilotinib

Wie im vorangegangenen Axitinib-Projekt wurden verschiedene Azoderivate von Imatinib und Nilotinib charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass der Ersatz der Amidbindung des *N*-Arylbenzamids und der damit einhergehende Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein zu einem Verlust der inhibitorischen Aktivität führt (**6** und **7**, Tabelle 4.3). Um zu vermeiden, dass die DFG<sub>out</sub>-Inhibitoren im aktivitätsbasierten PDGFR-β Kinaseassay (detektiert bevorzugt DFG<sub>in</sub>-Inhibitoren) diskriminiert werden, wurde zusätzlich ein affinitätsbasierter Assay mit nicht-phosphorylierter ABL-1 Kinase durchgeführt, der jedoch vergleichbare Ergebnisse lieferte.

Imatinibderivate **8** und **9** mit erhaltener Amidbindung und verknüpftem Azobenzol bzw. Diazocin zeigen zwar eine Kinaseinhibition, aber keinen Unterschied zwischen mit und ohne Bestrahlung (Tabelle 4.3). Dies könnte auf die Position des Photoschalters an der zum Lösungsmittel hin gerichteten Öffnung der Bindetasche zurückzuführen sein, wo eine höhere Proteinflexibilität eventuell ermöglicht, dass die Kinase an beide Isomere adaptieren kann. Überraschenderweise ist das Diazocin-funktionalisierte Imatinib-Derivat **9** vergleichbar potent zu Imatinib. Der nicht vorhandene Wirkunterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Inhibitor spiegelt die Situation des Diazocin-funktionalisierten Benzthiazol-Derivates **2** wider.

Derzeit stehen noch Untersuchungen zur Reduktionsstabilität des Diazocin-funktionalisierten Imatinib-Derivates **9** gegenüber DTT aus. Eine Reduktion der Azofunktion zum Hydrazin würde einen weiteren möglichen Grund dafür darstellen, dass kein Unterschied in der photopharmakologischen Wirkung mit und ohne Bestrahlung beobachtet werden kann. Zudem soll das Hydrazin gezielt hergestellt und im Kinaseassay getestet werden. Des Weiteren könnte versucht werden den Kinaseassay ohne DTT durchzuführen, um zu prüfen, ob dann ein Wirkunterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Inhibitor nachgewiesen werden kann. Hierbei ist allerdings die Erhaltung der Kinaseaktivität kritisch. Schließlich könnte eine Kristallstruktur der Inhibitor-gebundenen Kinase angestrebt werden, die Aufschluss über den genauen Bindemodus geben würde.

**Tabelle 4.3.** Zusammenfassung der photochemischen Charakterisierung sowie biologischen Testung im PDGFR- $\beta$  Kinaseassay der Azoanaloga 6-9 von Imatinib und Nilotinib.

| #              | Rest (R) | $\lambda_{\text{exc}}$ (nm) | PSS (E/Z %),<br>DMSO<br>(NMR) | $t_{1/2}$ (h),<br>37 °C,<br>DMSO<br>(UV/VIS) | IC <sub>50</sub> PDGFR- $\beta$ (nM) |                    |
|----------------|----------|-----------------------------|-------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------|
|                |          |                             |                               |  | un-<br>bestrahlt                     | bestrahl.<br>(PSS) |
| 6              |          | 365                         | 32/68                         | 10.0   | > 10000                              | n/a                |
| 7 <sup>a</sup> |          | 365                         | 38/62                         | 14.3   | > 10000                              | n/a                |
| 8              |          | 365                         | 41/59                         | 44.6   | 786 <sup>b</sup>                     | 1793 <sup>b</sup>  |
| 9              |          | 405                         | 58/42                         | 6.1  | 305                                  | 268                |

<sup>a</sup> chemische Analytik im Nachhinein nicht eindeutig. <sup>b</sup> Restaktivität der Kinase ≥ 33 %.

#### 4.4 Photoschaltbare Diazocin-basierte Estrogenrezeptor-Agonisten

In diesem Projekt wurde erstmalig das Diazocin selbst als Pharmakophor eingesetzt. In den vorherigen Projekten hatte sich gezeigt, dass die Kopplung des Diazocins an das jeweilige Pharmakophor meist zu sehr großen Molekülen führte, mit der photoschaltbaren Einheit nahe der Bindetaschenöffnung zum Lösungsmittel. Dies ging einher mit biologischen Inaktivitäten, Löslichkeitsproblemen oder keinem Unterschied in der photopharmakologischen Wirkung mit und ohne Bestrahlung der photoschaltbaren Kinaseinhibitoren. Mit der Integration des photosensitiven Elements direkt im Pharmakophor sollte hier eine gravierende strukturelle Änderung des Liganden bei der Photoisomerisierung und somit ein entscheidender Unterschied in den biologischen Aktivitäten der *E*-/*Z*-Isomere der Diazocin-Derivate erzielt werden.

Durch Funktionalisierung des Diazocins mit Hydroxygruppen in *para*- bzw. *meta*-Position zur Azogruppe konnte  $\beta$ -Estradiol als Modellsystem erfolgreich nachgeahmt werden. Die photochemische Charakterisierung war hier, im Gegensatz zu den anderen Projekten, auch in wässriger Lösung möglich (Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Tabelle 4.4). Insgesamt zeigte sich eine starke Abhängigkeit der photochemischen Eigenschaften von Lösungsmittel und Temperatur, so sind die Anteile der *E*-Isomere im PSS in Wasser im Vergleich zu DMSO verringert und bei Erhöhung der Temperatur auf 37 °C kommt es zu einer starken Verkürzung der Halbwertszeiten.

Im Reportergen Assay konnten mit Bestrahlung im 3 h-Takt moderate bis gute estrogene Aktivitäten für Verbindungen **10**, **11**, **12** und **16** nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der teilweise geringen Anteile der *E*-Isomere im PSS lässt sich auf eine hohe Potenz der jeweiligen *E*-Isomere schließen (Tabelle 4.4). Besonders hervorzuheben ist das asymmetrisch substituierte Diazocin **12**. Trotz einer Halbwertszeit von nur 20.9 ms in Wasser bei 37 °C, konnte hier eine moderate estrogene Aktivität nach Bestrahlung alle 3 h nachgewiesen werden. Daher lässt sich vermuten, dass das *E*-Isomer (**E-12**) möglicherweise in der Rezeptorbindetasche stabilisiert und folglich durch die unmittelbare Umgebung des Moleküls die Halbwertszeit verlängert wird. Dieser Effekte sollte in einem Anschlussprojekt genauer untersucht werden. Vom Arbeitskreis Tholey wurden bereits verschiedene Bemühungen angestrebt, die Halbwertszeit des Diazocins **12** im Estrogenrezeptor (ER) massenspektrometrisch zu bestimmen.<sup>[164]</sup> Aufgrund der schwierigen Handhabung des ER blieben die Messungen jedoch erfolglos. Wenn die Stabilisierung des *E*-Isomers im Rezeptor auch auf molekularer Ebene bewiesen werden kann, birgt dieses ein sehr großes und bislang unbekanntes Potential für die Photopharmakologie. Eine Wirkung nur nach Bestrahlung und sofortiger Bindung am target würde die Diffusion des photoaktivierten Wirkstoffs in andere Gewebe verhindern.

Zudem sollte geprüft werden, ob die Transkriptionsaktivierung über das *estrogen response element* (ERE) wirklich auf eine Bindung am ER zurückzuführen ist und ob eine ER-Isoform-Selektivität vorliegt. Verschiedene Assaysysteme, mit denen die Bindungsaffinität von Liganden am ER bestimmt werden kann, sind kommerziell erhältlich. Bei diesen besteht allerdings die Problematik einer möglichen Interferenz des Auslesungssignals (meist Fluoreszenz) mit dem Absorptionsbereich der Diazocine, sodass bei der Auslesung der Bindeinteraktion das Diazocin zurückgeschaltet und folglich die Bindung aufgehoben werden könnte. Somit würden falsch negative Ergebnisse erhalten werden.

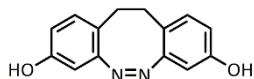
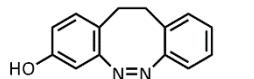
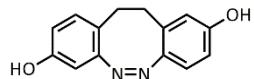
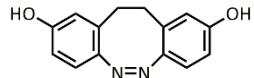
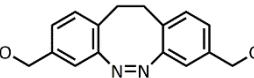
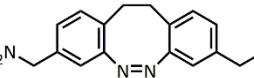
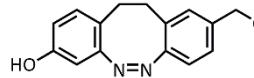
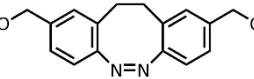
Um die estrogene Wirkung weitergehend zu untersuchen, könnte mit der automatisierten, regelmäßigen Zwischenbestrahlung auch versucht werden, eine Wachstumssteigerung im Proliferationsassay mit MCF-7 Zellen nachzuweisen.

Die Benzylalkoholdiazocine, die zur Verhinderung der Azo-Hydrazon-Tautomerie der *para*-Hydroxydiazocine hergestellt wurden, zeigen trotz verbesserter photochemischer Eigenschaften einen Verlust der biologischen Aktivität. Grund dafür könnte der vergrößerte Abstand der Hydroxygruppen zueinander oder die geringere Acidität dieser im Vergleich zu den phenolischen Hydroxygruppen sein.

Zusätzlich war es in diesem Projekt möglich, die photoaktivierten Derivate mit estrogener Wirkung durch Bestrahlung mit 525 nm wieder zu inaktivieren. Neben der thermischen Rückschaltung konnte somit die Reversibilität der Schaltung auch auf direkte Weise im biologischen System bewiesen werden. Demnach lassen sich die Diazocine auch als *tool*-Verbindungen verwenden, die sehr präzise in ihrer Aktivität gesteuert werden können.

Insgesamt stellt dieses Projekt ein Modell für die Integration der photoschaltbaren Einheit im Pharmakophor dar, bei dem der Einfluss der molekularen Umgebung auf die photochemischen Eigenschaften besonders deutlich wurde. Darüber hinaus können die photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Modulatoren als Beispiel für ökotoxikologisch kompatible Wirkstoffe angesehen werden, da sie sich wieder selbst „ausschalten“.

**Tabelle 4.4.** Zusammenfassung der photochemischen Eigenschaften in wässriger Lösung sowie der estrogenen Aktivitäten im zellbasierten Reportergen Assay der Hydroxy- bzw. Benzylalkohol/amin-diazocine **10-17**. Estrogene Aktivitäten sind als maximale relative Aktivitäten im Verhältnis zur Referenz β-Estradiol angegeben.

| #         | Struktur  | $\lambda_{\text{exc}}$<br>(nm) | PSS Z→E<br>(% E),<br>D <sub>2</sub> O (NMR) | $t_{1/2}$ ,<br>37 °C, H <sub>2</sub> O<br>(UV/VIS) | Estrogene Aktivität<br>(max. rel. Akt. zu β-Estradiol) |                |
|-----------|---|--------------------------------|---|--|--|----------------|
|           |   |                                |   |  | unbestrahlt  | bestraht (PSS) |
| <b>10</b> |    | 405                            | 28  | 9.6 h  | 27.1 ± 2.6 %   | 68.2 ± 10.8 %  |
| <b>11</b> |    | 405                            | 39  | 5.3 h  | 38.8 ± 6.4 %   | 114.2 ± 17.9 % |
| <b>12</b> |    | 405                            | n/a   | 20.9 ms  | 20.5 ± 2.9 %   | 52.3 ± 5.2 %   |
| <b>13</b> |  | 405                            | n/a   | 9.2 ms   | 46.3 ± 16.2 %  | 44.5 ± 17.7 %  |
| <b>14</b> |  | 385                            | 64  | 5.9 h  | 16.0 ± 4.9 %   | 19.7 ± 10.7 %  |
| <b>15</b> |  | 385                            | 63  | 4.8 h  | 13.7 ± 4.8 %   | 34.0 ± 22.2 %  |
| <b>16</b> |  | 385                            | 40  | 6.1 h  | 33.0 ± 4.3 %   | 81.4 ± 1.1 %   |
| <b>17</b> |  | 385                            | 71  | 4.5 h  | 23.7 ± 3.9 %   | 45.4 ± 9.4 %   |

Abschließend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Diazocine insgesamt ein großes Potential für biologische Anwendungen zeigen. Dabei sollten sie möglichst im Pharmakophor integriert werden, um einen großen Unterschied in der photopharmakologischen Wirkung mit und ohne Bestrahlung zu erreichen. In Bezug auf das thermodynamisch stabile und biologisch inaktive Z-Isomer und das Ausmaß der strukturellen Änderung bei der Photoisomerisierung sind Diazocine den Azobenzolen deutlich überlegen. Die thermische Rückschaltung ermöglicht zudem die Entwicklung ökotoxikologisch verträglicher Wirkstoffe. Daher sollten Diazocine in Zukunft für photopharmakologische Anwendungen bevorzugt eingesetzt werden.

Insgesamt sind verschiedene Aspekte in der Photopharmakologie zu beachten und stellen zum Teil nach wie vor große Herausforderungen dar. So darf bei der Entwicklung von Photoschaltern die Proteinflexibilität nicht unterschätzt werden. Wie in dieser Arbeit vor allem für die Azobenzol-Derivate **V3**, **V4** und **8**, aber auch für das Kohlenstoff-Diazocin-funktionalisierte Axitinib-Derivat **V7** beobachtet werden konnte, sind Proteine zu einem gewissen Maß in der Lage, an den Liganden zu adaptieren. Daher ist die Position des Photoschalters sowie die Auswirkung der Konfigurationsänderung sehr entscheidend, um einerseits für das thermodynamisch stabile Isomer eine möglichst komplett biologische Inaktivität und andererseits nach Bestrahlung für das metastabile Isomer eine möglichst hohe biologische Potenz zu erzielen.

Eine weitere Problematik stellen physikochemische Parameter wie die Wasserlöslichkeit der photoschaltbaren Verbindungen dar. So war es in den hier bearbeiteten Projekten zu photoschaltbaren Kinaseinhibitoren nicht möglich, die photochemische Charakterisierung in wässriger Lösung durchzuführen. Entsprechend ist das PSS in wässriger Lösung nicht bekannt und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass biologische Inaktivitäten bzw. nur geringfügige Unterschiede in den biologischen Aktivitäten zwischen bestrahlt und unbestrahlt auf eine unzureichende Schaltung zurückzuführen sind.

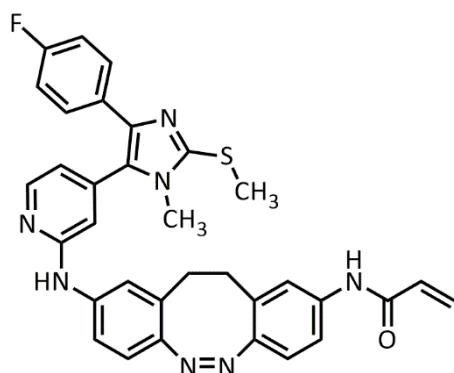
Des Weiteren ist zu beachten, dass die Schalteigenschaften sehr stark von Lösungsmittel, Temperatur, Konzentration und molekularer Umgebung (u. a. auch gebunden im Rezeptor) abhängig sind. Dies konnte vor allem für die photoschaltbaren Estrogenrezeptor-Agonisten eindrücklich gezeigt werden. In diesem Zusammenhang ist auch eine Azo-Hydrazon-Tautomerie der photoschaltbaren Verbindungen zu berücksichtigen, die einerseits die Anreicherung des metastabilen Isomers komplett unterbinden kann (**V2**), andererseits aber auch bei Verhinderung dieser Tautomerisierung im Rezeptor, wie für Hydroxydiazocin **12** vermutet, ein vielversprechendes Potential für die Photopharmakologie darstellen kann.

Darüber hinaus sollte neben der Reduktionsstabilität der Photoschalter für zukünftige *in vivo* Anwendungen auch der Metabolismus dieser untersucht werden. Dabei ist v.a. die mögliche Toxizität der Azoverbindungen<sup>[165, 166]</sup> zu betrachten.

Allgemein ist eine klinische Anwendung der Photoschaltung erstrebenswert, dafür müssen die Photoschalter jedoch bezüglich ihres phototherapeutischen Indexes, ihrer Schalteigenschaften unter physiologischen Bedingungen und ihrer Anregungswellenlängen (möglichst im bio-optischen Fenster) weitergehend optimiert werden.

Hierfür wäre auch der kombinierte Einsatz eines Photoschalters mit weiteren Funktionalitäten zur Steigerung der Effektivität denkbar. Zwei aktuelle Beispiele zeigen dafür ein großes Potential. Ein Beispiel in dem sich eine geringe Schalteffizienz nicht nachteilig auswirkt, sind die kürzlich von

Reynders *et al.* veröffentlichten photoschaltbaren kovalenten Kinaseinhibitoren.<sup>[167]</sup> Einer dieser Diazocin-basierten Inhibitoren der MAP Kinase JNK3 ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Im Dunkeln stellt die Z-Konfiguration einen nicht-kovalenten Inhibitor mit geringer Potenz ( $IC_{50} = 646 \text{ nM}$ ) dar. Nach Bestrahlung mit 390 nm hingegen, liegt ein effektiver kovalenter Inhibitor vor ( $IC_{50} = 21.4 \text{ nM}$ ), dessen elektrophiles Acrylamid an ein Cystein in der ATP-Bindetasche bindet. Entsprechend agiert dieser kovalente Kinaseinhibitor als *photoswitchable affinity label*. Beide Isomere sind in der Lage in der ATP-Bindetasche von JNK3 zu binden, aber nur in der langgestreckten E-Konfiguration kann das elektrophile Acrylamid das entsprechende Cystein erreichen und kovalent binden. Dabei stellt der eigentlich geringe Anteil des E-Isomers im PSS keinen Nachteil dar, da das PSS ein dynamisches Gleichgewicht ist und der kovalente Inhibitor durch wiederholte Bestrahlung über die Zeit angereichert wird. Nachteilig ist jedoch, dass die Kinaseinhibition damit irreversibel ist. Zudem konnte im Zellasssay nur ein sehr geringer Unterschied mit und ohne Bestrahlung nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.1.** Photoschaltbarer, kovalenter JNK3 Kinaseinhibitor publiziert von Reynders *et al.* Nur in der gestreckten E-Konfiguration erreicht das elektrophile Acrylamid ein Cystein im aktiven Zentrum, bindet dieses kovalent und agiert somit als *photoswitchable affinity label*.<sup>[167]</sup>

Ein weiteres Beispiel und neues Anwendungsgebiet in der Photopharmakologie sind photoschaltbare PROTACs (*proteolysis targeting chimeras*). PROTACs markieren Proteine durch eine E3 Ligase-Funktion zur Ubiquitinierung und fördern folglich den proteosomalen Abbau. PhotoPROTACs oder *photochemically targeting chimeras* (PHOTACs) verfügen, neben den beiden Ligandfunktionalitäten für das Protein von Interesse sowie die E3 Ligase, über eine dritte Funktionalität – den Photoschalter. Somit lassen sich PHOTACs selektiv im Zielgewebe aktivieren, um eine systemische Toxizität zu verhindern.<sup>[168, 169]</sup> Darüber hinaus wäre auch eine Kombination aus PHOTACs und beispielsweise Kinaseinhibitoren oder ER-Liganden denkbar, um sowohl die Effektivität als auch die Selektivität der Wirkstoffe zu erhöhen.

## 5 Methoden und Materialien

Wenn nicht anders angegeben wurden Verbrauchsmaterialien wie Mikrotiterplatten, Zellkulturflaschen, serologische Pipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäß von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Chemikalien und biologische Reagenzien wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland) und ThermoFisher (Waltham, MA, USA) bezogen.

Für Zellkulturarbeiten wurde die Sterilbank NapFlow (Napco) und der Inkubator FunctionLine (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) verwendet.

### 5.1 Aktivitätsbasierte Kinaseassays (BMX, IGF-1R, VEGFR-2 und PDGFR- $\beta$ )

Die Aktivitäten der verschiedenen Kinasen wurden mit Hilfe des Lumineszenz-basierten ADP-Glo™ Kinaseassays (Promega, Madison, WI, USA) bestimmt. In diesem Assay wird das ADP, welches während der Kinasereaktion entstanden ist, in ein Lumineszenzsignal umgewandelt, welches wiederum proportional zur Kinaseaktivität ist. Der Assay wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Weiße 96-well CulturePlates™ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) wurden verwendet und die Kinasereaktionen wurden im Kinasepuffer (40 mM Tris (pH 7.5), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 2 mM DTT, 2 mM MnCl<sub>2</sub> und 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) mit einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l durchgeführt.

Für VEGFR-2 und PDGFR- $\beta$  war dieser Assay bereits etabliert.<sup>[69]</sup> Für BMX und IGF-1R wurden ebenfalls jeweils 10  $\mu$ M ATP verwendet, welche am verwendeten Messgerät für verschiedene Umsetzungsverhältnisse Lumineszenzsignale im linearen Bereich lieferten. Die Substrat- und Kinasekonzentrationen wurden so eingestellt, dass ausreichende Signal-zu-Rausch Verhältnisse erreicht wurden. Zudem musste das Substrat für diesen Assay im Überschuss zu ATP eingesetzt werden. Die jeweils verwendeten Konzentrationen sind Tabelle 5.1 zu entnehmen.

Test- und Referenzsubstanzen wurden in DMSO gelöst und 1:3 Verdünnungsreihen vorbereitet. Die Handhabung der photosensitiven Substanzen erfolgte in einem abgedunkelten Labor unter Rotlicht. Da die Schalteigenschaften der Verbindungen nicht in wässriger Lösung bestimmt werden konnten, wurden diese im Falle der PSS-Testung zunächst in DMSO bestrahlt, bevor diese Lösungen zum wässrigen Kinaseassay-Gemisch gegeben wurden. Azobenzol-Derivate **V3** und **8** wurde mit 365 nm bestrahlt, unter Verwendung einer dimmbaren, speziell angefertigten Lampe für 96-well-Platten, bestehend aus 16 LEDs im Abstand der Kavitäten (Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg, Deutschland, 16  $\times$  750 mW Nichia NCSU276A LEDs). Dabei wurde jede Kavität für 20 s mit 5 % Leistung bestrahlt. Azobenzol **V4** wurde mit 385 nm bestrahlt. Dafür wurde eine Handlampe, bestehend aus drei LEDs (Sahlmann Photochemical Solutions, 3  $\times$  2430 mW Nichia NC4U134 LEDs) verwendet. Die ganze Platte wurde damit für 2 min bestrahlt. Die Diazocine **V5-V7** und **9** wurden mit 405 nm unter Verwendung einer entsprechend angefertigten 96-well-Platten Lampe (Sahlmann Photochemical Solutions, 16  $\times$  980 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, dimmbar) bestrahlt. Jede Kavität wurde für 20 s mit 5 % Leistung bestrahlt. Bei der Diazocintestung wurde die 405 nm-Lampe ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung als einzige Lichtquelle verwendet. Diazocine **V5-V7** wurden aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Verbindung **V7** zusätzlich alle 30 min während des Assays bestrahlt. Bevor die Zugabe der Kinase die Reaktion startet, wurden die Testverbindungen zum Reaktionsgemisch (ATP,

Substrat, Puffer) gegeben, dabei wurden finale DMSO-Konzentrationen von 1 % (bzw. 10 % für Diazocine **V5-V7**) und Inhibitorkonzentrationen zwischen 10 µM und 0.5 nM erreicht. Es wurde überprüft, dass 10 % DMSO im finalen Kinaseassay-Gemisch die VEGFR-2 Kinaseaktivität nicht beeinflussen. Für die Testung der Axitinibderivate **V1-V7** siehe auch<sup>[118]</sup>.

Im Falle der Präinkubation der Imatinib-/Nilotinib-Derivate mit PDGFR-β, wurde anstelle des Reaktionsgemisches mit ATP und Substrat die Kinaselösung vorgelegt und nach Zugabe der Inhibitorlösungen für 1 h präinkubiert, um eine Bindung in DFG<sub>out</sub>-Konformation zu ermöglichen. Anschließend wurde die Kinasereaktion durch Zugabe von Substrat und ATP gestartet.

Nach Durchführung des ADP-Glo™ Assays, wurden die Lumineszenzintensitäten mit einem FLUOstar® Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) aufgenommen. Die Kinaseaktivitäten wurden in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle ohne Inhibitor (nur 1 % DMSO) berechnet und gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von Doppelmessungen mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. Sigmoidale Anpassung (*log(inhibitor)* vs. *response-variable slope*) und Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde mit GraphPad Prism® (Version 7.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

**Tabelle 5.1.** Übersicht der in den verschiedenen Kinaseassays eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Kinase sowie des jeweiligen Substrats (finale Assaykonzentrationen). Die entsprechenden *Kinase Enzyme Systems* wurden von Promega (Madison, WI, USA) bezogen. Zudem sind die jeweils verwendeten Referenzinhibitoren mit Herstellern angegeben.

| Kinaseassay | Kinase   | Kinase-konz.<br>(ng/µl) | Substrat                          | Substrat-konz.<br>(µg/µl) | Referenzinhibitor  |
|-------------|--|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|
| BMX         | <i>purified full-length kinase, BMX active</i> | 0.4                     | <i>Poly(4:1 Glu,Tyr) Peptide</i>  | 0.125                     | BMX-IN-1<br>(MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)   |
| IGF-1R      | <i>purified kinase domain, IGF1R active</i>    | 0.8                     | <i>IGF1Rtide (KKKSPGEYVNIEFG)</i> | 0.125                     | Linsitinib<br>(LC Laboratories, Woburn, MA, USA)   |
| VEGFR-2     | <i>purified kinase domain, KDR active</i>      | 0.4                     | <i>Poly(4:1 Glu,Tyr) Peptide</i>  | 0.25                      | Axitinib<br>(LC Laboratories, Woburn, MA, USA)   |
| PDGFR-β     | <i>purified kinase domain, PDGFRβ active</i>   | 0.4                     | <i>Poly(4:1 Glu,Tyr) Peptide</i>  | 0.25                      | Imatinib-Mesylat<br>(LC Laboratories, Woburn, MA, USA), Nilotinib<br>(TargetMol, Wellesley Hills, MA, USA) |

## 5.2 Adenosin-Desaminase (ADA) Assay

Zur Bestimmung der Adenosin-Desaminase-Aktivität wurde das *Adenosine Deaminase (ADA1) Inhibitor Screening Kit (Colorimetric)* der Firma BioVision, Inc. (Milpitas, CA, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Das bei der Desaminierung von Adenosin entstandene Inosin wird hier enzymatisch zu Harnsäure abgebaut. Diese wird schließlich photometrisch (OD 293 nm) bestimmt und ist proportional zur ADA-Aktivität. Der im Kit enthaltene Referenzinhibitor *erythro*-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenin (EHNA) wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst, während die Testsubstanz in DMSO gelöst wurde. Die Lösungen der photosensitiven Verbindung wurden in einem abgedunkelten Labor unter Rotlicht gehandhabt. Konzentrationsreihen in 1:3 Verdünnungsschritten wurden im jeweiligen Lösungsmittel angesetzt. Dafür wurde EHNA, nach Erfragen der Konzentration beim Hersteller, anders als im Protokoll angegeben verdünnt, um ebenfalls eine Dosis-Wirkungskurve aufnehmen zu können. Die finalen Assaykonzentrationen liegen für EHNA im Bereich 12.5 nM - 635 fM und für Diazocin **3** im Bereich 10 μM - 508 pM (1 % DMSO). Neben den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen in Duplikaten wurden Lösungsmittelkontrollen mit 1 % DMSO bzw. Wasser ohne Inhibitoren sowie *blanks* ohne Inhibitoren und ohne Enzym vermessen.

Im Falle der PSS-Testung wurde Diazocin **3** in DMSO, vor der Zugabe zum wässrigen Assay, mit 405 nm bestrahlt. Dafür wurde eine speziell angefertigten 96-well-Platten Lampe mit 16 LEDs im Abstand der Kavitäten (Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg, Deutschland, 16 × 980 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, dimmbar) verwendet. Jede Kavität wurde für 20 s mit 5 % Leistung bestrahlt. Ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung wurde die 405 nm-Lampe als einzige Lichtquelle verwendet.

Zur Durchführung und Auslesung des ADA-Assays wurden transparente 96-well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, #83.3924) verwendet. Die Absorptionsmessungen erfolgten an einem FLUOstar® Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland). Die OD 293 nm wurde im Kinetikmodus über 30 min bei 37 °C jede Minute gemessen. Zur Berechnung der Steigung wurden für alle Kinetikmessungen die Zeitpunkte 5 min und 15 min ausgewählt. Die Enzymaktivität wurde in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle berechnet und gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden als Mittelwerte der Duplikate mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt. Sigmoidale Anpassung (*log(inhibitor)* vs. *response-variable slope*) und Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde mit GraphPad Prism® (Version 7.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

### 5.3 HUVEC Proliferations-/Viabilitätsassays (Resazurin)

*Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) wurden in *Endothelial Cell Growth Medium 2* (PromoCell) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von ca. 80-90 % wurden die Zellen für Proliferations- bzw. Viabilitätsassay ausgesät. Die benötigte Anzahl 96-well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, #83.3924) wurde entweder nach automatischer Zellzählung mit einem Scepter™ 2.0 Cell Counter (MerckMillipore, Burlington, MA, USA) mit jeweils 10000 Zellen/Kavität in 100 µl ausgesät (Verbindungen **1-3**) oder nach manueller Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer mit jeweils 1000 Zellen/Kavität in 100 µl (**V4** und **V5**).

Nach 24 h Inkubation erfolgte die Inhibitorzugabe und im Falle der Proliferationsassays die Auswertung der sogenannten Tag0-Platte, die das Zellwachstum zum Zeitpunkt der Inhibitorzugabe wiedergibt, mittels Resazurin-Assay. Für die Proliferationsassays wurden die Testsubstanzen zunächst unter kontrollierten Lichtbedingungen in DMSO gelöst und serielle 1:3 Verdünnungsreihen angesetzt. Zur Testung des PSS wurden die Verbindungen vor Zugabe zu den Zellen in DMSO bestrahlt. Die Diazocine **2**, **3** und **V5** wurden dabei mit 405 nm unter Verwendung einer speziell angefertigten 96-well-Platten Lampe (Sahlmann Photochemical Solutions, 16 × 980 mW Nichia NVSU233A-U405 LEDs, dimmbar) bestrahlt. Jede Kavität wurde für 20 s mit 5 % Leistung bestrahlt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die 405 nm-Lampe für die Diazocin-Testung als einzige Lichtquelle verwendet. Azobenzol **V4** wurde mit 385 nm bestrahlt. Dafür wurde eine Handlampe, bestehend aus drei LEDs (Sahlmann Photochemical Solutions, 3 × 2430 mW Nichia NC4U134 LEDs) verwendet. Die ganze Platte wurde damit für 2 min bestrahlt.

Mit Zugabe der Testverbindungen zu den Zellen wurden finale DMSO-Konzentrationen von 1 % und Inhibitorkonzentrationen im Bereich 33 µM - 0.56 nM (für Verbindungen **2** und **3**) bzw. 100 µM - 1.7 nM (für **V1**, **V4** und **V5**) erreicht. Zusätzlich wurden Lösungsmittelkontrollen (nur 1 % DMSO ohne Inhibitoren) sowie Medium-blanks (Medium mit 1 % DMSO, ohne Zellen) angesetzt. Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen für weitere 48 h inkubiert. Ggf. wurden Verbindungen **V4** und **V5** während dieser Inkubationszeit ca. alle 6 h für 1 min mit 385 nm bzw. 405 nm bestrahlt.

Im Anschluss wurde die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay quantifiziert. Ggf. wurde zeitgleich ein Wechselwirkungsassay ausgewertet. Hierfür wurden die Inhibitoren erst ca. 10 min vor der Durchführung des Resazurin-Assays zu den Zellen gegeben, um eine mögliche Interaktion mit der Fluoreszenzauslesung zu untersuchen. Dabei wurde analog zur Inhibitortestung vorgegangen, mit der Ausnahme, dass hier unter gewöhnlichem Laborlicht gearbeitet wurde.

Im Resazurin-Assay wird der blaue Redoxfarbstoff Resazurin von metabolisch aktiven Zellen zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert. Zur Durchführung wurde das Zellmedium abgesaugt und pro Kavität wurden 120 µl 0.00167 %ige Resazurin-Lösung in DPBS auf die Zellen gegeben (Resazurin: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde die Fluoreszenz mit einem FLUOstar® Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) ausgelesen. Dabei wurde die Fluoreszenz bei 544 nm angeregt und die Emission bei 590 nm detektiert.

Anschließend wurde das Zellwachstum prozentual bezogen auf die Tag0-Platte sowie auf das maximale Wachstum der Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO ohne Inhibitoren) berechnet. Nach Subtraktion des *blank* wurden dafür folgende Formeln verwendet:

$$\text{Zellwachstum in \%} = \frac{(T_i - T_z)}{(C - T_z)} * 100; \text{ wenn } T_i \geq T_z \quad (\text{ggf. zytostatische Wirkung})$$

$$\text{Zellwachstum in \%} = \frac{(T_i - T_z)}{T_z} * 100; \text{ wenn } T_i < T_z \quad (\text{zytotoxische Wirkung})$$

$T_i$ : Fluoreszenzsignal nach Inhibitor-Behandlung

$T_z$ : Mittelwert der Fluoreszenzsignale der Tag0-Platte

$C$ : Mittelwert der Fluoreszenzsignale der Lösungsmittel-Kontrolle

Das Zellwachstum in % wurde als Mittelwerte der jeweiligen Duplikate mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Sigmoidale Anpassung (*log(inhibitor) vs. response-variable slope*) und Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde mit GraphPad Prism® (Version 7.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Die Viabilitätsassays wurden analog zu den Proliferationsassays über insgesamt 72 h durchgeführt. Die Testverbindungen **1-3** sowie Referenz Axitinib wurden hierbei in den finalen Assaykonzentrationen 5 µM, 10 µM und 20 µM als Quadruplikate getestet. Die Handhabung der Verbindungen fand hierbei unter gewöhnlichem Laborlicht statt. Eine Tag0-Platte wurde nicht ausgewertet, sodass kein Zellwachstum, sondern die Zellviabilität in % zur Lösungsmittel-Kontrolle berechnet wurde. Die Mittelwerte der Quadruplikate wurden als Balkendiagramm dargestellt.

## 5.4 Luciferase Reporteren Assay in MCF-7 Zellen

Zur Bestimmung der estrogenen Aktivitäten wurde ein Luciferase Reporteren Assay durchgeführt. Dabei wurde vergleichbar wie zuvor beschrieben vorgegangen.<sup>[155-159]</sup> MCF-7 Zellen (CLS Cell Lines Service, Eppenheim, Deutschland) wurden in DMEM (hoher Glukosegehalt, ThermoFisher, Waltham, MA, USA, #41965062) mit 10 % FBS (ThermoFisher, #10270106) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit bis zum Erreichen einer Zellkonfluenz von ca. 90 % kultiviert. Bevor eine transiente Transfektion durchgeführt wurde, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit einer Dichte von 1.2 \* 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wurde DMEM verwendet, welches nur 2 % FBS enthielt. Die Zellen wurden für 1-2 h zum Adhärieren inkubiert. Anschließend erfolgte eine Co-Transfektion im *bulk* mit 1187.5 ng *Firefly*-Plasmid (3X ERE TATA luc, Addgene, Watertown, MA, USA, #11354, wurde freundlicher Weise von Donald McDonnell zur Verfügung gestellt<sup>[155]</sup>, Aufreinigung siehe 5.5) und 62.5 ng *Renilla*-Normalisierungsplasmid (wurde freundlicher Weise vom Arbeitskreis Schade zur Verfügung gestellt) pro 10<sup>6</sup> Zellen. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000™ (ThermoFisher) verwendet (3 µl pro 1 µg DNA). Plasmide und Lipofectamine wurden in Opti-MEM für 20 min präinkubiert, bevor dieser Lösung zu den Zellen gegeben wurde. Ungefähr 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und in 96-well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, #83.3924) ausgesät (4 \* 10<sup>4</sup> Zellen/Kavität). Dabei wurde gleichzeitig das Zellmedium zu Hormon-freiem Medium getauscht (Phenolrot-freies DMEM mit 10 % Aktivkohle-gefiltertem FBS, ThermoFisher). Ca. 3 h später wurden die Testverbindungen mit einer finalen DMSO-Konzentration von 1 % zu den Zellen gegeben. Dabei wurden die Testverbindungen unter Lichtausschluss gehandhabt. Jede Testverbindung wurde in neun Konzentrationen zusammen mit DMSO alleine als Lösungsmittelkontrolle in Triplikaten getestet. Für die Referenz β-Estradiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) waren die finalen Testkonzentrationen 100 nM - 1 fM in 1:10 Verdünnungsschritten, für die Diazocine (und Hydroxyazobenzole) 100 µM - 15 nM in 1:3 Verdünnungen. Im Falle der PSS-Testung wurde eine Bestrahlung der Verbindungen in DMSO vor Zugabe zu den Zellen sowie während der 15-stündigen Inkubation mit den Zellen, meistens alle 3 h, durchgeführt. Dafür wurden speziell angefertigte Lampen für den Zellinkubator benutzt, die mittels eines Timers gesteuert wurden (für Lampendetails siehe 5.6). Dabei erfolgte die Bestrahlung mit 405 nm alle 3 h für 1 min mit 50 % Leistung bzw. alle 30 min für 3 min mit 25 % Leistung oder mit 385 nm alle 3 h für 3 min mit 50 % Leistung. Im Falle der Rückschaltung zum Z-Isomer, wurde der Zellassay zusätzlich mit 525 nm bestrahlt (ca. 10 min nach der Bestrahlung mit 405 nm bzw. 385 nm) unter Verwendung einer speziell angefertigten 96-well-Platten Lampe (Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg, Deutschland, 16 × 380 mW Nichia NCSG219B-V1 LEDs im Abstand der Kavitäten, dimmbar). Dabei wurde jede Kavität für 20 s mit 5 % Leistung bestrahlt. Die Bestrahlungstoleranz des Zellassays wurde überprüft, indem Dosis-Wirkungskurven der Referenz β-Estradiol mit und ohne Bestrahlung aufgenommen wurden. Nach 15 h Inkubation wurden beide Luciferaseaktivitäten des Zelllysates mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega, Madison, WI, USA) ausgewertet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll mit der Ausnahme, dass pro Kavität 30 µl Lysepuffer und anschließend jeweils 10 µl des Lysats zusammen mit jeweils 10 µl der beiden Reagenzlösungen eingesetzt wurden. Die Lumineszenz wurde in weißen 96-well *half-area*-Platten (Corning, Corning, NY, USA, #3693) mit einem TECAN Spark® Mikroplatten Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und der Zellzahl wurde für jede Kavität das gemessene *Firefly*-Signal durch das *Renilla*-Signal dividiert. Estogene Aktivitäten wurden in Prozent zur DMSO-Kontrolle ohne Testsubstanz berechnet und gegen den Logarithmus der

Agonistenkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte der Triplikatbestimmungen mit Standardabweichungen als Fehlerbalken dar. Wenn zulässig, wurde eine sigmoidale Anpassung (*log(agonist) vs. response – variable slope*) und Berechnung des EC<sub>50</sub>-Wertes mit GraphPad Prism® (Version 7.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Zudem wurde jeweils die maximale relative Aktivität (bei 100 µM) im Verhältnis zur maximalen Aktivität der Referenz β-Estradiol (oberes Plateau der Dosis-Wirkungskurve) im jeweiligen Assay in Prozent berechnet. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt, solange nicht anders angegeben.

Zur Testung auf eine antagonistische Wirkung wurden die Testsubstanzen zusammen mit β-Estradiol im beschriebenen Reportergen Assay eingesetzt. Dafür wurden jeweils die oben angegebenen finalen Konzentrationen β-Estradiol sowie das jeweilige Diazocin bzw. die Referenz in den entsprechenden Verdünnungsreihen mit insgesamt 1 % DMSO eingesetzt. Als Positivkontrolle für eine antagonistische Wirkung wurde Raloxifenhydrochlorid (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) verwendet.

## 5.5 Vervielfältigung und Aufreinigung des ERE-Plasmids

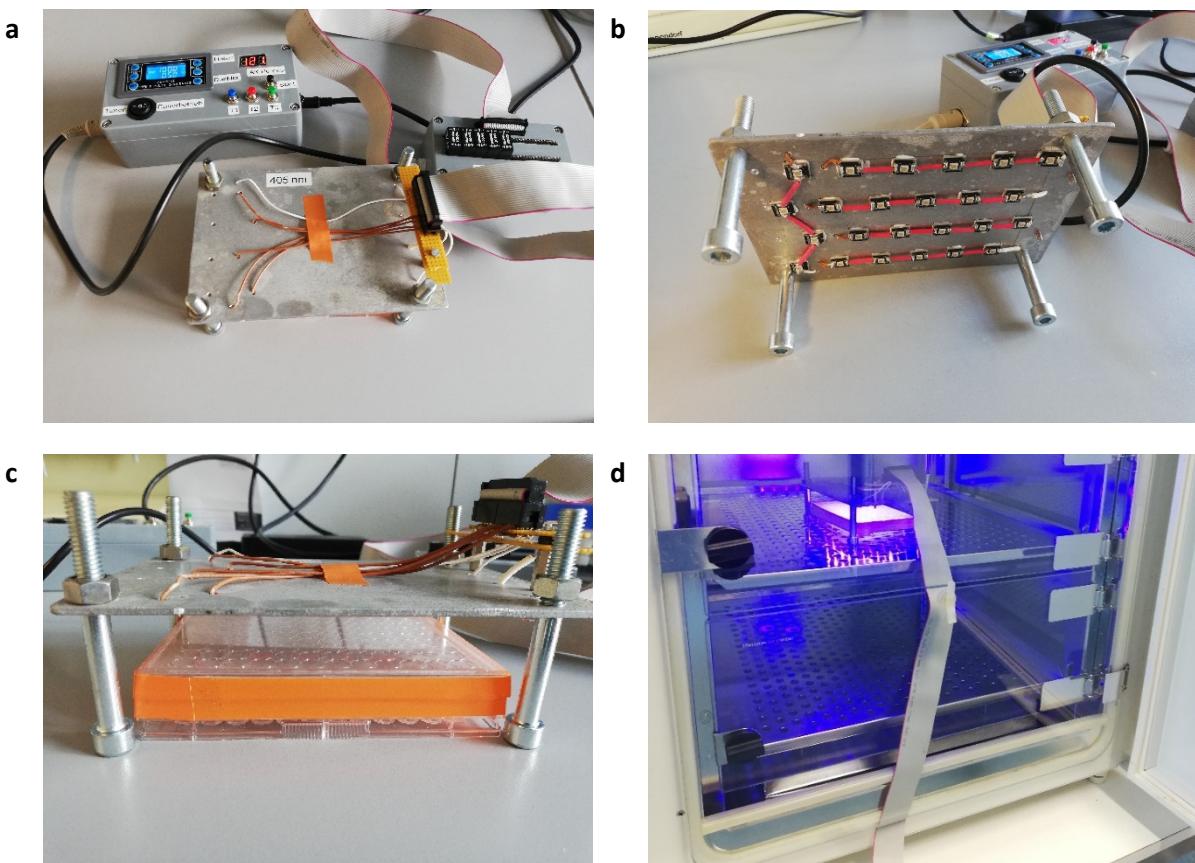
Das Plasmid 3X ERE TATA luc (Addgene #11354) verfügt über eine Ampicillin (Amp)-Resistenz und wurde in transformierten DH5alpha Bakterien geliefert. Die Bakterien wurden nach dem Drei-Strich-Verfahren auf eine Agarplatte (mit Amp) ausgestrichen. Diese wurde mit dem Boden nach oben für ca. 14 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde eine einzelne Kolonie gepickt und damit eine Starter-Kultur angeimpft (2-5 ml LB-Medium mit Amp). Diese wurde für ca. 8 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden mit der Starter-Kultur größere Volumina angeimpft (jeweils 100 ml LB-Medium mit Amp und 200 µl bzw. 1000 µl Starter-Kultur) und diese für weitere ca. 14 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Plasmid-Aufreinigung aus den Bakterienkulturen wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet und nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Abschließend wurde die DNA-Konzentration mit einem eppendorf BioPhotometer (eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

## 5.6 Eigenschaften und Charakterisierung der Zellinkubatorlampen

Zur Bestrahlung des Zellassays im Zellinkubator wurden von Dr. Claus Bier am Otto-Diels-Institut für Organische Chemie spezielle Lampen angefertigt. Der Aufbau beider Lampen (405 nm bzw. 385 nm) ist analog und in Abbildung 5.1 gezeigt. Jeweils 24 LEDs (Nichia NCSU275(T)-U405, 370 mW bzw. U385, 350 mW) sind in regelmäßigen Abständen von unten auf einer Platte befestigt, die über eine Mikrotiterplatte gestellt werden kann. Ein Flachbandkabel ermöglicht die Kabeldurchführung durch die Türdichtungen des Zellinkubators. Über einen angeschlossenen, programmierbaren Timer können die Bestrahlungszyklen sowie die Bestrahlungsintensität eingestellt werden. Für die Mikrotiterplatten wurde ein doppelter Deckel mit dazwischenliegender Diffusorfolie verwendet, um das Licht möglichst gleichmäßig zu verteilen.

Zur Bestimmung der erforderlichen Intensität und Dauer der Bestrahlung, um die Diazocene in dem beschriebenen Aufbau ins PSS zu schalten, wurden UV/VIS-Spektren der Diazocene nach Bestrahlung mit verschiedenen Parametern aufgenommen. Dabei wurden für die Diazocin-Lösungen möglichst vergleichbare Bedingungen zum Zellassay gewählt. Um aber auch die entsprechenden nπ\*-Banden im

UV/VIS-Spektrum gut erkennen zu können, wurden die Diazocene in einer Konzentration von 200 µM in ddH<sub>2</sub>O mit 2 % DMSO vermessen. Bestrahlung und Absorptionsmessung wurden in transparenten 96-well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, #83.3924) durchgeführt, die auch für die Zellassays verwendet wurden. Pro Kavität wurden 110 µl Lösung vorgelegt. Diazocin **11** wurde exemplarisch für die Hydroxydiazocene **10-13** mit 405 nm bestrahlt. Dabei wurde mit 50 % Leistung für 0 s, 10 s, 20 s, 40 s, 1 min, 2 min und 3 min sowie mit 25 % Leistung für 0 s, 1 min, 2 min, 3 min und 5 min bestrahlt. Diazocin **17** wurde exemplarisch für die Benzylalkoholdiazocene **14-17** mit 385 nm bestrahlt. Dabei wurde mit 50 % Leistung für 0 s, 1 min, 2 min, 3 min und 5 min bestrahlt. Nach der jeweiligen Bestrahlungsdauer wurden jeweils 100 µl der Diazocin-Lösung in eine neue 96-well-Platte für die anschließende Absorptionsmessung überführt. Die gesamte Durchführung fand unter kontrollierten Lichtbedingungen statt. Die UV/VIS-Spektren wurden im Bereich von 350 nm - 650 nm an einem TECAN Spark® Mikroplatten Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.



**Abbildung 5.1.** Aufbau der Zellinkubatorlampe. (a) Überblick über Bestrahlungseinheit, Flachbandkabel und Steuerungselement mit Timer. (b) LEDs auf der Unterseite der Platine der Bestrahlungseinheit. (c) Die Bestrahlungseinheit steht über einer 96-well-Platte, die für die Zellassays genutzt wird. Im doppelten Deckel der 96-well-Platte ist eine Diffusorfolie integriert. (d) Bestrahlung der Zellassayplatte im Zellinkubator. Ein Flachbandkabel ermöglicht die Kabeldurchführung durch die Türdichtungen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Velema, W.A.; Szymanski, W.; Feringa, B.L. Photopharmacology: Beyond proof of principle. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2178–2191, doi:10.1021/ja413063e.
- [2] Lerch, M.M.; Hansen, M.J.; van Dam, G.M.; Szymanski, W.; Feringa, B.L. Emerging Targets in Photopharmacology. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 10978–10999, doi:10.1002/anie.201601931.
- [3] Fuchter, M.J. On the Promise of Photopharmacology Using Photoswitches: A Medicinal Chemist’s Perspective. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11436–11447, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00629.
- [4] Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K.A.; Foster, T.H.; Girotti, A.W.; Gollnick, S.O.; Hahn, S.M.; Hamblin, M.R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; *et al.* Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281, doi:10.3322/caac.20114.
- [5] Welleman, I.M.; Hoorens, M.W.H.; Feringa, B.L.; Boersma, H.H.; Szymański, W. Photoresponsive molecular tools for emerging applications of light in medicine. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11672–11691, doi:10.1039/D0SC04187D.
- [6] Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. In Vivo Photopharmacology. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10710–10747, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00037.
- [7] Hoorens, M.W.H.; Szymanski, W. Reversible, Spatial and Temporal Control over Protein Activity Using Light. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 567–575, doi:10.1016/j.tibs.2018.05.004.
- [8] Fenno, L.; Yizhar, O.; Deisseroth, K. The Development and Application of Optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, *34*, 389–412, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113817.
- [9] Sahel, J.-A.; Boulanger-Scemama, E.; Pagot, C.; Arleo, A.; Galluppi, F.; Martel, J.N.; Degli Esposti, S.; Delaux, A.; Saint Aubert, J.-B. de; Montleau, C. de; *et al.* Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1223–1229, doi:10.1038/s41591-021-01351-4.
- [10] Szymański, W.; Beierle, J.M.; Kistemaker, H.A.V.; Velema, W.A.; Feringa, B.L. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178, doi:10.1021/cr300179f.
- [11] Volarić, J.; Szymanski, W.; Simeth, N.A.; Feringa, B.L. Molecular photoswitches in aqueous environments. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12377–12449, doi:10.1039/D0CS00547A.
- [12] Reißing, F.; Szymanski, W. Beyond Photodynamic Therapy: Light-Activated Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 4905–4950, doi:10.2174/0929867323666160906103223.
- [13] Ito, Y.; Kajita, T.; Kunimoto, K.; Matsuura, T. Accelerated photodimerization of stilbenes in methanol and water. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 587–591, doi:10.1021/jo00264a016.
- [14] Beharry, A.A.; Woolley, G.A. Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437, doi:10.1039/c1cs15023e.
- [15] Morstein, J.; Awale, M.; Reymond, J.-L.; Trauner, D. Mapping the Azolog Space Enables the Optical Control of New Biological Targets. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 607–618, doi:10.1021/acscentsci.8b00881.

- [16] Schoenberger, M.; Damijonaitis, A.; Zhang, Z.; Nagel, D.; Trauner, D. Development of a New Photochromic Ion Channel Blocker via Azologization of Fomocaine. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 514–518, doi:10.1021/cn500070w.
- [17] Borowiak, M.; Nahaboo, W.; Reynders, M.; Nekolla, K.; Jalinot, P.; Hasserodt, J.; Rehberg, M.; Delattre, M.; Zahler, S.; Vollmar, A.; *et al.* Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death. *Cell* **2015**, *162*, 403–411, doi:10.1016/j.cell.2015.06.049.
- [18] Engdahl, A.J.; Torres, E.A.; Lock, S.E.; Engdahl, T.B.; Mertz, P.S.; Streu, C.N. Synthesis, Characterization, and Bioactivity of the Photoisomerizable Tubulin Polymerization Inhibitor azo-Combretastatin A4. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4546–4549, doi:10.1021/acs.orglett.5b02262.
- [19] Sheldon, J.E.; Dcona, M.M.; Lyons, C.E.; Hackett, J.C.; Hartman, M.C.T. Photoswitchable anticancer activity via trans–cis isomerization of a combretastatin A-4 analog. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 40–49, doi:10.1039/C5OB02005K.
- [20] Rastogi, S.K.; Zhao, Z.; Barrett, S.L.; Shelton, S.D.; Zafferani, M.; Anderson, H.E.; Blumenthal, M.O.; Jones, L.R.; Wang, L.; Li, X.; *et al.* Photoresponsive azo-combretastatin A-4 analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1–7, doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.012.
- [21] Siewertsen, R.; Neumann, H.; Buchheim-Stehn, B.; Herges, R.; Näther, C.; Renth, F.; Temps, F. Highly efficient reversible Z-E photoisomerization of a bridged azobenzene with visible light through resolved S(1)(n pi\*) absorption bands. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15594–15595, doi:10.1021/ja906547d.
- [22] Hammerich, M.; Schütt, C.; Stähler, C.; Lentes, P.; Röhricht, F.; Höppner, R.; Herges, R. Heterodiazocines: Synthesis and Photochromic Properties, Trans to Cis Switching within the Bio-optical Window. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13111–13114, doi:10.1021/jacs.6b05846.
- [23] Lentes, P.; Stadler, E.; Röhricht, F.; Brahms, A.; Gröbner, J.; Sönnichsen, F.D.; Gescheidt, G.; Herges, R. Nitrogen Bridged Diazocines: Photochromes Switching within the Near-Infrared Region with High Quantum Yields in Organic Solvents and in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13592–13600, doi:10.1021/jacs.9b06104.
- [24] Samanta, S.; Qin, C.; Lough, A.J.; Woolley, G.A. Bidirectional photocontrol of peptide conformation with a bridged azobenzene derivative. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 6452–6455, doi:10.1002/anie.201202383.
- [25] Albert, L.; Peñalver, A.; Djokovic, N.; Werel, L.; Hoffarth, M.; Ruzic, D.; Xu, J.; Essen, L.-O.; Nikolic, K.; Dou, Y.; *et al.* Modulating Protein-Protein Interactions with Visible-Light-Responsive Peptide Backbone Photoswitches. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1417–1429, doi:10.1002/cbic.201800737.
- [26] Preußke, N.; Moormann, W.; Bamberg, K.; Lipfert, M.; Herges, R.; Sönnichsen, F.D. Visible-light-driven photocontrol of the Trp-cage protein fold by a diazocine cross-linker. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 2650–2660, doi:10.1039/c9ob02442e.
- [27] Trads, J.B.; Hüll, K.; Matsuura, B.S.; Laprell, L.; Fehrentz, T.; Görldt, N.; Kozek, K.A.; Weaver, C.D.; Klöcker, N.; Barber, D.M.; *et al.* Sign Inversion in Photopharmacology: Incorporation of Cyclic Azobenzenes in Photoswitchable Potassium Channel Blockers and Openers. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 15421–15428, doi:10.1002/anie.201905790.

- [28] Thapaliya, E.R.; Zhao, J.; Ellis-Davies, G.C.R. Locked-Azobenzene: Testing the Scope of a Unique Photoswitchable Scaffold for Cell Physiology. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 2481–2488, doi:10.1021/acschemneuro.8b00734.
- [29] Cabré, G.; Garrido-Charles, A.; González-Lafont, À.; Moormann, W.; Langbehn, D.; Egea, D.; Lluch, J.M.; Herges, R.; Alibés, R.; Busqué, F.; et al. Synthetic Photoswitchable Neurotransmitters Based on Bridged Azobenzenes. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3780–3784, doi:10.1021/acs.orglett.9b01222.
- [30] Eljabu, F.; Dhruval, J.; Yan, H. Incorporation of cyclic azobenzene into oligodeoxynucleotides for the photo-regulation of DNA hybridization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5594–5596, doi:10.1016/j.bmcl.2015.10.043.
- [31] Sinha, R.P.; Häder, D.-P. UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 225–236, doi:10.1039/b201230h.
- [32] Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P.L.; Urano, Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640, doi:10.1021/cr900263j.
- [33] Weissleder, R.; Ntziachristos, V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123–128, doi:10.1038/nm0103-123.
- [34] Bléger, D.; Hecht, S. Visible-Light-Activated Molecular Switches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11338–11349, doi:10.1002/anie.201500628.
- [35] Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Collins, C.V.; Jarrah, K.; Sadovski, O.; Dai, Q.; Woolley, G.A. Near-Infrared Photoswitching of Azobenzenes under Physiological Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13483–13486, doi:10.1021/jacs.7b06471.
- [36] Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Samanta, S.; Beharry, A.A.; Woolley, G.A. Red-Shifting Azobenzene Photoswitches for in Vivo Use. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2662–2670, doi:10.1021/acs.accounts.5b00270.
- [37] Rezapour Sarabi, M.; Jiang, N.; Ozturk, E.; Yetisen, A.K.; Tasoglu, S. Biomedical optical fibers. *Lab Chip* **2021**, *21*, 627–640, doi:10.1039/DOLC01155J.
- [38] Krebs, M.; Döbber, A.; Rodat, T.; Lützen, U.; Zhao, Y.; Zuhayra, M.; Peifer, C. Photopharmacological Applications for Cherenkov Radiation Generated by Clinically Used Radionuclides. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9010, doi:10.3390/ijms22169010.
- [39] Roskoski, R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 26–48, doi:10.1016/j.phrs.2015.10.021.
- [40] Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Lo Muzio, L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 271–280, doi:10.3892/ijmm.2017.3036.
- [41] Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934, doi:10.1126/science.1075762.
- [42] Schwartz, P.A.; Murray, B.W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 192–210, doi:10.1016/j.bioorg.2011.07.004.

- [43] Fang, Z.; Grütter, C.; Rauh, D. Strategies for the Selective Regulation of Kinases with Allosteric Modulators: Exploiting Exclusive Structural Features. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 58–70, doi:10.1021/cb300663j.
- [44] Buchanan, S.G.; Hindle, J.; Lee, P.S.; Smith, C.R.; Bounaud, P.-Y.; Jessen, K.A.; Tang, C.M.; Huser, N.H.; Felce, J.D.; Froning, K.J.; et al. SGX523 is an exquisitely selective, ATP-competitive inhibitor of the MET receptor tyrosine kinase with antitumor activity in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 3181–3190, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0477.
- [45] Yan, S.B.; Peek, V.L.; Ajamie, R.; Buchanan, S.G.; Graff, J.R.; Heidler, S.A.; Hui, Y.-H.; Huss, K.L.; Konicek, B.W.; Manro, J.R.; et al. LY2801653 is an orally bioavailable multi-kinase inhibitor with potent activity against MET, MST1R, and other oncoproteins, and displays anti-tumor activities in mouse xenograft models. *Invest New Drugs* **2013**, *31*, 833–844, doi:10.1007/s10637-012-9912-9.
- [46] Holmes, K.; Roberts, O.L.; Thomas, A.M.; Cross, M.J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 2003–2012, doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013.
- [47] Musumeci, F.; Radi, M.; Brullo, C.; Schenone, S. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors: Drugs and New Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10797–10822, doi:10.1021/jm301085w.
- [48] Cristofanilli, M.; Charnsangavej, C.; Hortobagyi, G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: Novel clinical approaches. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 415–426, doi:10.1038/nrd819.
- [49] Rini, B.I.; Small, E.J. Biology and Clinical Development of Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Therapy in Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1028–1043, doi:10.1200/JCO.2005.01.186.
- [50] Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem.* **2013**, *153*, 13–19, doi:10.1093/jb/mvs136.
- [51] Zirlik, K.; Duyster, J. Anti-Angiogenics: Current Situation and Future Perspectives. *Oncol Res Treat* **2017**, *41*, 166–171, doi:10.1159/000488087.
- [52] Ishii, Y.; Hamashima, T.; Yamamoto, S.; Sasahara, M. Pathogenetic significance and possibility as a therapeutic target of platelet derived growth factor. *Pathol. Int.* **2017**, *67*, 235–246, doi:10.1111/pin.12530.
- [53] Heldin, C.-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun. Signal.* **2013**, *11*, 97, doi:10.1186/1478-811X-11-97.
- [54] Papadopoulos, N.; Lennartsson, J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Molecular Aspects of Medicine* **2018**, *62*, 75–88, doi:10.1016/j.mam.2017.11.007.
- [55] Colicelli, J. ABL Tyrosine Kinases: Evolution of Function, Regulation, and Specificity. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, re6, doi:10.1126/scisignal.3139re6.
- [56] Khatri, A.; Wang, J.; Pendergast, A.M. Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 9–16, doi:10.1242/jcs.175521.

- [57] Panjarian, S.; Jacob, R.E.; Chen, S.; Engen, J.R.; Smithgall, T.E. Structure and Dynamic Regulation of Abl Kinases. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 5443–5450, doi:10.1074/jbc.R112.438382.
- [58] Cilloni, D.; Saglio, G. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 930–937, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1613.
- [59] Carles, F.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials. *Molecules* **2018**, *23*, 908, doi:10.3390/molecules23040908.
- [60] Bournez, C.; Carles, F.; Peyrat, G.; Aci-Sèche, S.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. Comparative Assessment of Protein Kinase Inhibitors in Public Databases and in PKIDB. *Molecules* **2020**, *25*, 3226, doi:10.3390/molecules25143226.
- [61] Hantschel, O.; Rix, U.; Superti-Furga, G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk. Lymphoma* **2008**, *49*, 615–619, doi:10.1080/10428190801896103.
- [62] Druker, B.J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G.M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N.B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 561–566, doi:10.1038/nm0596-561.
- [63] Weisberg, E.; Manley, P.W.; Breitenstein, W.; Brüggen, J.; Cowan-Jacob, S.W.; Ray, A.; Huntly, B.; Fabbro, D.; Fendrich, G.; Hall-Meyers, E.; et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 129–141, doi:10.1016/j.ccr.2005.01.007.
- [64] O'Hare, T.; Walters, D.K.; Deininger, M.W.N.; Druker, B.J. AMN107: Tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 117–119, doi:10.1016/j.ccr.2005.01.020.
- [65] Mittal, K.; Wood, L.S.; Rini, B.I. Axitinib in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Biol. Ther.* **2012**, *2*, 5, doi:10.1007/s13554-012-0005-2.
- [66] McTigue, M.; Murray, B.W.; Chen, J.H.; Deng, Y.-L.; Solowiej, J.; Kania, R.S. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 18281–18289, doi:10.1073/pnas.1207759109.
- [67] Pemovska, T.; Johnson, E.; Kontro, M.; Repasky, G.A.; Chen, J.; Wells, P.; Cronin, C.N.; McTigue, M.; Kallioniemi, O.; Porkka, K.; et al. Axitinib effectively inhibits BCR-ABL1(T315I) with a distinct binding conformation. *Nature* **2015**, *519*, 102–105, doi:10.1038/nature14119.
- [68] Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacol. Res.* **2021**, *165*, 105463, doi:10.1016/j.phrs.2021.105463.
- [69] Schmidt, D.; Rodat, T.; Heintze, L.; Weber, J.; Horbert, R.; Girreser, U.; Raeker, T.; Bußmann, L.; Kriegs, M.; Hartke, B.; et al. Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2415–2426, doi:10.1002/cmdc.201800531.
- [70] Ferreira, R.; Nilsson, J.R.; Solano, C.; Andréasson, J.; Grøtli, M. Design, Synthesis and Inhibitory Activity of Photoswitchable RET Kinase Inhibitors. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9769, doi:10.1038/srep09769.

- [71] Schehr, M.; Ianes, C.; Weisner, J.; Heintze, L.; Müller, M.P.; Pichlo, C.; Charl, J.; Brunstein, E.; Ewert, J.; Lehr, M.; *et al.* 2-Azo-, 2-diazocine-thiazols and 2-azo-imidazoles as photoswitchable kinase inhibitors: Limitations and pitfalls of the photoswitchable inhibitor approach. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1398–1407, doi:10.1039/c9pp00010k.
- [72] Hoorens, M.W.H.; Ourailidou, M.E.; Rodat, T.; van der Wouden, P.E.; Kobauri, P.; Kriegs, M.; Peifer, C.; Feringa, B.L.; Dekker, F.J.; Szymanski, W. Light-controlled inhibition of BRAFV600E kinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 133–146, doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.042.
- [73] Kolarski, D.; Miró-Vinyals, C.; Sugiyama, A.; Srivastava, A.; Ono, D.; Nagai, Y.; Iida, M.; Itami, K.; Tama, F.; Szymanski, W.; *et al.* Reversible modulation of circadian time with chronopharmacology. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 649, doi:10.1038/s41467-021-23301-x.
- [74] Xu, Y.; Gao, C.; Håversen, L.; Lundbäck, T.; Andréasson, J.; Grøtli, M. Design and development of a photoswitchable DFG-out kinase inhibitor. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 10043–10046, doi:10.1039/D1CC04125H.
- [75] Wilson, D.; Li, J.W.; Branda, N.R. Visible-Light-Triggered Activation of a Protein Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 284–287, doi:10.1002/cmdc.201600632.
- [76] Jia, M.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J.-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *29*, 557–568, doi:10.1016/j.beem.2015.04.008.
- [77] Fuentes, N.; Silveyra, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2019**, *116*, 135–170, doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.
- [78] Vrtačník, P.; Ostanek, B.; Mencej-Bedrač, S.; Marc, J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem. Med.* **2014**, *24*, 329–342, doi:10.11613/BM.2014.035.
- [79] Martinkovich, S.; Shah, D.; Planey, S.L.; Arnott, J.A. Selective estrogen receptor modulators: Tissue specificity and clinical utility. *Clin Interv Aging* **2014**, *9*, 1437–1452, doi:10.2147/CIA.S66690.
- [80] Patel, H.K.; Bihani, T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *186*, 1–24, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.12.012.
- [81] Kiyama, R.; Wada-Kiyama, Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ. Int.* **2015**, *83*, 11–40, doi:10.1016/j.envint.2015.05.012.
- [82] Kavlock, R.J.; Daston, G.P.; DeRosa, C.; Fenner-Crisp, P.; Gray, L.E.; Kaattari, S.; Lucier, G.; Luster, M.; Mac, M.J.; Maczka, C.; *et al.* Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 715–740, doi:10.1289/ehp.96104s4715.
- [83] Kabir, E.R.; Rahman, M.S.; Rahman, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40*, 241–258, doi:10.1016/j.etap.2015.06.009.
- [84] Harris, C.A.; Hamilton, P.B.; Runnalls, T.J.; Vinciotti, V.; Henshaw, A.; Hodgson, D.; Coe, T.S.; Jobling, S.; Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. The Consequences of Feminization in Breeding Groups of Wild Fish. *Environ. Health Perspect.* **2011**, *119*, 306–311, doi:10.1289/ehp.1002555.

- [85] van den Belt, K.; Berckmans, P.; Vangenechten, C.; Verheyen, R.; Witters, H. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17beta-estradiol, estrone, 17alpha-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* **2004**, *66*, 183–195, doi:10.1016/j.aquatox.2003.09.004.
- [86] Beek, T. aus der; Weber, F.-A.; Bergmann, A.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A.; Küster, A. Pharmaceuticals in the environment--Global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *35*, 823–835, doi:10.1002/etc.3339.
- [87] Ramström, H.; Martini, S.; Borgendahl, J.; Ågerstrand, M.; Lärfars, G.; Ovesjö, M.-L. Pharmaceuticals and Environment: A web-based decision support for considering environmental aspects of medicines in use. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *76*, 1151–1160, doi:10.1007/s00228-020-02885-1.
- [88] Tsuchiya, K.; Umeno, T.; Tsuji, G.; Yokoo, H.; Tanaka, M.; Fukuhara, K.; Demizu, Y.; Misawa, T. Development of Photoswitchable Estrogen Receptor Ligands. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2020**, *68*, 398–402, doi:10.1248/cpb.c19-01108.
- [89] Morstein, J.; Trads, J.B.; Hinnah, K.; Willems, S.; Barber, D.M.; Trauner, M.; Merk, D.; Trauner, D. Optical control of the nuclear bile acid receptor FXR with a photohormone. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 429–434, doi:10.1039/c9sc02911g.
- [90] Hinnah, K.; Willems, S.; Morstein, J.; Heering, J.; Hartrampf, F.W.W.; Broichhagen, J.; Leippe, P.; Merk, D.; Trauner, D. Photohormones Enable Optical Control of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 10908–10920, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00654.
- [91] Schehr, M. Synthese und Charakterisierung photoschaltbarer Kinaseinhibitoren. *Dissertation*; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2018**.
- [92] Peifer, C.; Abadleh, M.; Bischof, J.; Hauser, D.; Schattel, V.; Hirner, H.; Knippschild, U.; Laufer, S. 3,4-Diaryl-isoxazoles and -imidazoles as potent dual inhibitors of p38alpha mitogen activated protein kinase and casein kinase 1delta. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7618–7630, doi:10.1021/jm9005127.
- [93] Halekotte, J.; Witt, L.; Ianes, C.; Krüger, M.; Bührmann, M.; Rauh, D.; Pichlo, C.; Brunstein, E.; Luxenburger, A.; Baumann, U.; et al. Optimized 4,5-Diarylimidazoles as Potent/Selective Inhibitors of Protein Kinase CK1 $\delta$  and Their Structural Relation to p38 $\alpha$  MAPK. *Molecules* **2017**, *22*, 522, doi:10.3390/molecules22040522.
- [94] Xu, P.; Ianes, C.; Gärtner, F.; Liu, C.; Burster, T.; Bakulev, V.; Rachidi, N.; Knippschild, U.; Bischof, J. Structure, regulation, and (patho-)physiological functions of the stress-induced protein kinase CK1 delta (CSNK1D). *Gene* **2019**, *715*, 144005, doi:10.1016/j.gene.2019.144005.
- [95] Gupta, J.; Nebreda, A.R. Roles of p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J* **2015**, *282*, 1841–1857, doi:10.1111/febs.13250.
- [96] Bischof, J.; Leban, J.; Zaja, M.; Grothey, A.; Radunsky, B.; Othersen, O.; Strobl, S.; Vitt, D.; Knippschild, U. 2-Benzamido-N-(1H-benzodimidazol-2-yl)thiazole-4-carboxamide derivatives as potent inhibitors of CK1 $\delta/\epsilon$ . *Amino Acids* **2012**, *43*, 1577–1591, doi:10.1007/s00726-012-1234-x.

- [97] García-Reyes, B.; Witt, L.; Jansen, B.; Karasu, E.; Gehring, T.; Leban, J.; Henne-Brunns, D.; Pichlo, C.; Brunstein, E.; Baumann, U.; *et al.* Discovery of Inhibitor of Wnt Production 2 (IWP-2) and Related Compounds As Selective ATP-Competitive Inhibitors of Casein Kinase 1 (CK1)  $\delta/\epsilon$ . *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4087–4102, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00095.
- [98] Ianes, C. Characterization and validation of newly developed inhibitors on wt and mutant CK1 isoforms. *Dissertation*; Universität Ulm, **2019**.
- [99] Weisner, J. *Aktuelle Arbeiten*; Technische Universität Dortmund, **2018**.
- [100] Witt, L. *Aktuelle Arbeiten*; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2017**.
- [101] Keul, M. *Aktuelle Arbeiten*; Technische Universität Dortmund, **2018**.
- [102] Roskoski, R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *94*, 9–25, doi:10.1016/j.phrs.2015.01.003.
- [103] Chen, S.; Cai, C.; Sowalsky, A.G.; Ye, H.; Ma, F.; Yuan, X.; Simon, N.I.; Gray, N.S.; Balk, S.P. BMX-Mediated Regulation of Multiple Tyrosine Kinases Contributes to Castration Resistance in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 5203–5215, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3615.
- [104] Liu, F.; Zhang, X.; Weisberg, E.; Chen, S.; Hur, W.; Wu, H.; Zhao, Z.; Wang, W.; Mao, M.; Cai, C.; *et al.* Discovery of a selective irreversible BMX inhibitor for prostate cancer. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1423–1428, doi:10.1021/cb4000629.
- [105] Cenni, B.; Gutmann, S.; Gottar-Guillier, M. BMX and Its Role in Inflammation, Cardiovascular Disease, and Cancer. *Int. Rev. Immunol.* **2012**, *31*, 166–173, doi:10.3109/08830185.2012.663838.
- [106] Buck, E.; Mulvihill, M. Small molecule inhibitors of the IGF-1R/IR axis for the treatment of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2011**, *20*, 605–621, doi:10.1517/13543784.2011.558501.
- [107] Mulvihill, M.J.; Cooke, A.; Rosenfeld-Franklin, M.; Buck, E.; Foreman, K.; Landfair, D.; O'Connor, M.; Pirritt, C.; Sun, Y.; Yao, Y.; *et al.* Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 1153–1171, doi:10.4155/fmc.09.89.
- [108] Chiappori, A.A.; Otterson, G.A.; Dowlati, A.; Traynor, A.M.; Horn, L.; Owonikoko, T.K.; Ross, H.J.; Hann, C.L.; Abu Hejleh, T.; Nieva, J.; *et al.* A Randomized Phase II Study of Linsitinib (OSI-906) Versus Topotecan in Patients With Relapsed Small-Cell Lung Cancer. *The Oncologist* **2016**, *21*, 1163, doi:10.1634/theoncologist.2016-0220.
- [109] Barata, P.; Cooney, M.; Tyler, A.; Wright, J.; Dreicer, R.; Garcia, J.A. A phase 2 study of OSI-906 (linsitinib, an insulin-like growth factor receptor-1 inhibitor) in patients with asymptomatic or mildly symptomatic (non-opioid requiring) metastatic castrate resistant prostate cancer (CRPC). *Invest New Drugs* **2018**, *36*, 451–457, doi:10.1007/s10637-018-0574-0.
- [110] Mehren, M. von; George, S.; Heinrich, M.C.; Schuetze, S.M.; Yap, J.T.; Yu, J.Q.; Abbott, A.; Litwin, S.; Crowley, J.; Belinsky, M.; *et al.* Linsitinib (OSI-906) for the Treatment of Adult and Pediatric Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors, a SARC Phase II Study. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 1837–1845, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1069.

- [111] Fassnacht, M.; Berruti, A.; Baudin, E.; Demeure, M.J.; Gilbert, J.; Haak, H.; Kroiss, M.; Quinn, D.I.; Hesseltine, E.; Ronchi, C.L.; et al. Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: A double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology* **2015**, *16*, 426–435, doi:10.1016/S1470-2045(15)70081-1.
- [112] Baell, J.B.; Holloway, G.A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740, doi:10.1021/jm901137j.
- [113] Baell, J.B.; Nissink, J.W.M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *13*, 36–44, doi:10.1021/acscchembio.7b00903.
- [114] Chen, Y. *Aktuelle Arbeiten*; Universität Hamburg, **2017**.
- [115] Pragnacharyulu, P.V.P.; Varkhedkar, V.; Curtis, M.A.; Chang, I.F.; Abushanab, E. Adenosine Deaminase Inhibitors: Synthesis and Biological Evaluation of Unsaturated, Aromatic, and Oxo Derivatives of (+)-erythro -9-(2' S -Hydroxy-3' R -nonyl)adenine [(+)-EHNA]. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4694–4700, doi:10.1021/jm0002533.
- [116] Cortés, A.; Gracia, E.; Moreno, E.; Mallol, J.; Lluís, C.; Canelà, E.I.; Casadó, V. Moonlighting Adenosine Deaminase: A Target Protein for Drug Development. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 85–125, doi:10.1002/med.21324.
- [117] O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426, doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- [118] Heintze, L.; Schmidt, D.; Rodat, T.; Witt, L.; Ewert, J.; Kriegs, M.; Herges, R.; Peifer, C. Photoswitchable Azo- and Diazocine-Functionalized Derivatives of the VEGFR-2 Inhibitor Axitinib. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8961, doi:10.3390/ijms21238961.
- [119] Park, H.-J.; Zhang, Y.; Georgescu, S.P.; Johnson, K.L.; Kong, D.; Galper, J.B. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev.* **2006**, *2*, 93–102, doi:10.1007/s12015-006-0015-x.
- [120] Rössler, J.; Monnet, Y.; Farace, F.; Opolon, P.; Daudigeos-Dubus, E.; Bourredjem, A.; Vassal, G.; Geoerger, B. The selective VEGFR1-3 inhibitor axitinib (AG-013736) shows antitumor activity in human neuroblastoma xenografts. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 2748–2758, doi:10.1002/ijc.25611.
- [121] Wei, R.; Ma, Q.; Li, T.; Liu, W.; Sang, Z.; Li, M.; Liu, S. Carbazole alkaloids with antiangiogenic activities from Clausena sinki. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, 387–392, doi:10.1016/j.bioorg.2018.01.032.
- [122] Galvao, J.; Davis, B.; Tilley, M.; Normando, E.; Duchen, M.R.; Cordeiro, M.F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* **2014**, *28*, 1317–1330, doi:10.1096/fj.13-235440.
- [123] Rossari, F.; Minutolo, F.; Orciuolo, E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: From chemical development to clinical efficacy. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 84, doi:10.1186/s13045-018-0624-2.
- [124] Schmidt, D. Design, Synthese und Charakterisierung photoschaltbarer Kinaseinhibitoren. *Dissertation*; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2019**.

- [125] Fu, L.; Xiao, J.; Liu, W.; Zhu, L.; Xie, D.; Jiang, F.; Yang, F. Process for preparation of azobenzene compounds. *Patent-Nr. CN106008458*; Jiaotong-Universität Shanghai, **2016**.
- [126] Cowan-Jacob, S.W.; Fendrich, G.; Floersheimer, A.; Furet, P.; Liebetanz, J.; Rummel, G.; Rheinberger, P.; Centeleghe, M.; Fabbro, D.; Manley, P.W. Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. *Acta Crystallogr. D* **2007**, *63*, 80–93, doi:10.1107/S0907444906047287.
- [127] Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; et al. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749, doi:10.1021/jm0306430.
- [128] Halgren, T.A.; Murphy, R.B.; Friesner, R.A.; Beard, H.S.; Frye, L.L.; Pollard, W.T.; Banks, J.L. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759, doi:10.1021/jm030644s.
- [129] Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P.C.; Mainz, D.T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196, doi:10.1021/jm051256o.
- [130] Mol, C.D.; Dougan, D.R.; Schneider, T.R.; Skene, R.J.; Kraus, M.L.; Scheibe, D.N.; Snell, G.P.; Zou, H.; Sang, B.-C.; Wilson, K.P. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31655–31663, doi:10.1074/jbc.M403319200.
- [131] Schlosser, J. Design, Synthese und biologische Evaluierung von 3,5-disubstituierten (1H)-Pyrazinonen als Tyrosinkinaseinhibitoren. *Dissertation*; Eberhard-Karls-Universität Tübingen, **2011**.
- [132] Bethke, E.; Pinchuk, B.; Renn, C.; Witt, L.; Schlosser, J.; Peifer, C. From Type I to Type II: Design, Synthesis, and Characterization of Potent Pyrazin-2-ones as DFG-Out Inhibitors of PDGFR $\beta$ . *ChemMedChem* **2016**, *11*, 2664–2674, doi:10.1002/cmdc.201600494.
- [133] Zindler, M.; Pinchuk, B.; Renn, C.; Horbert, R.; Döbber, A.; Peifer, C. Design, Synthesis, and Characterization of a Photoactivatable Caged Prodrug of Imatinib. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1335–1338, doi:10.1002/cmdc.201500163.
- [134] Iwata, H.; Imamura, S.; Hori, A.; Hixon, M.S.; Kimura, H.; Miki, H. Biochemical characterization of TAK-593, a novel VEGFR/PDGFR inhibitor with a two-step slow binding mechanism. *Biochemistry* **2011**, *50*, 738–751, doi:10.1021/bi101777f.
- [135] Kitagawa, D.; Yokota, K.; Gouda, M.; Narumi, Y.; Ohmoto, H.; Nishiwaki, E.; Akita, K.; Kirii, Y. Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes Cells* **2013**, *18*, 110–122, doi:10.1111/gtc.12022.
- [136] Mahboobi, S.; Dove, S.; Sellmer, A.; Winkler, M.; Eichhorn, E.; Pongratz, H.; Ciossek, T.; Baer, T.; Maier, T.; Beckers, T. Design of chimeric histone deacetylase- and tyrosine kinase-inhibitors: A series of imatinib hybrids as potent inhibitors of wild-type and mutant BCR-ABL, PDGF-Rbeta, and histone deacetylases. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2265–2279, doi:10.1021/jm800988r.
- [137] Deininger, M.; Buchdunger, E.; Druker, B.J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **2005**, *105*, 2640–2653, doi:10.1182/blood-2004-08-3097.

- [138] Medarametla, V.; Festin, S.; Sugarragchaa, C.; Eng, A.; Naqwi, A.; Wiedmann, T.; Zisman, L.S. PK10453, a nonselective platelet-derived growth factor receptor inhibitor, prevents the progression of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **2014**, *4*, 82–102, doi:10.1086/674881.
- [139] Wodicka, L.M.; Ciceri, P.; Davis, M.I.; Hunt, J.P.; Floyd, M.; Salerno, S.; Hua, X.H.; Ford, J.M.; Armstrong, R.C.; Zarrinkar, P.P.; et al. Activation state-dependent binding of small molecule kinase inhibitors: Structural insights from biochemistry. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1241–1249, doi:10.1016/j.chembiol.2010.09.010.
- [140] Samanta, S.; Beharry, A.A.; Sadovski, O.; McCormick, T.M.; Babalhavaeji, A.; Tropepe, V.; Woolley, G.A. Photoswitching Azo Compounds in Vivo with Red Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9777–9784, doi:10.1021/ja402220t.
- [141] Kolarski, D.; Sugiyama, A.; Rodat, T.; Schulte, A.; Peifer, C.; Itami, K.; Hirota, T.; Feringa, B.L.; Szymanski, W. Reductive stability evaluation of 6-azopurine photoswitches for the regulation of CK $\alpha$  activity and circadian rhythms. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2312–2321, doi:10.1039/d1ob00014d.
- [142] Herschel, S. *Aktuelle Arbeiten*; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2021**.
- [143] Yaşar, P.; Ayaz, G.; User, S.D.; Güpür, G.; Muyan, M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod. Med. Biol.* **2017**, *16*, 4–20, doi:10.1002/rmb2.12006.
- [144] Brzozowski, A.M.; Pike, A.C.; Dauter, Z.; Hubbard, R.E.; Bonn, T.; Engström, O.; Ohman, L.; Greene, G.L.; Gustafsson, J.A.; Carlquist, M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **1997**, *389*, 753–758, doi:10.1038/39645.
- [145] Peifer, C. *Aktuelle Arbeiten*; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2021**.
- [146] Sanoh, S.; Kitamura, S.; Sugihara, K.; Fujimoto, N.; Ohta, S. Estrogenic Activity of Stilbene Derivatives. *J. Health Sci.* **2003**, *49*, 359–367, doi:10.1248/jhs.49.359.
- [147] Anisimova, N.Y.; Kiselevsky, M.V.; Sosnov, A.V.; Sadovnikov, S.V.; Stankov, I.N.; Gakh, A.A. Trans, cis-, and dihydro-resveratrol: A comparative study. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 88, doi:10.1186/1752-153X-5-88.
- [148] Fontenot, G.K.; Wiehle, R.D.; Podolski, J.S. Differential effects of isomers of clomiphene citrate on reproductive tissues in male mice. *BJU Int.* **2016**, *117*, 344–350, doi:10.1111/bju.13244.
- [149] Ewert, J. *Aktuelle Arbeiten*; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2021**.
- [150] Ball, P.; Nicholls, C.H. Azo-hydrazone tautomerism of hydroxyazo compounds—a review. *Dyes and Pigments* **1982**, *3*, 5–26, doi:10.1016/0143-7208(82)80010-7.
- [151] Chen, X.-C.; Tao, T.; Wang, Y.-G.; Peng, Y.-X.; Huang, W.; Qian, H.-F. Azo-hydrazone tautomerism observed from UV-vis spectra by pH control and metal-ion complexation for two heterocyclic disperse yellow dyes. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 11107–11115, doi:10.1039/c2dt31102j.
- [152] Moormann, W.; Langbehn, D.; Herges, R. Synthesis of functionalized diazocines for application as building blocks in photo- and mechanoresponsive materials. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 727–732, doi:10.3762/bjoc.15.68.

- [153] Lentes, P.; Fröhwirt, P.; Freißmuth, H.; Moormann, W.; Kruse, F.; Gescheidt, G.; Herges, R. Photoswitching of Diazocines in Aqueous Media. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 4355–4360, doi:10.1021/acs.joc.1c00065.
- [154] Nonell Marrugat, S. *Aktuelle Arbeiten*; IQS Ingenieursschule, Ramon-Llull-Universität, Barcelona, **2021**.
- [155] Hall, J.M.; McDonnell, D.P. The estrogen receptor beta-isoform (ER $\beta$ ) of the human estrogen receptor modulates ER $\alpha$  transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* **1999**, *140*, 5566–5578, doi:10.1210/endo.140.12.7179.
- [156] Kwon, J.; Oh, K.S.; Cho, S.-Y.; Bang, M.A.; Kim, H.S.; Vaidya, B.; Kim, D. Estrogenic Activity of Hyperforin in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Transfected with Estrogen Receptor. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1425–1430, doi:10.1055/s-0042-112594.
- [157] Kuznetsov, Y.V.; Levina, I.S.; Scherbakov, A.M.; Andreeva, O.E.; Fedyushkina, I.V.; Dmitrenok, A.S.; Shashkov, A.S.; Zavarzin, I.V. New estrogen receptor antagonists. 3,20-Dihydroxy-19-norpregna-1,3,5(10)-trienes: Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 670–682, doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.042.
- [158] Sun, H.; Xu, X.-L.; Qu, J.-H.; Hong, X.; Wang, Y.-B.; Xu, L.-C.; Wang, X.-R. 4-Alkylphenols and related chemicals show similar effect on the function of human and rat estrogen receptor alpha in reporter gene assay. *Chemosphere* **2008**, *71*, 582–588, doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.031.
- [159] Hall, J.M.; Korach, K.S. Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44455–44461, doi:10.1074/jbc.M200849200.
- [160] Druckrey, H.; Danneberg, P.; Schmaehl, D. Ein oestrogener Azo-Farbstoff. *Zeitschrift für Naturforschung B* **1950**, *5*, 27–28, doi:10.1515/znb-1950-0104.
- [161] Wojtalla, F. *Aktuelle Arbeiten*; Universität zu Köln, **2021**.
- [162] Gebel, J. *Aktuelle Arbeiten*; Goethe-Universität Frankfurt am Main, **2021**.
- [163] Lentes, P.; Rudtke, J.; Griebenow, T.; Herges, R. Substituted nitrogen-bridged diazocines. *Beilstein J. Org. Chem.* **2021**, *17*, 1503–1508, doi:10.3762/bjoc.17.107.
- [164] Kaulich, P.; Bilke, S. *Aktuelle Arbeiten*; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2021**.
- [165] Levine, W.G. Metabolism of AZO Dyes: Implication for Detoxication and Activation. *Drug Metab. Rev.* **1991**, *23*, 253–309, doi:10.3109/03602539109029761.
- [166] Feng, J. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Front Biosci* **2012**, *E4*, 568, doi:10.2741/400.
- [167] Reynders, M.; Chaikuad, A.; Berger, B.-T.; Bauer, K.; Koch, P.; Laufer, S.; Knapp, S.; Trauner, D. Controlling the Covalent Reactivity of a Kinase Inhibitor with Light. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 20178–20183, doi:10.1002/anie.202103767.
- [168] Pfaff, P.; Samarasringhe, K.T.G.; Crews, C.M.; Carreira, E.M. Reversible Spatiotemporal Control of Induced Protein Degradation by Bistable PhotoPROTACs. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1682–1690, doi:10.1021/acscentsci.9b00713.

- [169] Reynders, M.; Matsuura, B.S.; Bérouti, M.; Simoneschi, D.; Marzio, A.; Pagano, M.; Trauner, D. PHOTACs enable optical control of protein degradation. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, 5064, doi:10.1126/sciadv.aay5064.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| ABL1               | Tyrosinkinase ABL1 ( <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> ) |
| ADA                | Adenosin Desaminase  |
| ADP                | Adenosindiphosphat   |
| ALL                | akute lymphatische Leukämie  |
| ATP                | Adenosintriphosphat  |
| BCR-ABL            | Fusionsprotein <i>breakpoint cluster region-ABL</i>                            |
| BMX                | <i>bone marrow tyrosine kinase on chromosome X</i>                             |
| BSA                | <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)                               |
| CK1 $\delta$       | <i>Casein kinase 1 <math>\delta</math></i>                                     |
| CML                | chronische myeloische Leukämie   |
| DBD                | DNA-Bindedomäne  |
| ddH <sub>2</sub> O | doppelt destilliertes Wasser   |
| DFG                | Aspartat-Phenylalanin-Glycin   |
| DMEM               | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>                                      |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure   |
| DPBS               | <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>                                    |
| DTT                | Dithiothreitol   |
| EC <sub>50</sub>   | mittlere effektive Konzentration   |
| EHNA               | <i>erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenin</i>                                    |
| ER                 | Estrogenrezeptor   |
| ERE                | <i>estrogen response element</i>   |
| FBS                | <i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)                                |
| FDA                | <i>Food and Drug Administration USA</i>  |
| GPER1              | G-Protein-gekoppelte ER  |
| HIF-1 $\alpha$     | Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$  |

|                  |   |
|------------------|---|
| HTS              | <i>high throughput</i> (Hochdurchsatz-) screening   |
| HUVEC            | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen)                      |
| IC <sub>50</sub> | mittlere inhibitorische Konzentration   |
| IGF-1R           | <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>  |
| K <sub>d</sub>   | Dissoziationskonstante  |
| KDR              | <i>kinase insert domain receptor</i>  |
| λ <sub>exc</sub> | Anregungswellenlänge  |
| LBD              | Ligand-Bindedomäne  |
| LC-MS            | <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i><br>(Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) |
| LED              | <i>light-emitting diode</i> (Leuchtdiode)   |
| max. rel. Akt.   | maximale relative Aktivität   |
| MCF-7            | Brustkrebs-Zelllinie ( <i>Michigan Cancer Foundation - 7</i> )  |
| n/a              | <i>not available</i> (nicht verfügbar)  |
| NIR              | Nahinfrarot   |
| NMR              | <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i><br>(Kernspinresonanzspektroskopie)                           |
| NTD              | <i>N</i> -terminale Domäne  |
| OD               | optische Dichte   |
| p38α MAPK        | <i>p38α mitogen-activated protein kinase</i>  |
| PAINS            | <i>pan-assay interference compounds</i>   |
| PCR              | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)  |
| PDB              | <i>Protein Data Bank</i> (Protein-Datenbank)  |
| PDGFR            | <i>platelet-derived growth factor receptor</i>  |
| PSS              | <i>photostationary state</i> (photostationäres Gleichgewicht)   |
| RCC              | <i>renal cell carcinoma</i> (Nierenzellkarzinom)  |

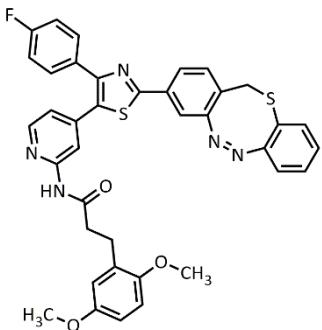
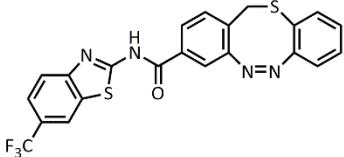
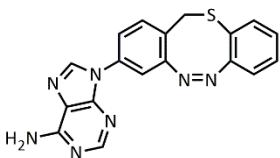
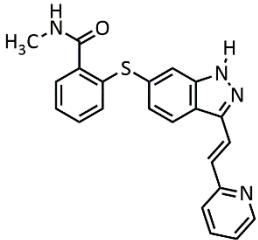
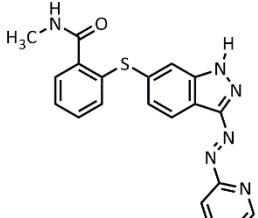
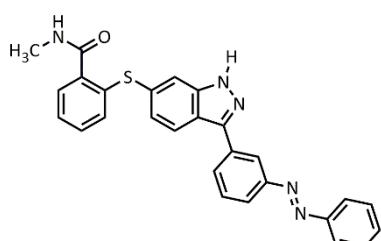
|           |  |
|-----------|--|
| SD        | <i>standard deviation</i> (Standardabweichung)     |
| SERM      | selektiver Estrogenrezeptor-Modulator              |
| SRC       | Tyrosinkinase SRC ( <i>sarcoma</i> )               |
| $t_{1/2}$ | Halbwertszeit                                      |
| UV/VIS    | <i>ultraviolet/visible</i> (ultraviolett/sichtbar) |
| VEGFR     | <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> |
| VHL       | von-Hippel-Lindau                                  |
| ZNS       | Zentralnervensystem                                |

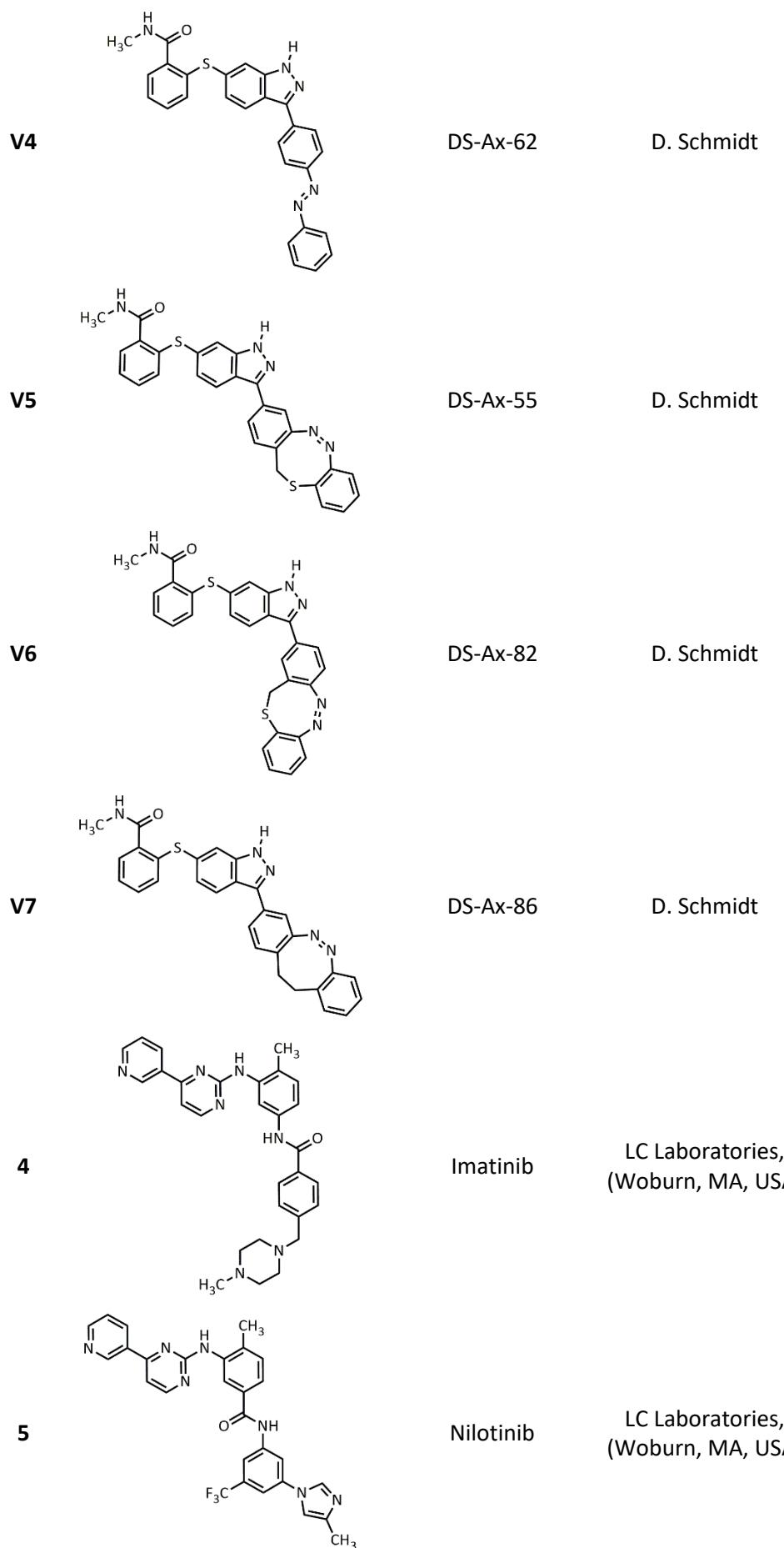


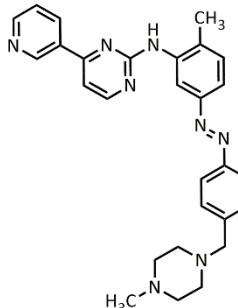
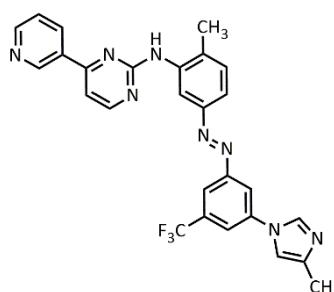
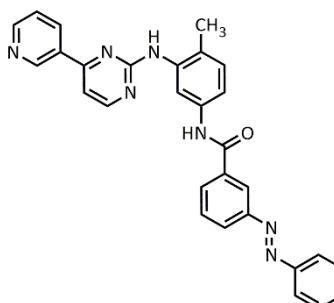
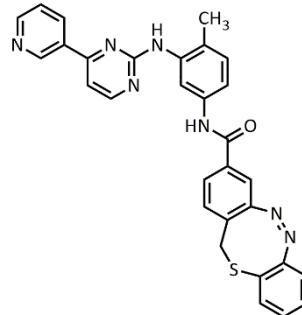
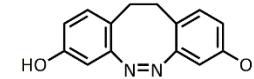
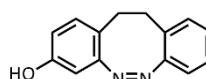
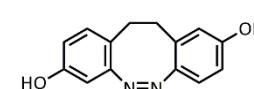
## 8 Molekülverzeichnis

Verbindungsnummern **V1-V7** beziehen sich auf die Veröffentlichung:

*Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(23), 8961, doi:10.3390/ijms21238961.

| #  | Struktur  | internes<br>Laborkürzel/<br>Wirkstoffname | Hersteller                            |
|----|---|---|---------------------------------------|
| 1  |    | MIS-175                                   | M. Schehr                             |
| 2  |   | MiS-188                                   | M. Schehr                             |
| 3  |  | MiS-198                                   | M. Schehr                             |
| V1 |  | Axitinib                                  | LC Laboratories,<br>(Woburn, MA, USA) |
| V2 |  | Lydia 3                                   | L. Witt                               |
| V3 |  | DS-Ax-47                                  | D. Schmidt                            |



|   |           |          |                            |
|---|-----------|----------|----------------------------|
|    | <b>6</b>  | SvH-6    | S. Herschel/<br>D. Schmidt |
|    | <b>7</b>  | DS-Im-01 | D. Schmidt                 |
|   | <b>8</b>  | DS-Im-05 | D. Schmidt                 |
|  | <b>9</b>  | DS-Im-03 | D. Schmidt                 |
|  | <b>10</b> | JEW-01   | J. Ewert                   |
|  | <b>11</b> | JEW-28   | J. Ewert                   |
|  | <b>12</b> | JEW-29   | J. Ewert                   |



## 9 Anhang

### 9.1 ProQinase Screening

**Tabelle 9.1.** Diazocine 1-3 im Kinase-screening der Firma ProQinase (Freiburg, Deutschland). Diazocin 1 (internes Laborkürzel: MiS-175), Diazocin 2 (internes Laborkürzel: MiS-188) und Diazocin 3 (internes Laborkürzel: MiS-198) wurden jeweils in den Konzentrationen 10 µM und 1 µM auf 320 Wildtyp-Kinasen vermessen. Der Assay wurde unter gewöhnlichem Umgebungslicht durchgeführt. Die Restaktivitäten der (inhibierten) Kinasen sind jeweils in Prozent zur Kontrolle angegeben. Gelb markierte Felder kennzeichnen Restaktivitäten < 50 %.

| #   | Kinase Name         | Kinase Family* | Assay Conc. (M) | Cpd ID  | MIS-175 | MIS-175 | MIS-188 | MIS-188 | MIS-198 | MIS-198 |
|-----|---------------------|----------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|     |                     |                |                 | 1.0E-06 | 1.0E-05 | 1.0E-06 | 1.0E-05 | 1.0E-06 | 1.0E-05 | 1.0E-05 |
| 1   | ABL1                | TK             |                 | 100     | 83      | 96      | 86      | 101     | 99      |         |
| 2   | ABL2                | TK             |                 | 22      | 22      | 72      | 66      | 108     | 99      |         |
| 3   | ACK1                | TK             |                 | 26      | 14      | 64      | 69      | 97      | 82      |         |
| 4   | ACV-R1              | TKL            |                 | 97      | 84      | 95      | 84      | 109     | 93      |         |
| 5   | ACV-R1B             | TKL            |                 | 96      | 87      | 90      | 97      | 99      | 99      |         |
| 6   | ACV-R2A             | TKL            |                 | 96      | 69      | 83      | 105     | 104     | 87      |         |
| 7   | ACV-R2B             | TKL            |                 | 97      | 80      | 100     | 75      | 103     | 95      |         |
| 8   | ACV-R1L             | TKL            |                 | 98      | 83      | 104     | 115     | 102     | 97      |         |
| 9   | AKT1 aa1-490        | AGU            |                 | 101     | 101     | 59      | 92      | 93      | 81      |         |
| 10  | AKT2 aa1-479        | AGC            |                 | 104     | 118     | 107     | 112     | 93      | 89      |         |
| 11  | AKT3 aa1-479        | AGC            |                 | 91      | 88      | 97      | 86      | 110     | 99      |         |
| 12  | ALK (GST-HIS-tag)   | TK             |                 | 65      | 7       | 70      | 39      | 96      | 85      |         |
| 13  | AMPK-alpha1 aa1-550 | CAMK           |                 | 100     | 94      | 102     | 76      | 103     | 95      |         |
| 14  | ARK5                | CAMK           |                 | 87      | 98      | 103     | 100     | 81      | 86      |         |
| 15  | ASK1                | STE            |                 | 91      | 96      | 98      | 97      | 99      | 96      |         |
| 16  | Aurora-A            | OTHER          |                 | 114     | 104     | 110     | 96      | 99      | 97      |         |
| 17  | Aurora-B            | OTHER          |                 | 123     | 84      | 106     | 82      | 97      | 95      |         |
| 18  | Aurora-C            | OTHER          |                 | 98      | 57      | 98      | 100     | 105     | 105     |         |
| 19  | AXL                 | TK             |                 | 93      | 73      | 55      | 83      | 117     | 97      |         |
| 20  | BLK                 | TK             |                 | 30      | 10      | 60      | 83      | 97      | 84      |         |
| 21  | BMPR1A              | TKL            |                 | 102     | 81      | 97      | 87      | 94      | 94      |         |
| 22  | BMX                 | TK             |                 | 13      | 7       | 38      | 43      | 93      | 75      |         |
| 23  | B-RAF               | TKL            |                 | 101     | 107     | 96      | 105     | 108     | 103     |         |
| 24  | BRK                 | TK             |                 | 30      | 1       | 81      | 97      | 97      | 101     |         |
| 25  | BRSK1               | CAMK           |                 | 91      | 91      | 92      | 88      | 99      | 99      |         |
| 26  | BRSK2               | CAMK           |                 | 93      | 95      | 95      | 92      | 88      | 82      |         |
| 27  | BTG                 | TK             |                 | 85      | 20      | 94      | 75      | 111     | 107     |         |
| 28  | BUD15               | OTHER          |                 | 106     | 10      | 107     | 80      | 102     | 86      |         |
| 29  | CAMK1D              | CAMK           |                 | 100     | 120     | 101     | 113     | 114     | 105     |         |
| 30  | CAMK2A              | CAMK           |                 | 89      | 72      | 82      | 78      | 79      | 83      |         |
| 31  | CAMK2B              | CAMK           |                 | 103     | 84      | 95      | 90      | 102     | 92      |         |
| 32  | CAMK2D              | CAMK           |                 | 88      | 80      | 96      | 84      | 100     | 94      |         |
| 33  | CAMK2G              | CAMK           |                 | 68      | 52      | 66      | 61      | 101     | 77      |         |
| 34  | CAMK4               | CAMK           |                 | 116     | 101     | 96      | 116     | 103     | 102     |         |
| 35  | CAMKK1              | OTHER          |                 | 91      | 139     | 98      | 122     | 107     | 103     |         |
| 36  | CAMKK2              | OTHER          |                 | 105     | 96      | 115     | 106     | 104     | 85      |         |
| 37  | CDK5/p35            | TKL            |                 | 74      | 52      | 60      | 54      | 54      | 71      |         |
| 38  | CDK5/p35B           | AGC            |                 | 63      | 77      | 91      | 76      | 95      | 80      |         |
| 39  | CDG7/BF4            | OTHER          |                 | 75      | 68      | 88      | 90      | 105     | 98      |         |
| 40  | CDK1/cycA2          | CMGC           |                 | 102     | 88      | 98      | 97      | 97      | 86      |         |
| 41  | CDK1/cycB1          | CMGC           |                 | 107     | 91      | 116     | 97      | 104     | 95      |         |
| 42  | CDK1/cycE1          | CMGC           |                 | 98      | 98      | 101     | 87      | 93      | 93      |         |
| 43  | CDK16/CycY          | CMGC           |                 | 102     | 106     | 106     | 96      | 97      | 94      |         |
| 44  | CDK19/CycC          | CMGC           |                 | 83      | 84      | 96      | 93      | 104     | 99      |         |
| 45  | CDK2/cycA2          | CMGC           |                 | 94      | 83      | 97      | 93      | 100     | 107     |         |
| 46  | CDK2/cycE1          | CMGC           |                 | 107     | 108     | 108     | 99      | 99      | 99      |         |
| 47  | CDK3/cycC           | CMGC           |                 | 112     | 87      | 100     | 95      | 98      | 96      |         |
| 48  | CDK3/cycE1          | CMGC           |                 | 104     | 93      | 113     | 105     | 99      | 108     |         |
| 49  | CDK4/cycD1          | CMGC           |                 | 101     | 85      | 92      | 94      | 100     | 93      |         |
| 50  | CDK4/cycD3          | CMGC           |                 | 101     | 90      | 98      | 101     | 99      | 101     |         |
| 51  | CDK5/p35NC          | CMGC           |                 | 129     | 101     | 89      | 98      | 94      | 100     |         |
| 52  | CDK5/p35NC          | CMGC           |                 | 104     | 91      | 101     | 106     | 101     | 99      |         |
| 53  | CDK6/cycD1          | CMGC           |                 | 110     | 97      | 114     | 96      | 97      | 97      |         |
| 54  | CDK6/cycD3          | CMGC           |                 | 102     | 99      | 108     | 109     | 97      | 93      |         |
| 55  | CDK7/cycMAT1        | CMGC           |                 | 104     | 97      | 108     | 110     | 100     | 100     |         |
| 56  | CDP/cycC            | CMGC           |                 | 110     | 91      | 92      | 112     | 89      | 101     |         |
| 57  | CD98/cycK           | CMGC           |                 | 101     | 92      | 98      | 76      | 88      | 102     |         |
| 58  | CD98/cycT1          | CMGC           |                 | 114     | 112     | 88      | 91      | 104     | 104     |         |
| 59  | CHK1                | CAMK           |                 | 93      | 88      | 110     | 110     | 107     | 94      |         |
| 60  | CHK2                | CAMK           |                 | 86      | 56      | 86      | 94      | 101     | 84      |         |
| 61  | CK1-alpha1          | CK1            |                 | 105     | 92      | 108     | 99      | 104     | 96      |         |
| 62  | CK1-delta           | CK1            |                 | 85      | 76      | 85      | 79      | 89      | 83      |         |
| 63  | CK1-epsilon         | CK1            |                 | 81      | 73      | 91      | 94      | 96      | 85      |         |
| 64  | CK1-gamma1          | CK1            |                 | 101     | 101     | 91      | 86      | 91      | 87      |         |
| 65  | CK1-gamma2          | CK1            |                 | 102     | 95      | 98      | 94      | 88      | 81      |         |
| 66  | CK1-gamma3          | CK1            |                 | 95      | 87      | 90      | 85      | 104     | 98      |         |
| 67  | CK2-alpha1          | OTHER          |                 | 93      | 91      | 84      | 84      | 94      | 94      |         |
| 68  | CK2-alpha2          | OTHER          |                 | 97      | 77      | 93      | 93      | 90      | 92      |         |
| 69  | CLK1                | CMGC           |                 | 68      | 52      | 86      | 77      | 84      | 72      |         |
| 70  | CLK2                | CMGC           |                 | 87      | 79      | 90      | 23      | 94      | 82      |         |
| 71  | CLK3                | CMGC           |                 | 86      | 77      | 85      | 79      | 98      | 93      |         |
| 72  | CLK4                | CMGC           |                 | 81      | 72      | 81      | 74      | 71      | 62      |         |
| 73  | COT                 | STE            |                 | 100     | 84      | 94      | 90      | 107     | 99      |         |
| 74  | CSF1-R              | TK             |                 | 26      | 13      | 49      | 66      | 105     | 93      |         |
| 75  | CSK                 | TK             |                 | 46      | 14      | 91      | 89      | 91      | 82      |         |
| 76  | DAPK1               | CAMK           |                 | 101     | 52      | 62      | 89      | 109     | 95      |         |
| 77  | DAPK2               | CAMK           |                 | 92      | 85      | 95      | 87      | 100     | 88      |         |
| 78  | DAPK3               | CAMK           |                 | 100     | 94      | 89      | 94      | 91      | 88      |         |
| 79  | DCAMKL2             | CAMK           |                 | 97      | 88      | 98      | 80      | 85      | 81      |         |
| 80  | DDR2                | TK             |                 | 109     | 108     | 108     | 99      | 99      | 104     |         |
| 81  | DMPK                | AGC            |                 | 93      | 50      | 96      | 93      | 106     | 96      |         |
| 82  | DNA-PK              | ATYPICAL       |                 | 100     | 104     | 93      | 91      | 90      | 78      |         |
| 83  | DYRK1A              | CMGC           |                 | 104     | 92      | 89      | 102     | 100     | 97      |         |
| 84  | DYRK1B              | CMGC           |                 | 91      | 61      | 112     | 98      | 101     | 99      |         |
| 85  | DYRK2               | CMGC           |                 | 90      | 70      | 99      | 88      | 97      | 95      |         |
| 86  | DYRK3               | CMGC           |                 | 88      | 71      | 93      | 78      | 82      | 95      |         |
| 87  | DYRK4               | CMGC           |                 | 91      | 82      | 88      | 87      | 94      | 91      |         |
| 88  | EEF2K               | ATYPICAL       |                 | 97      | 96      | 104     | 101     | 95      | 94      |         |
| 89  | EGF-R               | TK             |                 | 23      | 13      | 40      | 54      | 98      | 80      |         |
| 90  | EIF2AK2             | OTHER          |                 | 115     | 115     | 104     | 105     | 93      | 127     |         |
| 91  | EIF2AK3             | OTHER          |                 | 120     | 90      | 96      | 98      | 102     | 86      |         |
| 92  | EPHA1               | TK             |                 | 62      | 57      | 96      | 81      | 108     | 92      |         |
| 93  | EPHA2               | TK             |                 | 70      | 24      | 79      | 66      | 103     | 94      |         |
| 94  | EPHA3               | TK             |                 | 57      | 9       | 81      | 74      | 108     | 102     |         |
| 95  | EPHA4               | TK             |                 | 119     | 107     | 94      | 100     | 97      | 92      |         |
| 96  | EPHA5               | TK             |                 | 37      | 27      | 67      | 42      | 96      | 85      |         |
| 97  | EPHA6               | TK             |                 | 65      | 47      | 89      | 92      | 118     | 109     |         |
| 98  | EPHA7               | TK             |                 | 58      | 42      | 74      | 75      | 100     | 90      |         |
| 99  | EPHA8               | TK             |                 | 53      | 22      | 67      | 68      | 98      | 109     |         |
| 100 | EPHB1               | TK             |                 | 16      | 3       | 61      | 60      | 111     | 95      |         |
| 101 | EPHB2               | TK             |                 | 82      | 66      | 99      | 96      | 112     | 112     |         |
| 102 | EPHB3               | TK             |                 | 64      | 55      | 88      | 99      | 113     | 118     |         |
| 103 | EPHB4               | TK             |                 | 85      | 12      | 57      | 54      | 80      | 79      |         |
| 104 | ERBB2               | TK             |                 | 76      | 59      | 97      | 90      | 103     | 93      |         |
| 105 | ERBB4               | TK             |                 | 86      | 47      | 77      | 82      | 108     | 87      |         |
| 106 | ERK1                | CMGC           |                 | 69      | 50      | 62      | 58      | 66      | 66      |         |
| 107 | ERK2                | CMGC           |                 | 94      | 73      | 100     | 88      | 94      | 89      |         |
| 108 | ERK5                | CMGC           |                 | 84      | 81      | 91      | 85      | 108     | 100     |         |
| 109 | ERK7                | CMGC           |                 | 85      | 81      | 103     | 87      | 104     | 89      |         |
| 110 | FAK aa2-1052        | TK             |                 | 72      | 33      | 72      | 74      | 99      | 113     |         |

| #   | Kinase Name        | Kinase Family* | Cpd ID          | MIS-175 | MIS-175 | MIS-188 | MIS-188 | MIS-198 | MIS-198 |
|-----|--------------------|----------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|     |                    |                | Assay Conc. (M) | 1.0E-06 | 1.0E-05 | 1.0E-06 | 1.0E-05 | 1.0E-06 | 1.0E-05 |
| 111 | FER                | TK             |                 | 19      | 57      | 55      | 56      | 106     | 82      |
| 112 | FES                | TK             |                 | 28      | 19      | 38      | 55      | 110     | 92      |
| 113 | FGF-R1             | TK             |                 | 76      | 36      | 86      | 99      | 102     | 96      |
| 114 | FGF-R2             | TK             |                 | 12      | 2       | 54      | 55      | 102     | 83      |
| 115 | FGF-R3             | TK             |                 | 25      | 5       | 61      | 61      | 101     | 95      |
| 116 | FGF-R4             | TK             |                 | 46      | 27      | 80      | 85      | 109     | 119     |
| 117 | FGR                | TK             |                 | 50      | 40      | 62      | 80      | 95      | 104     |
| 118 | FLT3               | TK             |                 | 89      | 48      | 87      | 87      | 95      | 94      |
| 119 | FRK                | TK             |                 | 78      | 34      | 83      | 72      | 102     | 95      |
| 120 | FYN                | TK             |                 | 29      | 19      | 45      | 55      | 92      | 96      |
| 121 | GRK2               | AGC            |                 | 88      | 87      | 88      | 91      | 87      | 90      |
| 122 | GRK3               | AGC            |                 | 108     | 86      | 99      | 86      | 111     | 110     |
| 123 | GRK4               | AGC            |                 | 79      | 63      | 82      | 71      | 86      | 89      |
| 124 | GRK5               | AGC            |                 | 56      | 5       | 55      | 55      | 55      | 75      |
| 125 | GRK6               | AGC            |                 | 103     | 84      | 94      | 94      | 91      | 94      |
| 126 | GRK7               | AGC            |                 | 104     | 78      | 89      | 89      | 89      | 78      |
| 127 | GSK2               | OTHER          |                 | 104     | 112     | 124     | 118     | 88      | 95      |
| 128 | GSK3-alpha         | CMGC           |                 | 94      | 87      | 104     | 95      | 105     | 90      |
| 129 | GSK3-beta          | CMGC           |                 | 99      | 93      | 94      | 91      | 87      | 88      |
| 130 | HCK                | TK             |                 | 50      | 20      | 64      | 31      | 110     | 97      |
| 131 | HIPK1              | CMGC           |                 | 106     | 108     | 104     | 108     | 99      | 101     |
| 132 | HIPK2              | CMGC           |                 | 105     | 102     | 115     | 107     | 102     | 101     |
| 133 | HIPK3              | CMGC           |                 | 89      | 81      | 91      | 90      | 86      | 86      |
| 134 | HIPK4              | CMGC           |                 | 98      | 59      | 102     | 95      | 89      | 82      |
| 135 | HRI                | OTHER          |                 | 98      | 83      | 86      | 88      | 99      | 91      |
| 136 | IGF1-R             | TK             |                 | 11      | 4       | 58      | 47      | 94      | 94      |
| 137 | IKK-alpha          | OTHER          |                 | 90      | 82      | 101     | 63      | 95      | 96      |
| 138 | IKK-beta           | OTHER          |                 | 80      | 73      | 84      | 84      | 96      | 104     |
| 139 | IKK-epsilon        | OTHER          |                 | 105     | 92      | 105     | 97      | 96      | 94      |
| 140 | INS-R              | TK             |                 | 70      | 40      | 88      | 91      | 99      | 93      |
| 141 | INSR-R             | TK             |                 | 95      | 88      | 108     | 106     | 100     | 101     |
| 142 | IRAK1              | TKL            |                 | 89      | 92      | 92      | 89      | 108     | 92      |
| 143 | IRAK4 (un-tagged)  | TKL            |                 | 22      | 95      | 90      | 75      | 112     | 110     |
| 144 | JAK1               | TK             |                 | 60      | 48      | 97      | 93      | 88      | 85      |
| 145 | JAK1 aa582-1154 wt | TK             |                 | 98      | 93      | 100     | 94      | 77      | 79      |
| 146 | JAK2               | TK             |                 | 99      | 91      | 105     | 95      | 106     | 103     |
| 147 | JAK3               | TK             |                 | 66      | 57      | 85      | 87      | 95      | 102     |
| 148 | JNK1               | CMGC           |                 | 102     | 90      | 92      | 87      | 114     | 99      |
| 149 | JNK2               | CMGC           |                 | 96      | 92      | 103     | 110     | 104     | 88      |
| 150 | JNK3               | CMGC           |                 | 96      | 96      | 102     | 105     | 96      | 95      |
| 151 | KIT                | TK             |                 | 89      | 86      | 106     | 93      | 98      | 117     |
| 152 | LCK                | TK             |                 | 44      | 36      | 70      | 44      | 108     | 95      |
| 153 | LIMK1              | TKL            |                 | 68      | 62      | 101     | 91      | 94      | 95      |
| 154 | LIMK2              | TKL            |                 | 96      | 95      | 107     | 102     | 88      | 95      |
| 155 | LRRK2              | TKL            |                 | 100     | 89      | 106     | 96      | 86      | 78      |
| 156 | LTK                | TK             |                 | 9       | 2       | 42      | 51      | 91      | 82      |
| 157 | LYN                | TK             |                 | 44      | 18      | 70      | 72      | 106     | 92      |
| 158 | MAP3K1             | STE            |                 | 91      | 74      | 98      | 85      | 99      | 94      |
| 159 | MAP3K10            | STE            |                 | 73      | 71      | 95      | 87      | 123     | 102     |
| 160 | MAP3K11            | STE            |                 | 93      | 103     | 106     | 128     | 87      | 94      |
| 161 | MAP3K12/MAP3K7TP1  | STE            |                 | 102     | 94      | 115     | 121     | 92      | 95      |
| 162 | MAP4-K             | STE            |                 | 97      | 95      | 93      | 75      | 95      | 91      |
| 163 | MAP4-K2            | STE            |                 | 78      | 82      | 98      | 98      | 91      | 93      |
| 164 | MAP4-K4            | STE            |                 | 78      | 81      | 102     | 89      | 96      | 89      |
| 165 | MAP4-K5            | STE            |                 | 94      | 88      | 95      | 94      | 98      | 101     |
| 166 | MAPKAPK2           | CAMK           |                 | 87      | 67      | 79      | 72      | 101     | 94      |
| 167 | MAPKAPK3           | CAMK           |                 | 43      | 32      | 60      | 60      | 98      | 88      |
| 168 | MAPKAPK5           | CAMK           |                 | 104     | 89      | 103     | 87      | 97      | 101     |
| 169 | MARK1              | CAMK           |                 | 90      | 87      | 104     | 101     | 90      | 99      |
| 170 | MARK2              | CAMK           |                 | 99      | 95      | 101     | 94      | 93      | 102     |
| 171 | MARK3              | CAMK           |                 | 105     | 90      | 92      | 93      | 102     | 92      |
| 172 | MARK4              | CAMK           |                 | 89      | 93      | 99      | 97      | 106     | 92      |
| 173 | MATK               | TK             |                 | 49      | 37      | 67      | 27      | 88      | 90      |
| 174 | MEK1               | STE            |                 | 78      | 68      | 76      | 85      | 98      | 104     |
| 175 | MEK2               | STE            |                 | 102     | 91      | 110     | 99      | 112     | 93      |
| 176 | MEK5               | STE            |                 | 73      | 84      | 94      | 86      | 97      | 104     |
| 177 | MEK6               | STE            |                 | 123     | 74      | 87      | 96      | 94      | 87      |
| 178 | MEK3               | STE            |                 | 88      | 90      | 88      | 102     | 103     | 110     |
| 179 | MLK                | CAMK           |                 | 89      | 84      | 92      | 84      | 93      | 85      |
| 180 | MERTK              | TK             |                 | 45      | 23      | 67      | 91      | 96      | 74      |
| 181 | MEV                | TK             |                 | 109     | 109     | 109     | 107     | 98      | 99      |
| 182 | MINK1              | STE            |                 | 112     | 98      | 105     | 114     | 101     | 95      |
| 183 | MKK4               | STE            |                 | 97      | 97      | 99      | 104     | 97      | 101     |
| 184 | MKK6 S207/T211D**  | STE            |                 | 83      | 91      | 86      | 113     | 83      | 75      |
| 185 | MKK7               | STE            |                 | 95      | 84      | 93      | 67      | 92      | 96      |
| 186 | MKNK1              | CAMK           |                 | 109     | 94      | 92      | 90      | 88      | 90      |
| 187 | MKNK2              | CAMK           |                 | 70      | 65      | 85      | 73      | 94      | 78      |
| 188 | MLK4               | TKL            |                 | 134     | 115     | 106     | 127     | 105     | 114     |
| 189 | MST1               | STE            |                 | 100     | 94      | 99      | 87      | 82      | 82      |
| 190 | MST2               | STE            |                 | 85      | 76      | 84      | 78      | 112     | 103     |
| 191 | MST3               | STE            |                 | 92      | 92      | 92      | 81      | 92      | 82      |
| 192 | MST4               | STE            |                 | 135     | 89      | 121     | 92      | 93      | 90      |
| 193 | mTOR               | ATYPICAL       |                 | 85      | 96      | 85      | 97      | 106     | 86      |
| 194 | MUSK               | TK             |                 | 89      | 79      | 104     | 99      | 102     | 94      |
| 195 | MYLK               | CAMK           |                 | 76      | 70      | 83      | 70      | 85      | 72      |
| 196 | MYLK2              | CAMK           |                 | 99      | 89      | 106     | 97      | 96      | 92      |
| 197 | MYLK3              | CAMK           |                 | 91      | 90      | 87      | 95      | 97      | 101     |
| 198 | NEK1               | OTHER          |                 | 100     | 95      | 106     | 95      | 101     | 94      |
| 199 | NEK11              | OTHER          |                 | 79      | 80      | 83      | 85      | 105     | 111     |
| 200 | NEK2               | OTHER          |                 | 107     | 88      | 106     | 86      | 98      | 95      |
| 201 | NEK3               | OTHER          |                 | 88      | 82      | 94      | 85      | 98      | 105     |
| 202 | NEK4               | OTHER          |                 | 78      | 69      | 92      | 82      | 113     | 98      |
| 203 | NEK6               | OTHER          |                 | 102     | 97      | 104     | 109     | 104     | 107     |
| 204 | NEK7               | OTHER          |                 | 95      | 83      | 72      | 68      | 84      | 75      |
| 205 | NEK9               | OTHER          |                 | 92      | 91      | 106     | 94      | 108     | 110     |
| 206 | NIK                | STE            |                 | 96      | 73      | 94      | 101     | 98      | 85      |
| 207 | NLK                | CMGC           |                 | 99      | 95      | 113     | 116     | 109     | 106     |
| 208 | p38-alpha          | CMGC           |                 | 102     | 82      | 118     | 108     | 96      | 92      |
| 209 | p38-beta           | CMGC           |                 | 91      | 98      | 109     | 110     | 95      | 86      |
| 210 | p38-delta          | CMGC           |                 | 88      | 86      | 97      | 94      | 94      | 88      |
| 211 | p38-gamma          | CMGC           |                 | 93      | 88      | 85      | 83      | 88      | 80      |
| 212 | PAK1               | STE            |                 | 75      | 66      | 91      | 86      | 94      | 96      |
| 213 | PAK2               | STE            |                 | 47      | 20      | 189     | 120     | 100     | 89      |
| 214 | PAK3               | STE            |                 | 53      | 44      | 73      | 69      | 99      | 89      |
| 215 | PAK4               | STE            |                 | 89      | 98      | 100     | 95      | 90      | 91      |
| 216 | PAK6               | STE            |                 | 86      | 72      | 97      | 89      | 86      | 81      |
| 217 | PAK7               | STE            |                 | 84      | 62      | 102     | 68      | 101     | 84      |
| 218 | PASK               | CAMK           |                 | 97      | 96      | 101     | 111     | 112     | 105     |
| 219 | PBK                | OTHER          |                 | 112     | 96      | 106     | 120     | 102     | 92      |
| 220 | PDGFR-alpha        | TK             |                 | 98      | 56      | 100     | 100     | 109     | 106     |

| #   | Kinase Name                   | Kinase Family* | Cpd ID          | MIS-175 | MIS-175 | MIS-188 | MIS-188 | MIS-198 | MIS-198 |
|-----|-------------------------------|----------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|     |                               |                | Assay Conc. (M) | 1.0E-06 | 1.0E-05 | 1.0E-06 | 1.0E-05 | 1.0E-06 | 1.0E-05 |
| 221 | PDGFR-beta                    | TK             |                 | 88      | 84      | 94      | 99      | 101     | 101     |
| 222 | PDK1                          | AGC            |                 | 59      | 13      | 58      | 63      | 104     | 76      |
| 223 | PIKG1                         | CAMK           |                 | 82      | 71      | 91      | 102     | 109     | 98      |
| 224 | PIKG2                         | CAMK           |                 | 98      | 92      | 97      | 83      | 85      | 92      |
| 225 | PIM1                          | CAMK           |                 | 83      | 75      | 94      | 81      | 101     | 74      |
| 226 | PIM2                          | CAMK           |                 | 91      | 79      | 70      | 64      | 68      | 64      |
| 227 | PIM3                          | CAMK           |                 | 141     | 105     | 104     | 112     | 94      | 90      |
| 228 | PKA                           | AGC            |                 | 23      | 13      | 31      | 42      | 101     | 93      |
| 229 | PKC-alpha                     | AGC            |                 | 89      | 99      | 100     | 105     | 93      | 96      |
| 230 | PKC-beta1                     | AGC            |                 | 96      | 78      | 106     | 110     | 103     | 88      |
| 231 | PKC-beta2                     | AGC            |                 | 103     | 81      | 111     | 96      | 101     | 107     |
| 232 | PKC-delta                     | AGC            |                 | 97      | 89      | 91      | 100     | 104     | 101     |
| 233 | PKC-epsilon                   | AGC            |                 | 132     | 166     | 117     | 117     | 118     | 121     |
| 234 | PKC-gamma                     | AGC            |                 | 117     | 90      | 103     | 104     | 103     | 121     |
| 235 | PKC-eta                       | AGC            |                 | 100     | 52      | 52      | 100     | 119     | 117     |
| 236 | PKC-zeta                      | AGC            |                 | 85      | 82      | 99      | 99      | 101     | 96      |
| 237 | PKC-mu                        | AGC            |                 | 107     | 96      | 95      | 98      | 105     | 101     |
| 238 | PKC-nu                        | AGC            |                 | 104     | 90      | 104     | 94      | 101     | 93      |
| 239 | PKC-theta                     | AGC            |                 | 119     | 59      | 100     | 112     | 109     | 96      |
| 240 | PKG-zeta                      | AGC            |                 | 102     | 110     | 113     | 91      | 111     | 111     |
| 241 | PKMY1                         | OTHER          |                 | 98      | 92      | 96      | 89      | 93      | 90      |
| 242 | PLK1                          | OTHER          |                 | 101     | 104     | 104     | 101     | 93      | 95      |
| 243 | PLK3                          | OTHER          |                 | 96      | 84      | 84      | 95      | 95      | 86      |
| 244 | PRK1                          | AGC            |                 | 90      | 74      | 108     | 87      | 102     | 91      |
| 245 | PRK2                          | AGC            |                 | 92      | 93      | 105     | 99      | 101     | 92      |
| 246 | PRK202                        | CAMK           |                 | 124     | 107     | 93      | 100     | 91      | 101     |
| 247 | PRKG1                         | AGC            |                 | 27      | 12      | 48      | 56      | 99      | 96      |
| 248 | PRKG2                         | AGC            |                 | 107     | 89      | 100     | 94      | 100     | 104     |
| 249 | PRKX                          | AGC            |                 | 86      | 73      | 86      | 74      | 92      | 73      |
| 250 | PYK2                          | TK             |                 | 75      | 30      | 99      | 86      | 100     | 94      |
| 251 | RAF1 Y340D/Y341D (untagged)** | TKL            |                 | 118     | 116     | 102     | 111     | 114     | 109     |
| 252 | RET                           | TK             |                 | 13      | 14      | 70      | 26      | 107     | 79      |
| 253 | RIPK2                         | TKL            |                 | 104     | 98      | 98      | 97      | 101     | 107     |
| 254 | RIPK5                         | TKL            |                 | 98      | 87      | 111     | 101     | 95      | 94      |
| 255 | ROCK1                         | AGC            |                 | 113     | 100     | 118     | 114     | 98      | 98      |
| 256 | ROCK2                         | AGC            |                 | 106     | 99      | 106     | 101     | 89      | 92      |
| 257 | RON                           | TK             |                 | 26      | 4       | 98      | 71      | 90      | 85      |
| 258 | ROS                           | TK             |                 | 86      | 77      | 103     | 87      | 105     | 103     |
| 259 | RPS6KA1                       | AGC            |                 | 116     | 94      | 113     | 98      | 99      | 101     |
| 260 | RPS6KA2                       | AGC            |                 | 78      | 73      | 87      | 81      | 93      | 89      |
| 261 | RPS6KA3                       | AGC            |                 | 94      | 24      | 97      | 74      | 98      | 84      |
| 262 | RPS6KA4                       | AGC            |                 | 99      | 60      | 124     | 109     | 109     | 86      |
| 263 | RPS6KA5                       | AGC            |                 | 102     | 77      | 102     | 99      | 97      | 96      |
| 264 | RPS6KA6                       | AGC            |                 | 112     | 56      | 102     | 95      | 95      | 95      |
| 265 | SGK1                          | AGC            |                 | 68      | 81      | 92      | 96      | 82      | 93      |
| 266 | SGK1-beta                     | AGC            |                 | 106     | 86      | 102     | 103     | 88      | 88      |
| 267 | SAK                           | OTHER          |                 | 88      | 71      | 106     | 80      | 100     | 93      |
| 268 | SGK1                          | AGC            |                 | 101     | 94      | 105     | 91      | 100     | 97      |
| 269 | SGK2                          | AGC            |                 | 105     | 85      | 90      | 93      | 79      | 79      |
| 270 | SGK3                          | AGC            |                 | 88      | 87      | 98      | 95      | 92      | 100     |
| 271 | SIK1                          | CAMK           |                 | 99      | 91      | 102     | 100     | 93      | 101     |
| 272 | SIK2                          | CAMK           |                 | 95      | 96      | 96      | 91      | 90      | 89      |
| 273 | SIK3                          | CAMK           |                 | 102     | 59      | 114     | 109     | 90      | 102     |
| 274 | SLK                           | STE            |                 | 67      | 58      | 59      | 96      | 113     | 94      |
| 275 | SNARK                         | CAMK           |                 | 60      | 79      | 96      | 90      | 97      | 91      |
| 276 | SNK                           | OTHER          |                 | 113     | 89      | 100     | 91      | 96      | 98      |
| 277 | SRC (GST-HIS-tag)             | TK             |                 | 29      | 15      | 48      | 63      | 93      | 89      |
| 278 | SRMS                          | TK             |                 | 68      | 53      | 90      | 84      | 102     | 88      |
| 279 | SRPK1                         | CMGC           |                 | 64      | 50      | 66      | 65      | 95      | 90      |
| 280 | SRPK2                         | CMGC           |                 | 69      | 66      | 104     | 82      | 110     | 91      |
| 281 | STK17A                        | CAMK           |                 | 87      | 88      | 95      | 93      | 103     | 108     |
| 282 | STK23                         | CAMK           |                 | 117     | 97      | 110     | 102     | 101     | 96      |
| 283 | STK25                         | STE            |                 | 93      | 86      | 89      | 86      | 96      | 95      |
| 284 | STK33                         | CAMK           |                 | 101     | 78      | 95      | 86      | 88      | 89      |
| 285 | STK39                         | STE            |                 | 109     | 102     | 97      | 103     | 116     | 106     |
| 286 | SYK aa1-435                   | TK             |                 | 51      | 5       | 85      | 77      | 114     | 98      |
| 287 | TAOK2                         | STE            |                 | 98      | 91      | 89      | 98      | 90      | 85      |
| 288 | TAOK3                         | STE            |                 | 81      | 90      | 96      | 89      | 98      | 103     |
| 289 | TBK1                          | OTHER          |                 | 100     | 93      | 90      | 99      | 99      | 105     |
| 290 | TEC                           | TK             |                 | 75      | 6       | 97      | 106     | 97      | 96      |
| 291 | TGFBR1                        | TKL            |                 | 110     | 91      | 98      | 111     | 88      | 87      |
| 292 | TGFBR2                        | TKL            |                 | 89      | 62      | 107     | 64      | 98      | 95      |
| 293 | TR-E2                         | TK             |                 | 34      | 11      | 43      | 65      | 79      | 75      |
| 294 | TLK1                          | AGC            |                 | 63      | 83      | 88      | 84      | 88      | 95      |
| 295 | TLK2                          | AGC            |                 | 73      | 34      | 73      | 64      | 87      | 88      |
| 296 | TNK1                          | TK             |                 | 92      | 53      | 110     | 92      | 95      | 95      |
| 297 | TRK-A                         | TK             |                 | 76      | 47      | 76      | 84      | 56      | 61      |
| 298 | TRK-B                         | TK             |                 | 18      | 18      | 61      | 75      | 67      | 62      |
| 299 | TRK-C                         | TK             |                 | 53      | 37      | 73      | 52      | 70      | 59      |
| 300 | TSF1                          | OTHER          |                 | 102     | 89      | 92      | 103     | 104     | 103     |
| 301 | TSK2                          | CAMK           |                 | 97      | 72      | 111     | 112     | 97      | 86      |
| 302 | TSK3                          | CAMK           |                 | 102     | 90      | 86      | 86      | 101     | 95      |
| 303 | TTBK1                         | CK1            |                 | 106     | 94      | 97      | 92      | 118     | 114     |
| 304 | TTBK2                         | CK1            |                 | 87      | 90      | 90      | 94      | 100     | 94      |
| 305 | TTK                           | OTHER          |                 | 108     | 99      | 96      | 96      | 96      | 99      |
| 306 | TXK                           | TK             |                 | 106     | 83      | 84      | 91      | 106     | 95      |
| 307 | TYK2                          | TK             |                 | 90      | 82      | 97      | 90      | 93      | 96      |
| 308 | TYR03                         | TK             |                 | 23      | 14      | 63      | 75      | 107     | 99      |
| 309 | VEGF-R1                       | TK             |                 | 87      | 58      | 82      | 79      | 99      | 121     |
| 310 | VEGF-R2                       | TK             |                 | 63      | 6       | 69      | 65      | 104     | 99      |
| 311 | VEGF-R3                       | TK             |                 | 52      | 55      | 74      | 66      | 112     | 91      |
| 312 | VPR-1                         | CK1            |                 | 91      | 56      | 100     | 106     | 100     | 85      |
| 313 | VRK2                          | CK1            |                 | 101     | 90      | 89      | 91      | 94      | 101     |
| 314 | WEB1                          | OTHER          |                 | 67      | 46      | 87      | 77      | 88      | 82      |
| 315 | WNK1                          | OTHER          |                 | 106     | 108     | 103     | 105     | 101     | 95      |
| 316 | WNK2                          | OTHER          |                 | 90      | 67      | 106     | 90      | 98      | 94      |
| 317 | WNK3                          | OTHER          |                 | 88      | 83      | 84      | 82      | 108     | 89      |
| 318 | YES                           | TK             |                 | 68      | 27      | 77      | 75      | 105     | 91      |
| 319 | ZAK                           | TKL            |                 | 96      | 82      | 96      | 83      | 90      | 84      |
| 320 | ZAP70                         | TK             |                 | 31      | 10      | 62      | 75      | 96      | 96      |

Selectivity Score (&lt; 50 % residual activity): 0.113 0.168 0.031 0.034 0.000 0.000

\*Classification of protein kinase families (Manning et al. Science 6 December 2002; Vol. 298 no. 5600 pp. 1912-1934):

AGC: containing PKA, PKG and PKC families

CAMK: Calcium/CaM-modulin-dependent protein kinases

CK1: Casein kinase 1-like

CMGC: containing CDK, MAPK, GSK3 and CLK families

TK: Tyrosine Kinase

TKL: Tyrosine Kinase-like

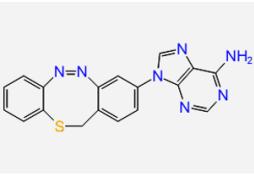
STE: Homologs of Yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 Kinases

\*\* Constitutively active kinase

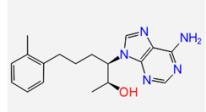
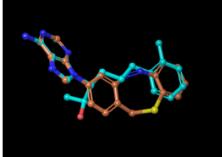
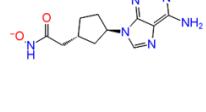
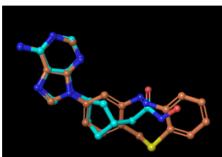
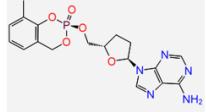
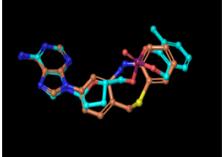
## 9.2 Virtuelles Screening

Ergebnisse des Diazocin-funktionalisierten Adenins **3** (hier bezeichnet als Mis-Adenin) im virtuellen screening durchgeführt von der Arbeitsgruppe Kirchmair (Universität Hamburg). Eine *alignment-based* target-Vorhersage wurde sowohl für das *E*-Isomer (*chair*) als auch für das *Z*-Isomer (*cis*) durchgeführt.

**Overview of investigated structure.**

| Query | Name             | Structure   |
|-------|------------------|---|
| 1     | Mis-Adenin_chair |  |

**Results of the alignment-based target prediction**

| Query | 2D structure of hit   | 3D alignment (query in orange)  | Target                  | Likelihood of activity | Closest hit in ChEMBL for this target | SMILES  |
|-------|---|---|-------------------------|------------------------|---------------------------------------|---|
| 1     |   |   | Adenosine deaminase     | Likely                 | CHEMBL42063                           | C[C@H](O)[C@H](CCCc1ccc(cc1C)n2cnc3c(N)ncnc3)   |
| 1     |  |  | Adenylyl cyclase type V | Not likely             | CHEMBL69184                           | Nc1ncnc2c1ncn2[C@@H]3CC[C@H](CC(=O)N)C3         |
| 1     |  |  | Butyrylcholinesterase   | Likely                 | CHEMBL40302                           | Cc1cccc2COP(=O)(OCC3CCC(O3)n4cnc5c(N)ncnc5)Oc12 |

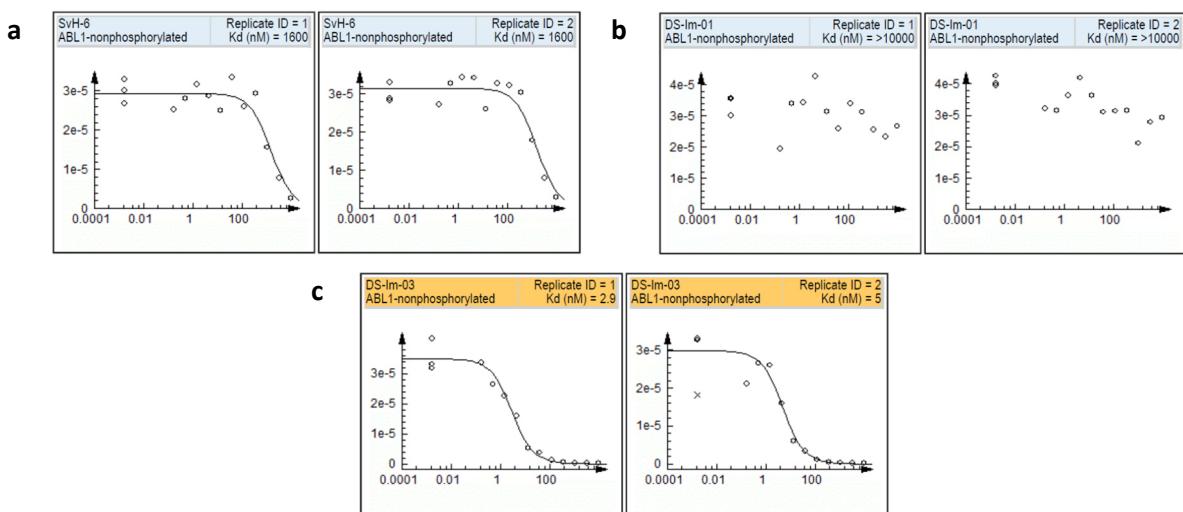
**Overview of investigated structure.**

| Query | Name           | Structure |
|-------|----------------|-----------|
| 2     | Mis-Adenin_cis |           |

**Results of the alignment-based target prediction**

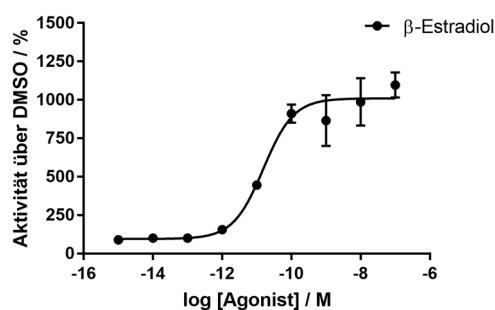
| Query | 2D structure of hit | 3D alignment (query in orange) | Target                                  | Likelihood of activity | Closest hit in ChEMBL for this target | SMILES   |
|-------|---------------------|--------------------------------|---|------------------------|---------------------------------------|--|
| 2     |                     |                                | Xanthine dehydrogenase                  | Likely                 | CHEMBL3247913                         | Nc1nc(O)c2ncn(c3cccc(c3)C(F)(F)F)c2n1            |
| 2     |                     |                                | GABA-A receptor; alpha-3/beta-3/gamma-2 | Likely                 | CHEMBL203186                          | CN1C=Nn2cnc(2C1=O)c3ccc(F)c(c3)c4ccc(F)cc4C#N    |
| 2     |                     |                                | GABA-A receptor; alpha-5/beta-3/gamma-2 | Likely                 | CHEMBL203186                          |  |
| 2     |                     |                                | GABA-A receptor; alpha-1/beta-3/gamma-2 | Likely                 | CHEMBL203186                          |  |
| 2     |                     |                                | Butyrylcholinesterase                   | Likely                 | CHEMBL329491                          | Cc1cccc2COP(=O)(OCC3OC(C=C3)n4cnc5c(N)nc5c4)Oc12 |
| 2     |                     |                                | Adenylate cyclase type V                | Likely                 | CHEMBL69184                           | Nc1ncnc2c1ncn2[C@@H]3CC[C@H](CC(=O)NO)C3         |

### 9.3 ABL-Kinaseassays (DiscoverX)

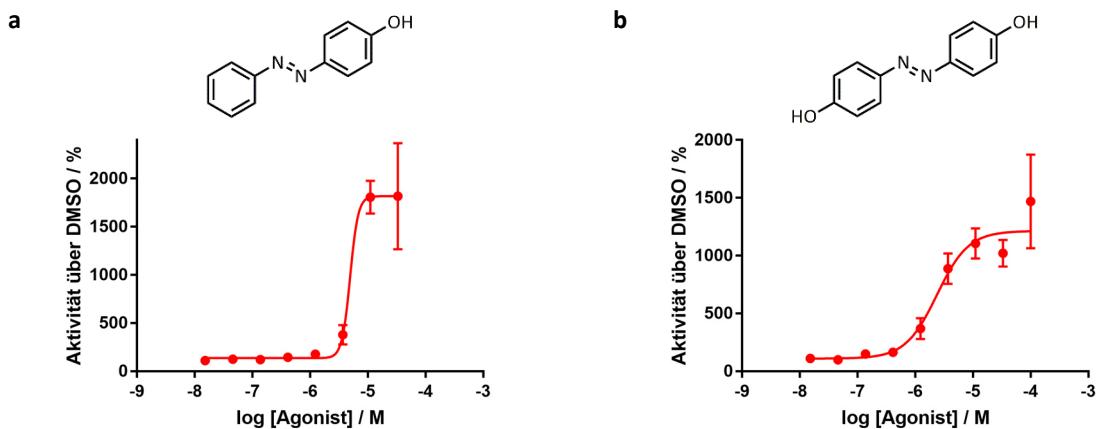


**Abbildung 9.1.** Original Dosis-Wirkungskurven der Azoderivate von Imatinib und Nilotinib in einem affinitätsbasierten ABL-1 Kinaseassay, gemessen von DiscoverX (Eurofins, San Diego, USA). Es wurden jeweils zwei Replikate unter gewöhnlichem Umgebungslicht vermessen. Auf der y-Achse ist jeweils das Signal der qPCR, mit der die Menge an Kinase ermittelt wurde, aufgetragen; auf der x-Achse die Konzentration der jeweiligen Testsubstanz in nM. (a) Für Azomatinib (**6**, internes Laborkürzel: SvH-6) wurde ein  $K_d$ -Wert von 1600 nM bestimmt. (b) Für Azonilotinib (**7**, internes Laborkürzel: DS-Im-01) konnte kein  $K_d$ -Wert bestimmt werden ( $> 10000$  nM). (c) Für das Diazocin-funktionalisierte Imatinib-Derivat (**9**, internes Laborkürzel: DS-Im-03) wurde ein  $K_d$ -Wert von 3.9 nM bestimmt.

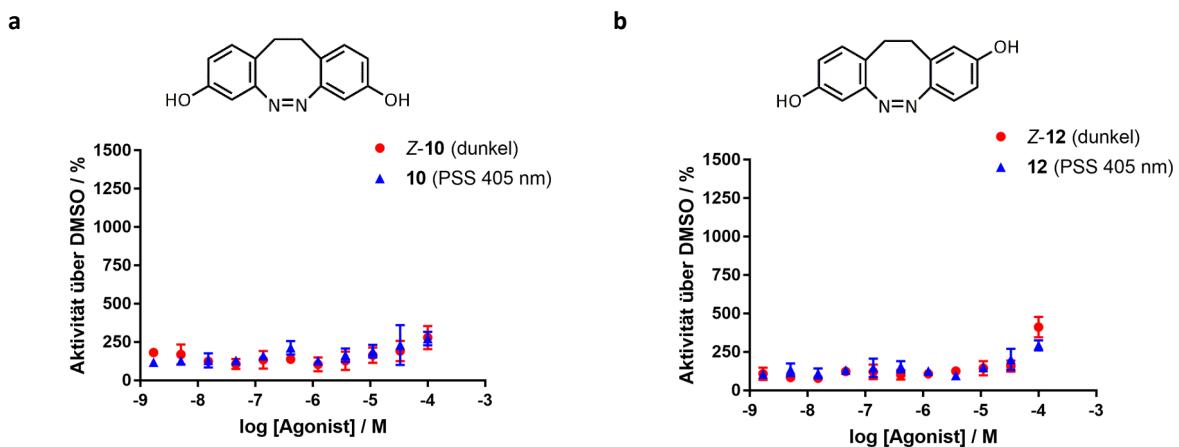
### 9.4 Reporterogen Assays



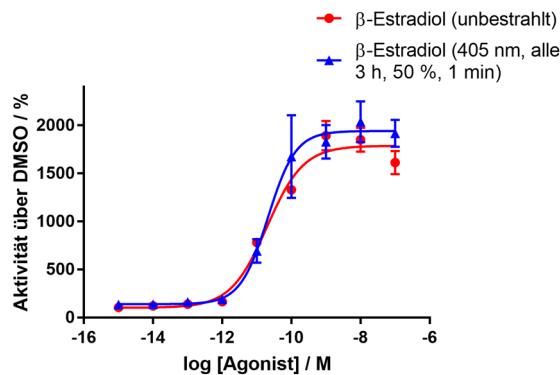
**Abbildung 9.2.** Exemplarische Dosis-Wirkungskurve der Referenz  $\beta$ -Estradiol in einem zellbasierten Reporterogen Assay.  $EC_{50} = 15.6$  pM. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.



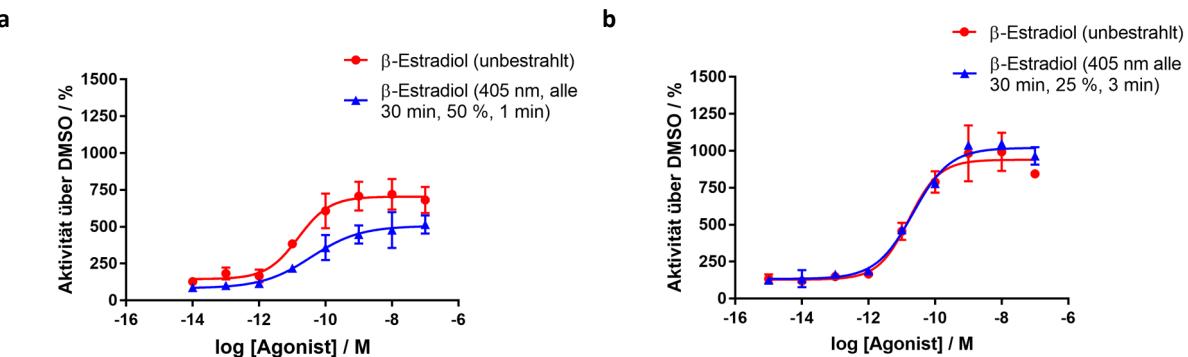
**Abbildung 9.3.** Estogene Aktivitäten mono- und disubstituierter *para*-Hydroxyazobenzole in einem zellbasierten Reporteren Assay. (a) Monosubstituiertes Hydroxyazobenzol (internes Laborkürzel: JEW-54), unbestrahlten (*E*-Isomer, dunkel, rote Kreise, EC<sub>50</sub> = 5.4 ± 0.7 µM, max. relative Aktivität: 123.4 ± 46.4 %). (b) Disubstituiertes Hydroxyazobenzol (internes Laborkürzel: JEW-56), unbestrahlten (*E*-Isomer, dunkel, rote Kreise, EC<sub>50</sub> = 1.8 ± 0.8 µM, max. relative Aktivität: 87.9 ± 4.3 %). Die höchsten Konzentrationen (100 µM und 33 µM) waren zum Teil stark toxisch für die Zellen, deshalb die Auswertung nur eingeschränkt möglich war. Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für zwei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten ± Standardabweichung dar. EC<sub>50</sub>-Werte sind Mittelwerte der biologischen Replikate ± SD.



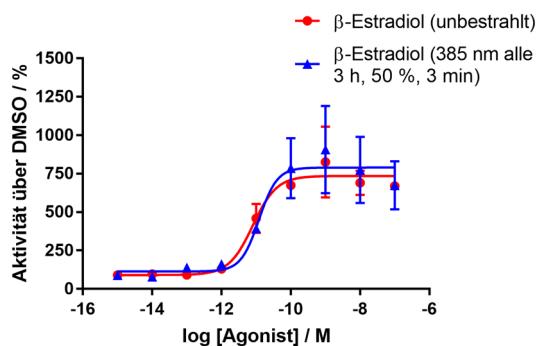
**Abbildung 9.4.** Estogene Aktivitäten der Hydroxydiazocine **10** und **12** in einem zellbasierten Reporteren Assay nach einmaliger Bestrahlung der Testsubstanzen vor Zugabe zum Zellassay. (a) Diazocin **10**, unbestrahlten (Z-**10**, dunkel, rote Kreise) vs. einmalig bestrahlt mit 405 nm (PSS 405 nm, blaue Dreiecke). (b) Diazocin **12**, unbestrahlten (Z-**12**, dunkel, rote Kreise) vs. einmalig bestrahlt mit 405 nm (PSS 405 nm, blaue Dreiecke). Repräsentativ für alle Hydroxy- und Benzylalkohol-Diazocine **10-17** konnte nach nur einmaliger Bestrahlung kein Anstieg der estrogeneren Aktivität detektiert werden. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten ± Standardabweichung dar.



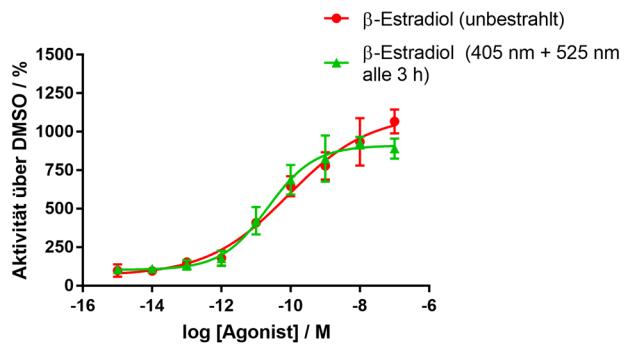
**Abbildung 9.5.** Bestrahlungstoleranz des zellbasierten Reportergen Assay. Estrogene Aktivität der Referenz  $\beta$ -Estradiol mit und ohne Bestrahlung.  $\beta$ -Estradiol, unbestrahlt (rote Kreise,  $EC_{50} = 19.8 \text{ pM}$ ) vs. bestrahlt mit 405 nm alle 3 h mit 50 % Leistung für 1 min (blaue Dreiecke,  $EC_{50} = 21.0 \text{ pM}$ ). Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für mindestens zwei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.



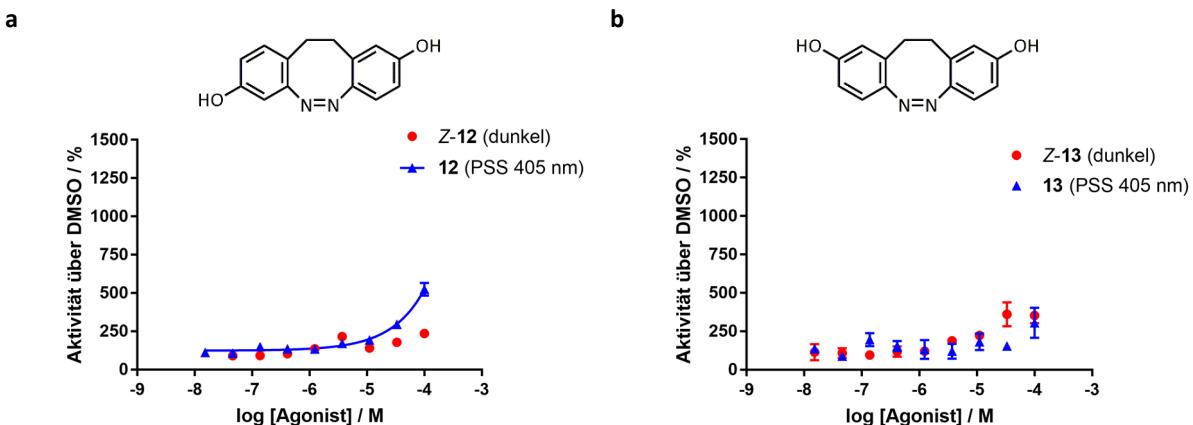
**Abbildung 9.6.** Bestrahlungstoleranz des zellbasierten Reportergen Assay. Estrogene Aktivität der Referenz  $\beta$ -Estradiol jeweils mit und ohne Bestrahlung. (a)  $\beta$ -Estradiol, unbestrahlt (rote Kreise,  $EC_{50} = 15.1 \text{ pM}$ ) vs. bestrahlt mit 405 nm alle 30 min mit 50 % Leistung für 1 min (blaue Dreiecke,  $EC_{50} = 37.2 \text{ pM}$ ). (b)  $\beta$ -Estradiol, unbestrahlt (rote Kreise,  $EC_{50} = 16.3 \text{ pM}$ ) vs. bestrahlt mit 405 nm alle 30 min mit 25 % Leistung für 3 min (blaue Dreiecke,  $EC_{50} = 28.5 \text{ pM}$ ). Bestrahlung mit 405 nm alle 30 min, wurde von dem Zellassay nur toleriert, wenn mit einer Intensität von 25 % für jeweils 3 min bestrahlt wurden (b), nicht jedoch wenn 50 % für jeweils 1 min verwendet wurden (siehe deutliche flachere blaue Kurve in a). Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.



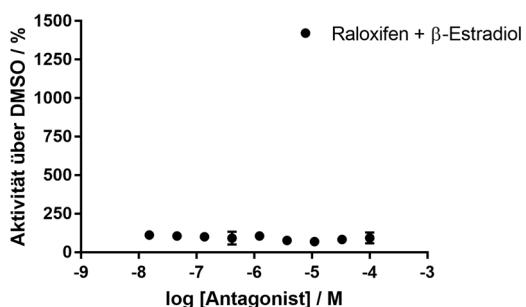
**Abbildung 9.7.** Bestrahlungstoleranz des zellbasierten Reportergen Assay. Estrogene Aktivität der Referenz  $\beta$ -Estradiol mit und ohne Bestrahlung.  $\beta$ -Estradiol, unbestrahlt (rote Kreise,  $EC_{50} = 8.06 \text{ pM}$ ) vs. bestrahlt mit 385 nm alle 3 h mit 50 % Leistung für 3 min (blaue Dreiecke,  $EC_{50} = 12.1 \text{ pM}$ ). Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für mindestens zwei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.



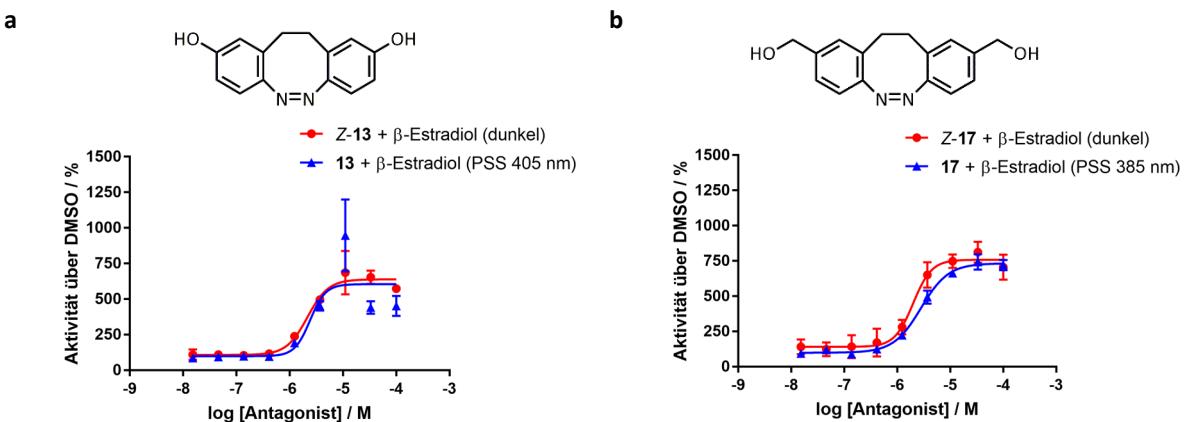
**Abbildung 9.8.** Bestrahlungstoleranz des zellbasierten Reportergen Assay. Estrogene Aktivität der Referenz  $\beta$ -Estradiol mit und ohne Bestrahlung.  $\beta$ -Estradiol, unbestrahlten (rote Kreise,  $EC_{50} = 85.9 \text{ pM}$ ) vs. bestrahlten mit 405 nm und 525 nm alle 3 h (grüne Dreiecke,  $EC_{50} = 21.9 \text{ pM}$ ). Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.



**Abbildung 9.9.** Estrogene Aktivitäten der Diazocine **12** und **13** in einem zellbasierten Reportergen Assay nach Bestrahlung alle 30 min. (a) Asymmetrisches Diazocin **12**, unbestrahlten (**Z-12**, dunkel, rote Kreise, max. relative Aktivität: 23.3 %) vs. bestrahlten mit 405 nm alle 30 min (PSS 405 nm, blaue Dreiecke,  $EC_{50}$  ist nicht zuverlässig bestimmbar, max. relative Aktivität: 51.7 %). (b) *para*-disubstituiertes Diazocin **13**, unbestrahlten (**Z-13**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlten mit 405 nm alle 30 min (PSS 405 nm, blaue Dreiecke). Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.

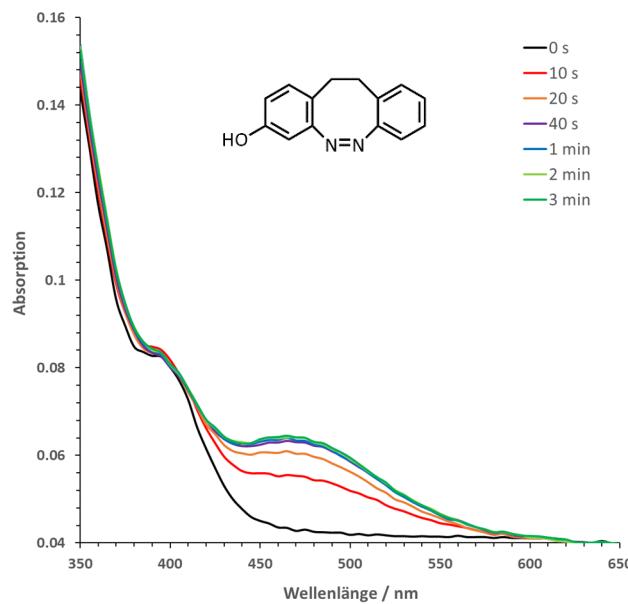


**Abbildung 9.10.** Antiestrogene Aktivität des Referenzantagonisten Raloxifen in einem zellbasierten Reportergen Assay. Raloxifen wurde zusammen mit dem Referenzagonisten  $\beta$ -Estradiol eingesetzt. Die estrogene Wirkung des  $\beta$ -Estradiols wird von Raloxifen komplett ausgelöscht. Die Dosis-Wirkungskurven sind jeweils ein repräsentatives Beispiel für mindestens zwei unabhängige Zellassays. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.

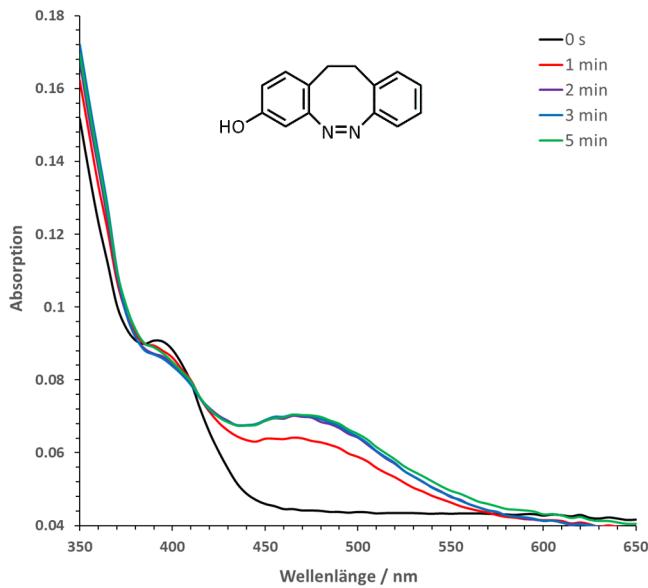


**Abbildung 9.11.** Antiestrogene Aktivitäten der *para*-substituierten Diazocine **13** und **17** zusammen mit  $\beta$ -Estradiol in einem zellbasierten Reportergen Assay. (a) Diazocin **13** mit  $\beta$ -Estradiol, unbestrahlt (**Z-13**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 405 nm alle 3 h (PSS 405 nm, blaue Dreiecke). (b) Diazocin **17** mit  $\beta$ -Estradiol, unbestrahlt (**Z-17**, dunkel, rote Kreise) vs. bestrahlt mit 385 nm alle 3 h (PSS 385 nm, blaue Dreiecke). Beide Diazocine sind nicht in der Lage die estrogene Wirkung des  $\beta$ -Estradiol abzuschwächen. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung dar.

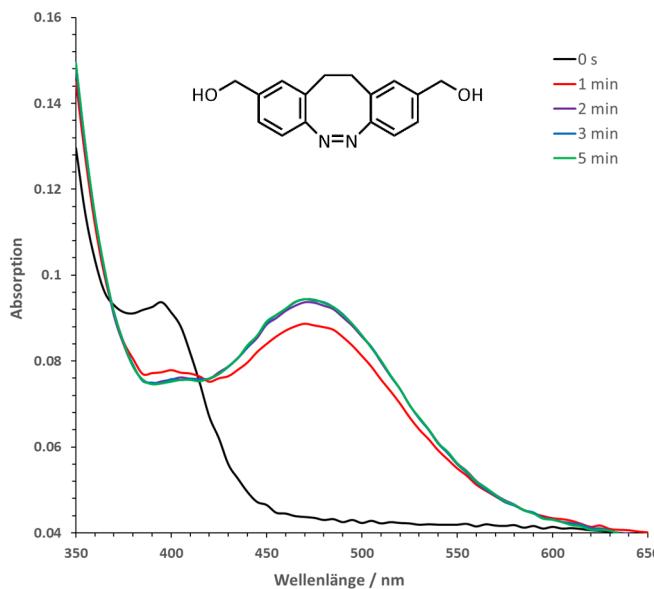
## 9.5 UV-Spektren zur Charakterisierung der Zellinkubatorlampen



**Abbildung 9.12.** UV/VIS-Spektren des Hydroxydiazocins **11** (200  $\mu$ M in ddH<sub>2</sub>O mit 2 % DMSO) nach Bestrahlung mit der 405 nm-Zellinkubatorlampe unter Zellasssay-ähnlichen Bedingungen. Mit einer Intensität von 50 % wurden nach 0 s, 10 s, 20 s, 40 s, 1 min, 2 min und 3 min Bestrahlung UV/VIS-Spektren aufgenommen. Eine Bestrahlungsdauer von 1 min im gegebenen Aufbau mit 50 % Leistung wurde als ausreichend für die Schaltung des Diazocins ins PSS ermittelt.



**Abbildung 9.13.** UV/VIS-Spektren des Hydroxydiazocins **11** (200 µM in ddH<sub>2</sub>O mit 2 % DMSO) nach Bestrahlung mit der 405 nm-Zellinkubatorlampe unter Zellasssay-ähnlichen Bedingungen. Mit einer Intensität von 25 % wurden nach 0 s, 1 min, 2 min, 3 min und 5 min Bestrahlung UV/VIS-Spektren aufgenommen. Eine Bestrahlungsdauer von 3 min im gegebenen Aufbau mit 25 % Leistung wurde als ausreichend für die Schaltung des Diazocins ins PSS ermittelt.



**Abbildung 9.14.** UV/VIS-Spektren des Benzylalkoholdiazocins **17** (200 µM in ddH<sub>2</sub>O mit 2 % DMSO) nach Bestrahlung mit der 385 nm-Zellinkubatorlampe unter Zellasssay-ähnlichen Bedingungen. Mit einer Intensität von 50 % wurden nach 0 s, 1 min, 2 min, 3 min und 5 min Bestrahlung UV/VIS-Spektren aufgenommen. Eine Bestrahlungsdauer von 3 min im gegebenen Aufbau mit 50 % Leistung wurde als ausreichend für die Schaltung des Diazocins ins PSS ermittelt.



## 10 Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Peifer im Fachbereich Pharmazeutische und Medizinische Chemie des Pharmazeutischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Zeitraum von September 2017 bis Februar 2022 angefertigt.

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

Kiel, Februar 2022

---

(Linda Heintze)

Teile dieser Arbeit wurden zum Zeitpunkt der Fertigstellung bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung vorbereitet:

Heintze, L.; Schmidt, D.; Rodat, T.; Witt, L.; Ewert, J.; Kriegs, M.; Herges, R.; Peifer, C. Photoswitchable Azo- and Diazocine-Functionalized Derivatives of the VEGFR-2 Inhibitor Axitinib. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8961, doi:10.3390/ijms21238961.

Ewert, J.; Heintze, L.; Jordà-Redondo, M.; von Glasenapp, J.-S.; Nonell, S.; Bucher, G.; Peifer, C.; Herges, R. Photoswitchable Diazocine-based Estrogen Receptor Agonists – Stabilization of the Active Form Inside the Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, submitted.

Folgende Publikationen sind ebenfalls während meiner Promotionszeit entstanden, sind aber inhaltlich vorrangig kein Teil dieser Arbeit:

Schehr, M.; Ianes, C.; Weisner, J.; Heintze, L.; Müller, M.P.; Pichlo, C.; Charl, J.; Brunstein, E.; Ewert, J.; Lehr, M.; Baumann, U.; Rauh, D.; Knippschild, U.; Peifer, C.; Herges, R. 2-Azo-, 2-diazocine-thiazols and 2-azo-imidazoles as photoswitchable kinase inhibitors: Limitations and pitfalls of the photoswitchable inhibitor approach. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1398–1407, doi:10.1039/c9pp00010k.

Schmidt, D.; Rodat, T.; Heintze, L.; Weber, J.; Horbert, R.; Girreser, U.; Raeker, T.; Bußmann, L.; Kriegs, M.; Hartke, B.; Peifer, C. Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2415–2426, doi:10.1002/cmdc.201800531.

Letztgenannte Publikation beinhaltet die Ergebnisse meiner Masterarbeit.



## 11 Danksagung

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Peifer für die hervorragende Unterstützung und die Möglichkeit an vielen spannenden Projekten mitzuarbeiten danken. Seine stets freundliche und entgegenkommende Art waren mir immer eine große Motivation.

Prof. Dr. Rainer Herges möchte ich vielmals für die gute Zusammenarbeit in unseren Kooperationsprojekten, die vielen gemeinsamen Diskussionen und den stetigen Austausch danken.

Julia Ewert danke ich ganz herzlich für die intensive und erfolgreiche Zusammenarbeit an unseren gemeinsamen Projekten. Unsere langen Besprechungen waren immer sehr aufschlussreich und erfrischend.

Ebenso danke ich Dr. Dorian Schmidt für die hervorragende Zusammenarbeit in mehreren Projekten. Schon während meiner Masterarbeit konnte er mich für den Bereich der Photopharmakologie begeistern. Herzlichen Dank für die unzähligen Diskussionen und hilfreichen Ratschläge!

Im Zusammenhang der Kooperationsprojekte möchte ich zudem Dr. Miriam Schehr und Sven Herschel für die gute Zusammenarbeit danken.

Für den fachlichen Austausch im Bereich der biologischen Testung sowie die enge Zusammenarbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Theo Rodat, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und viele Denkanstöße lieferte.

Dem Arbeitskreis Schade, insbesondere Till Priegann danke ich vielmals für die Unterstützung beim Aufbau meines Reportergen Assays.

Dr. Claus Bier möchte ich für die Spezialanfertigung der Zellinkubatorlampen sowie deren zügiger Reparatur danken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich herzlichst Julia Ewert, Dr. Britta Hesseler, Dr. Sophia Rixen und Stefan Kirschner.

Dem gesamten Arbeitskreis Peifer möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die immer gute Laune sowie den stets freundschaftlichen Umgang miteinander danken. Mit vielen aktuellen und ehemaligen AK-Mitgliedern blicke ich auch auf eine gemeinsame Oslo-Reise, eine Summerschool in Athen und die Photopharmakologie-Konferenz in Barcelona zurück. Ein herzliches Dankeschön für eine unvergessliche Zeit mit zahlreichen gemeinsamen Kuchenessen und Mittagstischen bei POI geht an Melanie Busse, Julia Ewert, Björn Jansen, Stefan Kirschner, Joana Baier, Martin Schütt, Dr. Britta Hesseler, Dr. Theo Rodat, Dr. Lydia Witt, Dr. Dorian Schmidt, Dr. Boris Pinchuk, Dr. Alexander Döbber und Dr. Miriam Schehr.

Für die immer freundliche und spaßige Büroatmophäre danke ich zum einen Melanie Busse und Martin Schütt und zum anderen Stefan Kirschner.

Dr. Sophia Rixen, Dr. Theo Rodat und Sven Jirschitzka möchte ich für die gute Stimmung in der Zellkultur sowie ihre Akzeptanz, dass ich das Labor für meine Arbeiten häufig verdunkeln musste, danken.

## Danksagung

---

Für die gemeinsame Betreuung des 3. Semesters bedanke ich mich bei Dr. Theo Rodat, Melanie Busse, Dr. Alexander Döbber, Dr. Britta Hesseler, Anna-Maria Struzek und Joana Baier. Mir werden viele lustige Erinnerungen aus Praktikumsbetreuung und Klausurkorrekturen bleiben.

Dem Arbeitskreis Tholey danke ich für ihr großes Engagement und die vielen Bemühungen den Estrogenrezeptor im Massenspektrometer zu vermessen.

Beim Arbeitskreis Rauh an der TU Dortmund bedanke ich mich dafür, dass ich sie eine Woche mit Lampen-Equipment im Gepäck besuchen durfte.

An Stefan Kirschner, Dr. Britta Hesseler und Karsten Steffens geht ein großes Dankeschön für unzählige Kaffeepausen sowie „Betriebsausflüge“ am Wochenende zum Markt oder zu Moby an die Förde.

Auch der ehemaligen Mensagruppe aus Dr. Patrick Indorf, Dr. Carsten Ginsel, Dr. Lydia Witt, Dr. Stefan Lohmann und Melanie Busse sei an dieser Stelle für die gute Gesellschaft und die interessanten Gespräche gedankt.

Es ist gar nicht möglich all die lieben Kollegen, die mich während meiner Zeit am Pharmazeutischen Institut begleitet haben namentlich zu nennen, dennoch möchte ich mich bei allen für die großartige Atmosphäre und die vielen tollen Erinnerungen, auch an die ein oder andere Feierlichkeit, bedanken. Ich kann mir keine besseren Kollegen vorstellen!

Darüber hinaus möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden außerhalb der Pharmazie für ihre dauerhafte Unterstützung bedanken. Vielen Dank, dass auf euch in jeder Lebenslage immer Verlass ist!