
Strukturbiologische Untersuchungen von Kinaseinhibitoren

**Entwicklung, Synthese und biophysikalische
Charakterisierung von Liganden zur Adressierung einer
lipophilen Bindetasche in der Mitogen-aktivierten
Proteinkinase p38 α**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Technische Universität Dortmund

vorgelegt von

MIKE BÜHRMANN

Dortmund, 14. November 2017

meiner Familie

*"Ignorance more frequently begets confidence than does knowledge:
it is those who know little, not those who know much,
who so positively assert that this or that problem will never be solved by science."*

CHARLES DARWIN
(The Descent of Man, 1932)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. Daniel Rauh und wurde im Zeitraum vom März 2013 bis November 2017 an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften oder im Rahmen der Bachelor- und Masterarbeiten von Bianca Wiedemann, Julia Hardick, Lena Quambusch und Maria Ecke veröffentlicht und wurden in dieser Dissertation an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

Termin der Abgabe der Dissertation: 14.11.17
voraussichtlicher Termin der Disputation: Dez. 2017/Jan. 2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer

Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. Daniel Rauh für die Überlassung des interessanten Themas der Dissertation, sein stetes Interesse an dem Projekt und der Möglichkeit zur individuellen Gestaltung der Arbeit sowie der zahlreichen anregenden Diskussionen während der Promotion und den wertvollen, inspirierenden Erfahrungen in seiner Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Daniel Summerer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und der entgegenkommenden Findung eines Dissertations-Termins. Des Weiteren möchte ich ihm für die Möglichkeit der Kooperation und erfolgreicherer Mitgestaltung des interessanten TALE-Projekts danken.

Für die Zeit im Arbeitskreis Rauh über den Verlauf meiner Masterarbeit und der Promotion bis hin zur Dissertation bin ich sehr dankbar und werde sicherlich noch lange an die stets entspannte Arbeitsatmosphäre, anregende Gespräche und diverse Zusammenkünfte und Unternehmungen abseits der Arbeit zurückdenken.

Insbesondere danke ich den Bachelor- und Masterstudenten Bianca Wiedemann, Julia Hardick, Lena Quambusch und Maria Ecke, deren Thesis aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und die mit ihren Ergebnissen zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem möchte ich mich bei Jörn Weisner sowie den technischen Mitarbeitern Andreas Arndt und Simone Eppmann für biologische Arbeiten, insb. Klonierungen und Proteinexpressionen- und reinigungen, und die hilfreichen Anregungen bei biologischen Fragestellungen bedanken.

Gedankt sei auch Martina Reibner und Petra Alhorn aus dem Sekretariat, die bei den anfallenden Problemen des Labor-Alltags immer mit Rat und Tat unterstützend zur Seite standen.

Mein Dank gilt ebenfalls Personen außerhalb der AG Rauh, wie den instrumental-analytische Abteilungen der TU Dortmund, namentlich der Gruppe um apl. Prof. Dr. Wolf Hiller für die Durchführung der NMR-Messungen und dem HRMS-/AMD-Team um Christiane Heitbrink.

Vom MPI Dortmund danke ich Dr. Petra Janning und Jens Warmers aus der AG Waldmann für die Bereitstellung und Wartung der während der Promotion verwendeten LCMS-Instrumente und Petra Janning, Andreas Brockmeyer und Malte Metz für die Durchführung der MS/MS-Messungen. Des Weiteren möchte ich mich für die ermöglichte Nutzung der Infrastruktur für Proteinkristallisation bedanken und in diesem Zusammenhang insb. dem Arbeitskreis um Dr. Ingrid Vetter für die Organisation der Ausflüge ans SLS Villigen zur Aufnahme der genutzten Datensätze. Georg Holtermann danke ich für die Betreuung und Wartung der Röntgenstrahl-Generatoren.

Außerdem möchte ich mich bei den Arbeitsgruppenleitern, Postdocs und Doktoranden bedanken, die in zahlreichen Kooperationsprojekten mitgewirkt haben. Prof. Dr. Stefan Laufer, Heike Wentsch und Niklas Walter von der Universität Tübingen, Prof. Dr. Frank Böckler und Dr. Markus Zimemrmann von der Universität Tübingen, Prof. Dr. Christian Peifer und Dr. Jakob Halekotte von der Universität Kiel, Prof. Dr. Maria Letizia Barreca von der Universität Perugia sowie Prof. Dr. Martin Sos und Dr. Dennis Plenker vom Uniklinikum Köln.

Für das Korrekturlesen der Dissertation und die hilfreichen Kommentare danke ich Zhizhou Fang, Matthias Müller, André Richters, Niklas Uhlenbrock, Jörn Weisner und Torben Bührmann.

Nicht zuletzt und ganz besonders möchte ich mich bei meinen verständnisvollen Eltern und meiner Familie bedanken, die während sämtlichen Phasen des Studiums und der Promotion mich stets willkommen heißen und mir fortwährend moralischen Beistand geleistet haben. Meinen Freunden danke ich ganz herzlich für die generelle Unterstützung, dem entgegengebrachten Interesse und natürlich der willkommenen Ablenkung vom Labor-Alltag.

Ohne diese Personen wäre der Abschluss dieser Arbeit in solch einer Form nicht möglich gewesen und daher gebührt ihnen allen mein aufrichtigster und verbindlichster Dank.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Kurzfassung.....	XIX
Abstract.....	XXI
Publikationen	XXII
1 Einleitung.....	1
1.1 Proteinkinasen	1
1.1.1 Struktur und Funktion	2
1.1.2 Klinische Relevanz und Kinaseinhibitoren.....	4
1.1.3 Nicht-katalytische Funktionen von Kinasen	6
1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 α	8
1.2.1 Zelluläre Funktionen von p38 α	8
1.2.2 Lipophile Bindetasche in p38 α	11
1.3 Technologien und Methoden in der Chemischen Biologie.....	18
1.3.1 Biologische und chemische Perturbationsanalysen	18
1.3.2 Beispiele für Ansätze in der Chemischen Genetik.....	19
1.3.3 Proteinidentifikation und -charakterisierung	22
1.4 Proteinkristallographie	24
2 Motivation und Zielsetzung	29
3 Liganden der lipophilen Bindetasche in p38α.....	31
3.1 Struktur-basierte Entwicklung von LiPoLis	31
3.2 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek	34
3.3 Biophysikalische Charakterisierung	43
3.3.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	43

3.3.1.1	Theoretischer Hintergrund.....	43
3.3.1.2	Assay mit NAV-Sensoren	45
3.3.1.3	Assay mit biotinylierten LiPoLis.....	48
3.3.1.4	Assay mit trisNTA-Sensoren.....	51
3.3.2	Thermal- <i>Shift</i> -Assay.....	58
3.3.2.1	Theoretischer Hintergrund.....	58
3.3.2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	59
3.3.3	<i>Microscale</i> -Thermophorese.....	61
3.3.3.1	Theoretischer Hintergrund.....	61
3.3.3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	62
3.3.4	Bio- <i>Layer</i> -Interferometrie	65
3.3.4.1	Theoretischer Hintergrund.....	65
3.3.4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	66
3.4	Strukturbiologische Charakterisierung	69
3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	75
3.5.1	Zusammenfassung	75
3.5.2	Ausblick.....	79
4	Kovalente Adressierung der lipophilen Bindetasche in p38α	86
4.1	Struktur-basiertes Design von kovalenten LiPoLis und p38 α -Mutanten	86
4.2	Generierung und Charakterisierung von p38 α -Mutanten.....	89
4.3	Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek an kovalenten LiPoLis	91
4.4	Massenspektrometrische Identifikation von Protein-Ligand-Addukten.....	98
4.4.1	Massenspektrometrie	98
4.4.2	Tandem-Massenspektrometrie	101
4.5	Strukturbiologische Charakterisierung	102
4.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	106
4.6.1	Zusammenfassung	106
4.6.2	Ausblick.....	108

5 Strukturbiochemische Untersuchungen von Kinaseinhibitoren	117
5.1 Skepinone-L-Derivate zur Adressierung des <i>R-Spine</i> in p38 α	118
5.1.1 Theoretischer Hintergrund	118
5.1.2 Stabilisierung des <i>R-Spine</i> und Verweildauer am Enzym	120
5.1.3 Harnstoffderivate und Unterbrechung des <i>R-Spine</i>	125
5.2 Algorithmus-gestützte Vorhersage von Halogen-Bindungen	129
5.2.1 Theoretischer Hintergrund	129
5.2.2 Ergebnisse und Diskussion	130
5.3 Effekte von Fluor-Substituenten am Beispiel von Sorafenib und Regorafenib	135
5.3.1 Theoretischer Hintergrund	135
5.3.2 Ergebnisse und Diskussion	137
5.4 Entwicklung dual-spezifischer CK1 δ - und p38 α -Inhibitoren	141
5.4.1 Theoretischer Hintergrund	141
5.4.2 Ergebnisse und Diskussion	142
5.5 Evaluierung von Benzothiazin-basierten p38 α -Inhibitoren	149
5.5.1 Theoretischer Hintergrund	149
5.5.2 Ergebnisse und Diskussion	150
6 Zusammenfassung	154
6.1 Zusammenfassung	154
6.2 Publikationen	159
7 Experimenteller Teil	159
7.1 Material und Methoden	159
7.1.1 Vorbemerkungen	159
7.1.2 Instrumente und Geräte	160
7.1.3 (Verbrauchs-)Materialien	161
7.2 Synthesvorschriften	163
7.2.1 Synthese von reversiblen LiPoLis	163

7.2.2	Synthese von 3-Arylpyrozolopyridinonen	189
7.2.3	Synthese von kovalenten LiPoLis und Referenzsubstanzen	191
7.2.4	Synthese von Biotin-modifizierten LiPoLis	215
7.2.5	Synthese von trisNTA	219
7.3	Mutagenese, Proteinexpression und -reinigung	224
7.3.1	Aminosäuresequenzen der verwendeten p38 α -Konstrukte	224
7.4	Phosphorylierung von p38 α mit Kinase-Titration	226
7.4.1	Phosphorylierung von p38 α mit MKK6	226
7.4.2	Kinase-Titration mit HTRF [®] -Assay	227
7.5	Biophysikalische Methoden	227
7.5.1	<i>Microscale</i> -Thermophorese	227
7.5.2	<i>Bio-Layer</i> -Interferometrie	228
7.5.3	Thermal- <i>Shift</i> -Assay	229
7.5.4	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	229
7.5.4.1	Immobilisierungsstrategie mit NeutrAvidin	229
7.5.4.2	Immobilisierungsstrategie mit trisNTA	230
7.5.4.3	Allgemeines Assayprotokoll	231
7.6	Proteinkristallographie	231
7.7	Massenspektrometrie	232
8	Literaturverzeichnis	233
9	Anhang	249
9.1	Sensorgramme	249
9.2	Aktivierung von p38 α	250
9.3	Massenspektren	251
9.4	Kristallographische Statistiken	252
9.5	Eidestattliche Versicherung	261
9.6	Lebenslauf	262

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad ($1^\circ = \pi/180$ rad)
°C	Grad Celsius ($1^\circ\text{C} = 274.15$ K)
% v/v	Volumenprozent
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10}$ m)
μw	Mikrowelle(nreaktor)
<i>a.u.</i>	willkürliche Einheit(en), englisch: <i>arbitrary unit(s)</i>
Ab	Antikörper, englisch: <i>antibody</i>
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
(c)Abl	Abelson-Kinase, englisch: (<i>cellular</i>) <i>Abelson murine leukemia</i>
Akt	Proteinkinase B
aq	wässrig, englisch: <i>aqueous</i>
ATF2	aktivierender Transkriptionsfaktor 2, englisch: <i>activating transcription factor 2</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bar	Bar ($1 \text{ bar} = 10^5$ Pa)
BCR	englisch: <i>breakpoint cluster region</i>
Biotin-PEG ₄ -säure	17-Oxo-21-(2-oxohexahydro-1 <i>H</i> -thieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-yl)-4,7,10,13-tetraoxa-16-azaheneicosansäure (19)
BLI	Bio-Layer-Interferometrie
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOG	<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranosid
BSA	Rinderalbumin, englisch: <i>bovine serum albumin</i>
Bu	Butyl
bzgl.	bezüglich
ca.	circa
CK1δ	Casein-Kinase 1 <i>delta</i>
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure, englisch: <i>meta-chloroperoxybenzoic acid</i>
cPr	Cyclopropyl

Cy	Cyclohexan
d	Tag(e), englisch: <i>day(s)</i> (1 d = 86400 s)
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DS	Wasserabscheider-Apparatur nach Dean-Stark
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, englisch: <i>epidermal growth factor receptor</i>
eq	Äquivalent(e), englisch: <i>equivalent(s)</i>
Erk	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase, englisch: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere, lateinisch: <i>et alii</i>
FAK	fokale Adhäsionskinase, englisch <i>focal adhesion kinase</i>
fl	Fluoreszenz
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n), englisch: <i>hour(s)</i> (1 h = 3600 s)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexyfluorophosphat
HCCP	Hexachlorcyclotriphosphazen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	menschlicher epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, englisch: <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, englisch: <i>high performance liquid chromatography</i>
HR	hydrophobe Region(en)
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie
HTRF®	homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz, englisch: <i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>
Hz	Hertz ($1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$)
i.d.R.	in der Regel
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
insb.	insbesondere
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
J	Joule ($1 \text{ J} = 1 \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2}$)
JNK	Jun N-terminale Kinase
K _D	Dissoziationskonstante
k _{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
k _{on}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
(c)Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
L	Liter ($1 \text{ L} = 10^{-3} \text{ m}^3$)
LCMS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, englisch: <i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LP	lipophile Bindetasche, englisch: <i>lipid pocket</i>
LiPoLi	Ligand der lipophilen Bindetasche, englisch: <i>lipid pocket ligand</i>
M	Molar ($1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
Me	Methyl
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n) ($1 \text{ min} = 60 \text{ s}$)
MKK6	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 6
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MST	<i>Microscale</i> -Thermophorese

MW	Molekulargewicht, englisch: <i>molecular weight</i>
NAv	NeutrAvidin
NHS	<i>N</i> -Hydrosuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz, englisch: <i>nuclear magnetic resonance</i>
NSB	unspezifische Bindung, englisch: <i>non-specific binding</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure, englisch: <i>nitrilotriacetic acid</i>
ovn	über Nacht, englisch: <i>overnight</i>
p38 α	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 14 (MAPK14)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, englisch: <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS + 0.01 % Triton TM X-100
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph	Phenyl
PIA	Phosphatidylinositoether-Lipidanaloga, englisch: <i>phosphatidylinositol ether lipid analogue(s)</i>
PIDA	Phenylod(III)diacetat
ppm	Millionstel, englisch: <i>parts per million</i>
Pr	Propyl
Py	Pyridin
R	Rest(e)
R ²	Korrelationskoeffizient
<i>R-Spine</i>	regulatorisches Proteinrückgrat in Kiansen, englisch: <i>regulatory spine</i>
R _f	Retentionsfaktor, englisch: <i>retardation factor</i>
RaNi	Raney-Nickel
rpm	Umdrehungen pro Minute, englisch: <i>revolutions per minute</i> (1 rpm = $2\pi/60 \text{ s}^{-1} \approx 0.1 \text{ s}^{-1}$)
rt	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit, englisch: <i>resonance unit</i>

SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung(en), englisch: <i>structure-activity relationship(s)</i>
SAv	Streptavidin
SPR(i)	(bildgebende) Oberflächenplasmonenresonanz, englisch: <i>surface plasmon resonance (imaging)</i>
cSrc	zellulär, Sarkom; englisch: <i>cellular, sarcoma</i>
Tab.	Tabelle
TAB1	TAK1-bindendes Protein 1
TAK1	transformierende Wachstumsfaktor- β -aktivierte Proteinkinase 1, englisch: <i>Transforming growth factor-β-activated protein kinase 1</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluorborat
TEA	Triethylamin
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure, englisch: <i>trifluoroacetic acid</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
T _m	Schmelzpunkt, -temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton TM X-100	(<i>para-tert</i> -Octylphenoxy)polyethoxyethanol
Ts	Tosyl
TSA	Thermal- <i>Shift</i> -Assay
Tween [®] 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
vs.	versus
w/o	ohne, englisch: <i>without</i>
WBB	Wasserstoffbrückenbindung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Kurzfassung

Als Hauptfunktion von Proteinkinasen wird gemeinhin der katalytische Phosphattransfer von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) auf ihre Substrate und deren damit einhergehende Aktivierung angesehen, wodurch Kinasen eine zentrale Rolle in zellulären Signaltransduktionskaskaden einnehmen. In den letzten Jahren sind allerdings zunehmend Kinase-Funktionen beschrieben worden, die, unabhängig von dem katalytischen Mechanismus, wichtige biologische Rollen, wie z.B. die Regulation oder Lokalisation ihrer Substrate über Protein-Protein-Interaktionen oder die Ausbildung von Multienzym-Komplexen, einnehmen. Dies kann bspw. durch die Adressierung alternativer Binderegionen fernab des aktiven Zentrums des Enzyms realisiert werden. Daher kommt der Entdeckung von entsprechenden Bindetaschen und der Entwicklung von niedermolekularen Substanzen, die gerüstgebende Funktionen modulieren können, eine grundlegende Bedeutung zu.

In dieser Arbeit wird die Struktur-basierte Konzeption und organische Synthese von 2-Arylchinazolinen beschrieben, die kürzlich als Liganden einer lipophilen Bindetasche (LiPoLis) der Proteinkinase p38 α identifiziert wurden, deren biologische Rolle bislang jedoch noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Die hergestellten Liganden wurden unter Verwendung unterschiedlicher biophysikalischer Methoden hinsichtlich ihrer Affinität zur Kinase charakterisiert und der angenommene Bindungsmodus durch Kristallisationsexperimente validiert.

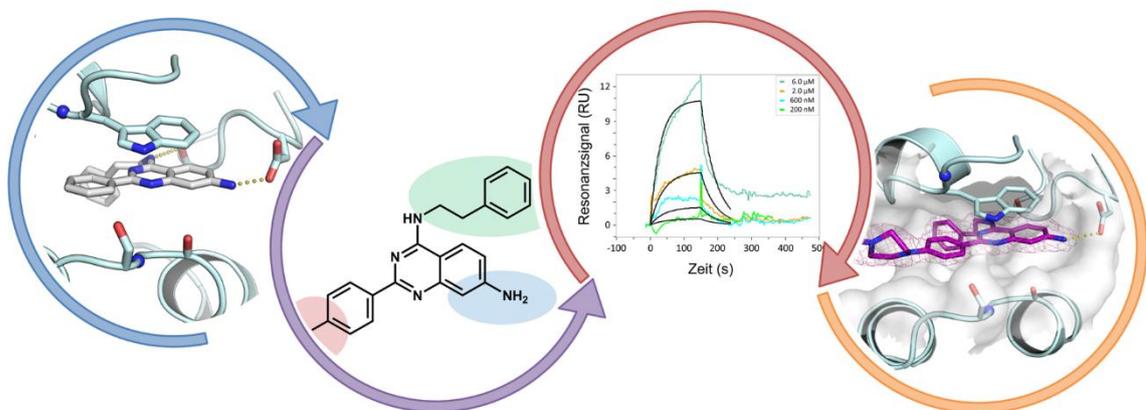


Abb. I: Schematische Darstellung der Struktur-basierten Entwicklung von Liganden der lipophilen Bindetasche in p38 α . Der Bindungsmodus zuvor identifizierter LiPoLis wurde analysiert und hieraus strukturell unterschiedliche Derivate abgeleitet, synthetisiert, biophysikalisch charakterisiert und ko-kristallisiert.

Hierbei zeigte sich, dass die Liganden wie postuliert in die lipophile Tasche binden, jedoch eine nur unzureichende Affinität aufweisen, um für den Einsatz als molekulare Sondenmoleküle in biologischen Systemen zu dienen. In Folge wurden in einem chemisch-genetischen Ansatz irreversibel bindende LiPoLis entworfen, die maßgeschneiderte Cystein-Mutanten von p38 α unter Ausbildung einer kovalenten Bindung adressieren sollten, um so die Verweildauer am Enzym zu maximieren. Im Rahmen von massenspektrometrischen Analysen wurden entsprechende Liganden-Protein-Paare identifiziert und in weiterführenden Messungen sowie strukturbiologischen Untersuchungen die jeweils eingeführten Cysteine als Markierungsposition bestätigt.

Die auf diese Weise gefundenen Liganden sind somit hinsichtlich der selektiven Reaktivität und damit irreversiblen Modifikation des Zielenzym als Sondenmoleküle geeignet, um in zukünftigen Studien für die Aufklärung der biologischen Funktion der untersuchten Bindetasche in p38 α eingesetzt zu werden.

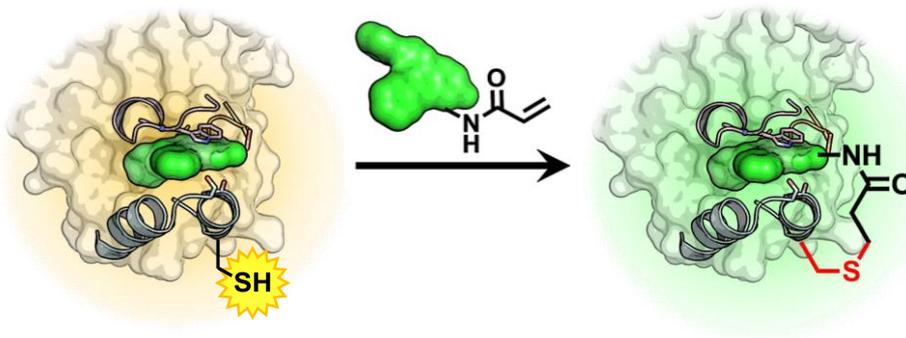


Abb. II: Schematische Darstellung des chemisch-genetischen Ansatzes zur kovalenten Adressierung der lipophilen Bindetasche in Cystein-Mutanten von p38 α mit Elektrophil-tragenden Liganden. Artifiziiell eingeführte Cysteine in der Nähe der lipophilen Bindetasche wurden genutzt, um die Ausbildung einer kovalenten Bindung mit Elektrophil-dekorierten LiPoLis zu ermöglichen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden im Rahmen verschiedener Kollaborationsprojekte Kristallstrukturen von diversen ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren im Komplex mit p38 α gelöst und diskutiert, wodurch maßgebliche Erkenntnisse in Bezug auf die jeweilige Fragestellung erzielt und beigesteuert werden konnten.

Abstract

The main function of protein kinases is widely considered the activation of their substrates by catalytic phosphotransfer from adenosine-5'-triphosphate (ATP), explaining the central role of kinases in cellular signaling cascades. Recently, more and more functions independent from this catalytic mechanism were described, that are involved in several biological processes, *e.g.*, by regulation or localization of their substrates *via* protein-protein interactions or the formation of multi-enzyme complexes, respectively. This is usually realized by addressing alternative binding regions distant from the enzyme's active site. Hence, the discovery of corresponding binding pockets and the development of small molecules capable of modulating scaffolding functions are of great interest in current scientific research.

In the present work, the structure-based design and organic synthesis of 2-arylquinazolines, which were identified as ligands of a lipophilic binding pocket (LiPoLis) in p38 α mitogen-activated protein kinase (MAPK), is described. Since the function of this pocket is not fully understood yet, the LiPoLis were thought to aid in elucidating its biological role. The generated compounds were characterized applying several biophysical methods to determine their affinity towards the enzyme and the suggested binding mode was validated by means of protein crystallography. Concluding these studies, the ligands were shown to positively address the lipophilic pocket (LP) but exhibiting a very low affinity, making them unsuitable to serve as molecular probes in biological systems. Consequently, electrophile-decorated LiPoLis were designed to target cysteine mutants of p38 α MAPK, forming a covalent bond within the LP to maximize the residence time at the enzyme. Employing mass spectrometric analysis, specific ligand-protein pairs were identified and in tandem measurements and *via* co-crystallization, the introduced cysteines were verified as the actual labeling positions.

Therefore, it could be shown that the thus found ligands exhibit a favorable reactivity and accordingly irreversible modifications of the target enzyme, rendering them suitable to be used in future studies to dissect the biological function of the described binding pocket in p38 α MAPK.

In another part of this thesis, various complex crystal structures of diverse ATP-competitive p38 α MAPK inhibitors could be solved and were discussed, significantly contributing insightful results with respect to the underlying scientific questions.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form wissenschaftlicher Artikel in Fachzeitschriften veröffentlicht oder sind im Rahmen von Kollaborationsprojekten entstanden, deren Publikation noch bevorsteht.

*: Autoren trugen gleichberechtigt zur Veröffentlichung bei (geteilte Erstautorenschaft)

- a) M. Bührmann, J. Hardick, J. Weisner, L. Quambusch and D. Rauh, “Covalent Lipid Pocket Ligands Targeting p38 α MAPK Mutants”, *Angewandte Chemie International Edition* (2017), 56(43), 13232-13236.
 - b) M. Bührmann, J. Hardick, J. Weisner, L. Quambusch und D. Rauh, “Kovalente Liganden zur Adressierung einer lipophilen Bindetasche in der MAPK p38 α “, *Angewandte Chemie* (2017), 129(43), 13415-13419.
2. M. Bührmann, B.W. Wiedemann, M.P. Müller, J. Hardick, M. Ecke and D. Rauh, “Structure-Based Design, Synthesis and Crystallization of 2-Arylquinazolines as Lipid Pocket Ligands of p38 α MAPK”, *PLoS ONE* (2017), 12(9): e0184627.
3.
 - a) H.K. Wentsch*, N.M. Walter*, M. Bührmann*, S.C. Mayer-Wrangowski, D. Rauh, G.J.R. Zaman, N. Willemsen-Seegers, R.C. Buijsman, M. Henning, D. Dauch, L. Zender and S.A. Laufer, “Optimized Target Residence Time: Type I $\frac{1}{2}$ Inhibitors for p38 α MAP Kinase with Improved Binding Kinetics through Direct Interaction with the R-Spine”, *Angewandte Chemie International Edition* (2017), 56(19), 5363-5367.
 - b) H.K. Wentsch*, N.M. Walter*, M. Bührmann*, S.C. Mayer-Wrangowski, D. Rauh, G.J.R. Zaman, N. Willemsen-Seegers, R.C. Buijsman, M. Henning, D. Dauch, L. Zender und S.A. Laufer, “Optimierte Bindungsdauer am Zielenzym: Typ I $\frac{1}{2}$ -Inhibitoren der p38 α -MAP-Kinase mit verbesserter Bindungskinetik durch direkte Interaktion mit der R-Spine“, *Angewandte Chemie* (2017), 129(19), 5448-5453.

4. N.M. Walter*, H.K. Wentsch*, M. Bührmann*, S.M. Bauer, E. Döring, S.C. Mayer-Wrangowski, A. Sievers-Engler, N. Willemsen-Seegers, G.J.R. Zamar, R.C. Buijsman, D. Rauh, M. Lämmerhofer and S.A. Laufer, “Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Type I½ p38 α MAP Kinase Inhibitors with Excellent Selectivity, High Potency and Prolonged Target Residence Time by Interfering with the R-Spine”, *Journal of Medicinal Chemistry* (2017), 60(19), 8027-8054.
5. J. Halekotte*, L. Witt, C. Ianes*, M. Krüger, M. Bührmann, D. Rauh, C. Pichlo, E. Brunstein, A. Luxenburger, U. Baumann, U. Knappschild, J. Bischof and C. Peifer, “Optimized 4,5-Diarylimidazoles as Potent/Selective Inhibitors of Protein Kinase CK1 δ and Their Structural Relation to p38 α MAPK”, *Molecules* (2017), 22(4), 522-559.
6. D. Plenker*, M. Riedel*, J. Brägelmann, M.A. Dammert, R. Chauhan, R.P. Knowles, C. Lorenz, M. Keul, M. Bührmann, O. Pagel, V. Tischler, A.H. Scheel, D. Schütte, Y. Song, J. Stark, F. Mrugalla, Y. Alber, A. Richters, J. Engel, F. Leeders, J.M. Heuckmann, J. Wolf, J. Diebold, G. Pall, M. Peifer, M. Aerts, K. Gevaert, R.P. Zahedi, R. Buettner, K.M. Shokat, N.Q. McDonald, S.M. Kast, O. Gautschi, R.K. Thomas and M.L. Sos, “Drugging the Catalytically Inactive State of RET Kinase in RET-Rearranged Tumors”, *Science Translational Medicine* (2017), 9(394): eaah6144.

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen

Proteinkinasen sind seit ihrer Entdeckung und Validierung als Zielstrukturen für die Adressierung mit Wirkstoffen zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten ein wesentlicher Bestandteil medizinisch-chemischer Forschung im akademischen Umfeld und der pharmazeutischen Industrie. Über 500 Vertreter dieser Enzymfamilie werden vom humanen Genom codiert und stellen als solche u.a. entscheidende Komponenten bei der Informationsweitergabe in zellulären Signalnetzwerken dar.^[1] Als Phosphotransferasen katalysieren Proteinkinasen die Übertragung der γ -ständigen Phosphatgruppe (PO_4^{3-}) des Co-Substrats Adenosin-5'-triphosphat (ATP) auf Hydroxylgruppen von Aminosäure-Seitenketten ihrer Substrate. Hierbei wird hinsichtlich der Substratspezifität zwischen Ser/Thr- und Tyr-Kinasen unterschieden. Durch die Einführung einer hohen negativen Punktladungsdichte durch die Phosphorylierung wird häufig eine Konformations-änderung induziert, welche i.d.R. mit funktionellen Konsequenzen in Form von Aktivitätsmodulierungen einhergeht. Dazu zählen bspw. die direkte (teilweise) Inhibierung bzw. Aktivierung des Substrats oder dessen Effektor-vermittelte Regulation, wobei eingebrachte Phosphate hierbei als Erkennungsregion dienen.^[2-3] In Signaltransduktionskaskaden spielt die Kinase-vermittelte Kontrolle der Aktivität beteiligter Komponenten eine besonders tragende Rolle, da stets eine korrekte Umwandlung äußerer Stimuli zu spezifischen Zellantworten gewährleistet sein muss, um einen „gesunden“ Phänotyp aufrechtzuerhalten.^[4-6] Eine Fehlregulation von Kinasen aufgrund genetischer Läsionen ist daher die Ursache zahlreicher Erkrankungen, darunter die Entstehung diverser Krebsarten, und stellt Proteinkinasen somit als klinisch relevante Zielstrukturen in den Fokus moderner Wirkstoffentwicklung.^[7-9]

1.1.1 Struktur und Funktion

Innerhalb der Klasse der Proteinkinasen ist die molekulare Struktur dieser Enzyme hoch konserviert, wobei insb. das aktive Zentrum, in dem sich die ATP-Bindestelle befindet und wo der katalytische Phosphattransfer abläuft, hervorzuheben ist. Es befindet sich zwischen der vorwiegend α -helikalen, C-terminalen Subdomäne und der β -Faltblatt-reichen, N-terminalen Subdomäne, welche beide durch eine flexible Scharnierregion miteinander verbunden sind und zusammen die katalytisch aktive Kinasedomäne aufbauen (Abb. 1A). Bei Bindung ins aktiven Zentrum bildet der Adeninbaustein von ATP Wasserstoffbrückenbindungen (WBBs) mit der Scharnierregion aus (Adenin-bindende Region), während die Triphosphat-Einheit zum einen von katalytischen Aminosäure-Seitenketten (Glu in α -Helix C und Lys in Faltblatt 3) gebunden und weiterhin über zwei Mg^{2+} -Ionen komplexiert wird, die über das Asp des DFG-Motivs in der Aktivierungsschleife koordiniert sind. Durch zusätzliche polare Wechselwirkungen mit der Gly-reichen Schleife wird letztendlich eine präzise Ausrichtung von ATP für den katalytischen Transfer des Phosphats gewährleistet (Abb. 1B).^[10]

Die N-terminale Begrenzung der Scharnierregion wird durch die Türsteheraminosäure markiert, welche durch Größe und Polarität den Zugang zu einer hydrophoben Untertasche (hydrophobe Region I, HRI) im aktiven Zentrum reguliert.^[11] Eine weitere hydrophobe Region, HR II, befindet sich am C-terminalen Ende der Scharnierregion.^[12-13] Einige der zuvor genannten Struktur motive stellen charakteristische Kennzeichen des Aktivitätszustands der Kinase dar.^[14] Im ATP-gebundenem Zustand nimmt die Kinase eine aktive, sogenannte DFG-*in*-Konformation ein, in der das DFG-Asp in die Richtung des aktiven Zentrums zeigt, während das DFG-Phe zur α -Helix C orientiert ist und letzteres dabei eine allosterische Tasche besetzt, die benachbart zur ATP-Bindestelle liegt. Entsprechend findet in der inaktiven DFG-*out*-Konformation eine Reorganisation der beiden Seitenketten statt, sodass sich das DFG-Asp aus dem aktiven Zentrum hinaus dreht und das DFG-Phe die zuvor blockierte Tasche freigibt (Abb. 1C,D).^[11,15]

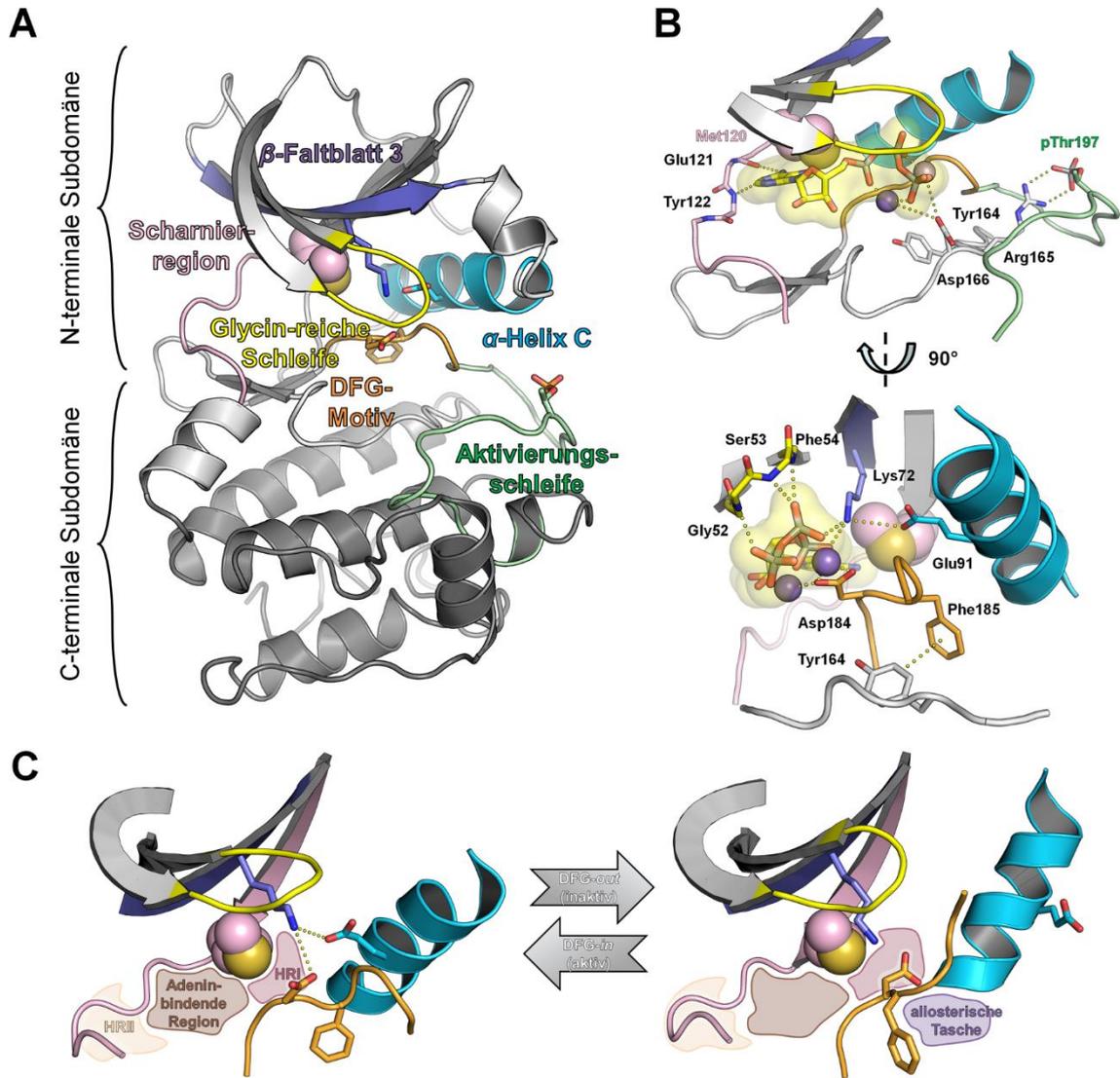


Abb. 1: Struktur und Funktion von Proteinkinasen. A) Übersichtsdarstellung der Kinasedomäne bestehend aus N-terminaler und C-terminaler Subdomäne, die über die Scharnierregion (pink) miteinander verbunden sind. Zwischen den beiden Subdomänen liegt das aktive Zentrum des Enzyms, in dem das Co-Substrat ATP bindet (PDB: 1ATP). B) Stabilisierung von ATP (gelb) im aktiven Zentrum über Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (gelbe Punkte) zwischen Scharnierregion und Adenineinheit von ATP, polarer Kontakte des Triphosphats zum Proteinrückgrat der Glycin-reichen Schleife (gelb) sowie zu zwei Mg^{2+} -Ionen (lila Kugeln), die darüber hinaus mit dem DFG-Asp und Aminosäure-Seitenketten in der katalytischen Schleife koordiniert sind. C) Links: Aktives Zentrum einer aktiven Kinase in DFG-in-Konformation mit charakteristischer Salzbrücke zwischen dem Glu in α -Helix C und dem Lys in Faltblatt 3 (blau). Entlang der Scharnierregion befinden sich die Adenin-bindende Region (braun), HRII (beige) sowie durch die Türsteheramino-säure in der Zugänglichkeit kontrollierte HRI (rot); rechts: Aktives Zentrum einer inaktiven Proteinkinase in DFG-out-Konformation mit von N-terminaler Subdomäne dissoziierter α -Helix C und nach Rotation des DFG-Motivs freigegebener allosterischer Tasche (violett) (PDB: 3W8Q).

Abhängig vom Aktivierungszustand der Kinase nimmt die α -Helix C ebenfalls unterschiedliche Konformationen an.^[16] Dabei spielt der Abstand zur flexiblen Aktivierungsschleife, auf der sich ein charakteristisches Motiv mit Phosphorylierungsstellen zur Aktivierung der Kinase befindet, eine entscheidende Rolle bei der Koordinierung von ATP.^[17-18] Proteinkinasen im aktiven Zustand weisen außerdem Motive auf, die sich über beide Subdomänen erstrecken. Hierzu gehören das regulatorische Rückgrat (*R-Spine*), welches aus vier hydrophoben Aminosäure-Seitenketten aufgebaut ist, die zum Teil Bestandteil der konservierten DFG- und HRD-Motive sind, und zum anderen das katalytische *C-Spine*, welches unter Einbeziehung des Adeninrings von ATP ausgebildet wird.^[19-20]

1.1.2 Klinische Relevanz und Kinaseinhibitoren

Zahlreiche Krankheitsbilder konnten in den vergangenen Jahren mit der Fehlregulation von Kinasen korreliert werden. Dazu zählen vor allem die Entstehung diverser Tumorarten, wie z.B. nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (EGFR)^[21], chronisch-myeloische Leukämie (BCR-Abl)^[22], gastrointestinaler Stromatumor (*cKit*)^[23] oder Brustkrebs (HER2)^[24], aber auch Entzündungskrankheiten, bspw. Schuppenflechte und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (p38 α)^[25-26], rheumatoide Arthritis (JNK)^[27] sowie diverse weitere Krankheiten.^[28-29] In der Regel bedingt eine Dysregulation entsprechender Kinaseaktivität eine fehlerhafte Weiterleitung von Signalen innerhalb von Transduktionskaskaden und führt damit zu einer ungewünschten, pathologischen Antwort auf Zellebene. Diese resultiert bspw. in unkontrollierte Zellproliferation, -wachstum und Apoptose (Krebs) oder anhaltende Produktion und Freisetzung von Zytokinen (Entzündungserkrankungen). Mit dem zunehmenden Verständnis und der molekularen Aufklärung zellulärer Signalnetzwerke wurde der Weg für eine (Arzneistoff-)Therapie mit klinisch relevanten Proteinkinasen als Zielstrukturen geebnet. Klassischerweise wird hierbei die Aktivität fehlregulierter Kinasen mit Hilfe von Hemmstoffen gesenkt, die als Kinaseinhibitoren bezeichnet und entsprechend des Wirkmechanismus in verschiedene Klassen (Typ I-IV) unterteilt werden.^[2,30]

Typ I- und Typ II-Inhibitoren fungieren als ATP-Analoga und adressieren das aktive Zentrum in der aktiven DFG-*in*- (Typ I) oder inaktiven DFG-*out*-Konformation (Typ II) und verhindern im gebundenen Zustand die Bindung und Umsetzung vom Co-Substrat, wobei manche Hemmstoffe vom Typ I in bestimmten Kinasen auch „Zwischenzustände“ des DFG-Motivs (DFG-*in between*)^[31] stabilisieren können (Abb. 2A,B).^[32-33] Eine der wesentlichen Herausforderungen in der Entwicklung von Kinaseinhibitoren liegt aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit unter Proteinkinasen darin, Selektivität gegenüber spezifischen Kinasen zu erreichen, was mit bloßen ATP-Mimetika schwierig zu erreichen ist.^[34-35] Die Ausnutzung der allosterischen Tasche, die durch Einnahme der DFG-*out*-Konformation freigegeben wird, stellt eine Möglichkeit zur Selektivitäts-Steigerung dar, da diese strukturell einzigartige Merkmale für bestimmte Kinasen aufweisen kann. Inhibitoren vom Typ II adressieren diese Region zwar, stehen aber immer noch in Konkurrenz mit ATP, während für Typ III-Inhibitoren Spezifität durch exklusive Bindung in die allosterische Tasche erzielt wird (Abb. 2B,C).^[36] Manche Kinasen besitzen Bindetaschen, die sich in einiger Entfernung zum aktiven Zentrum befinden und direkt mit der katalytischen Aktivität in Verbindung stehen, welche für diese entsprechenden Kinasen einzigartig sind und deswegen zur Steigerung der Selektivität unter Verwendung allosterischer Typ IV-Inhibitoren ausgenutzt werden können (Abb. 2E).^[33] Eine weitere Möglichkeit bietet die Adressierung nicht-konservierter nukleophiler Aminosäure-Seitenketten (i.d.R. Cys) in der ATP-Bindetasche mit kovalent bindenden Inhibitoren (oftmals Typ VI^[37]), die eine reaktive Gruppe in Form eines Elektrophils tragen (Abb. 2D).^[38]

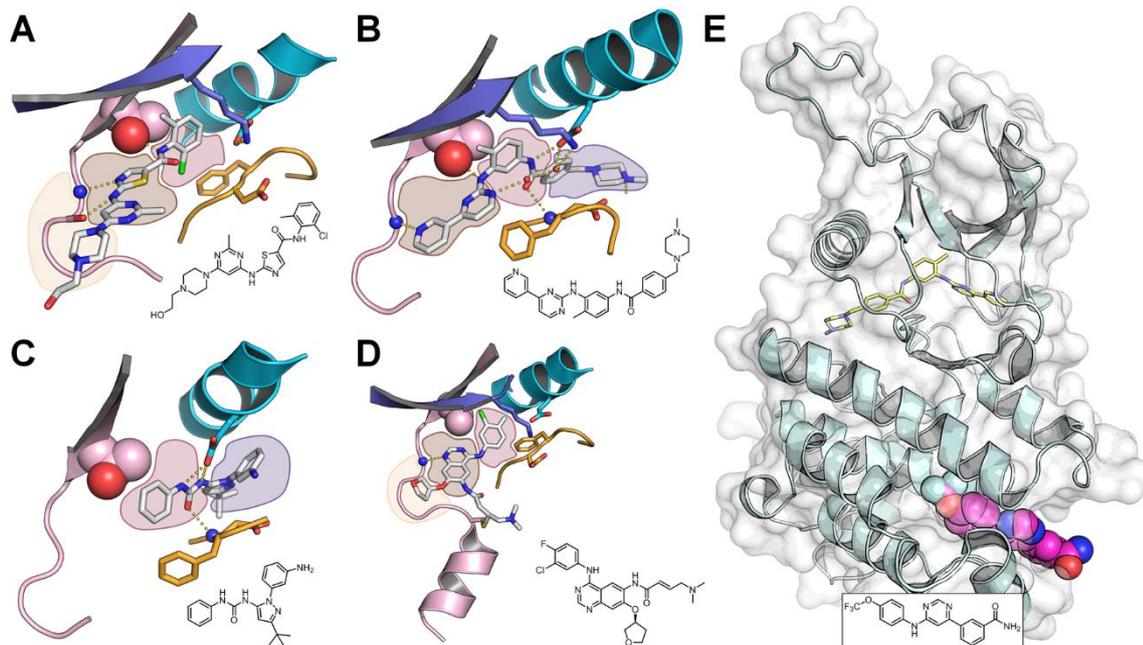


Abb. 2: Klassifizierung von Proteinkinaseinhibitoren. A) In aktiver DFG-*in*-Konformation von *cSrc* gebundener Typ I-Inhibitor Dasatinib (PDB: 3G5D); in der Adenin-bindenden Region werden WBBs (gelbe Punkte) zur Scharnierregion (rosa) ausgebildet und hydrophobe Strukturmodule besetzen HRI und II; B) in inaktiver DFG-*out*-Konformation von *cAbl* gebundener Typ II-Inhibitor Imatinib (PDB: 3K5V); zusätzlich zu den typischen Interaktionen eines Typ I-Inhibitors wird die durch Rotation vom DFG-Phe freigegebene allosterische Tasche besetzt; C) in allosterischer Tasche von *cSrc* gebundener Typ III-Inhibitor (PDB: 3F3U); keine Kontakte zur Scharnierregion werden ausgebildet, sondern exklusiv die allosterische Tasche (und HRI) adressiert; D) kovalenter EGFR-Inhibitor Afatinib (PDB: 4G5J); irreversible Inhibition durch Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem am C-terminalen Ende der Scharnierregion gelegenen Cystein; E) in vom aktiven Zentrum entfernter Bindetasche von *cAbl* gebundener allosterischer Typ IV-Inhibitor GNF-2 (magenta) (PDB: 3K5V); die Besetzung der Myristoyl-Bindetasche in der C-terminalen Subdomäne führt zur Induktion des Autoinhibitionsmechanismus. (Abb. nach Rabiller *et al.*)

1.1.3 Nicht-katalytische Funktionen von Kinasen

Nach wie vor fokussieren sich die meisten wissenschaftlichen Publikationen in der Kinaseforschung auf den Phosphattransfer und dessen Inhibition. Ein erhebliches Interesse an den translatorischen und strukturellen Aspekten dieser Enzyme wird u.a. durch die hohe Anzahl der im Komplex mit Hemmstoffen im aktiven Zentrum kokristallisierten Strukturen in der PDB verdeutlicht. Es werden allerdings zunehmend vom katalytischen Mechanismus unabhängige Funktionen entdeckt, bei denen Kinasen oftmals Oberflächenareale als Interaktionsregionen für intermolekulare Wechselwirkungen (z.B. mit Substraten oder Effektoren) bereitstellen.^[39-40] Zu solchen sogenannten gerüstgebenden Funktionen (*scaffolding functions*) zählt im Wesentlichen die Modulierung molekularer Interaktionen, indem die Verfügbarkeit beteiligter Komponenten ermöglicht, vereinfacht bzw. eingeschränkt wird. Dies kann über die veränderte Lokation (bspw. zu spezifischen Elementen von Transduktionskaskaden oder

Aktivierungsprozessen) oder die Stabilisierung von entsprechenden Substraten (bspw. durch deren Schutz vor Abbau) erreicht werden (Abb. 3).^[41-42] Von gerüstgebenden Funktionen von Kinasen wird angenommen, dass sie in Anzahl und Bedeutung die bislang hauptsächlich untersuchten katalytischen Funktionen übersteigen könnten; allerdings ist noch vergleichsweise wenig über sie bekannt.^[43]

Beispielsweise stabilisiert der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) den membranständigen Natrium-/Glukose-Cotransporter 1 und trägt auf diese Weise zu einer Aufrechterhaltung eines basalen intrazellulären Glukose-Spiegels bei. Folglich wird die Autophagozytose von Krebszellen unterbunden.^[44] Eine weitere Kinase-unabhängige Funktion von EGFR ist die Interaktion mit dem pro-apoptotischen p53-regulierten Modulator der Apoptose und dessen damit verbundene Herunterregulierung, wodurch der Zelltod verhindert wird.^[45]

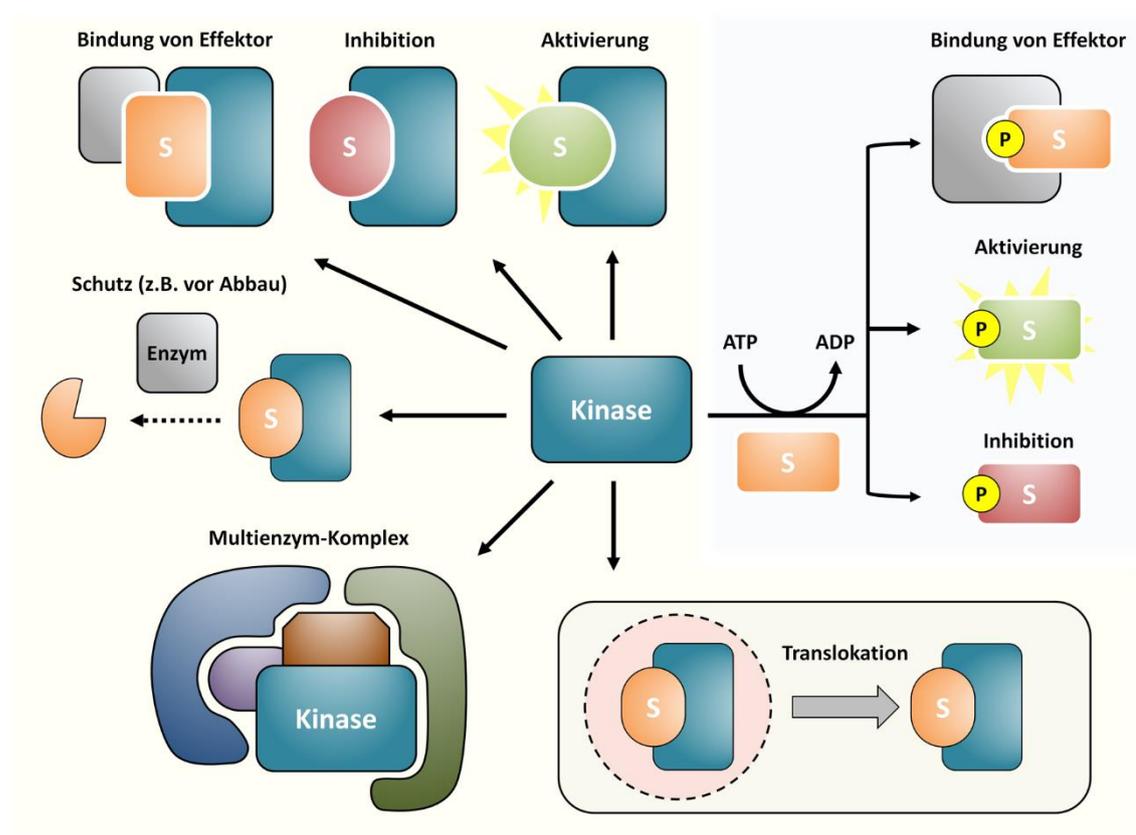


Abb. 3: Schematische Darstellung katalytischer und gerüstgebender Funktionen von Kinasen. Jeweilige Substrate (S) können von Kinasen direkt oder indirekt in ihrer Regulation und Lokalisation beeinflusst werden, ohne dass dafür eine Aktivitätsmodulation über Phosphorylierung(en) erfolgen muss.

Vertreter der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) p38 fungieren in proliferierenden Zellen über nicht-katalytische Mechanismen als Effektor der dual-spezifischen Tyrosin-Phosphorylierungs-regulierten Kinase 1B und blockieren so deren Funktion als Transkriptionsfaktor, wodurch eine Modulation der transkriptionellen Aktivität erreicht wird.^[46] Die fokale Adhäsionskinase- (FAK-)vermittelte Lokation von Paxillin zur Zellmembran initiiert die Aktivierung vom JNK-Signalweg und eine damit verbundene Zellmotilität.^[47] Für FAK wurde ferner beschrieben, dass es zusammen mit der verwandten Protein-Tyrosinkinase 2β in den Zellkern transloziert, wo sie an den Tumorsuppressor p53 und die E3 Ubiquitin-Proteinligase Mdm2 binden und so die Ubiquitinylierung von p53 und dessen darauffolgenden Abbau einleiten. Dies führt zu gesteigertem Zellwachstum und -überleben.^[48]

Diese Beispiele zeigen die maßgebliche biologische Relevanz nicht-katalytischer, gerüstgebender Funktionen von Kinasen im zellulären Kontext sowie deren Implikation in bspw. der Entstehung von Krankheiten und Wirkstoffresistenzen auf. Eine der nächsten großen Herausforderungen in der medizinisch-chemischen Forschung wird es sein, die Identifikation und Analyse entsprechender beteiligter Komponenten sowie die Aufklärung der hervorgerufenen physiologischen Effekte voranzutreiben. Die in der vorliegenden Arbeit diesbezüglich behandelte Fragestellung könnte am Beispiel der MAPK p38 α einen möglichen Beitrag auf diesem Gebiet leisten.

1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 α

1.2.1 Zelluläre Funktionen von p38 α

Die Ser/Thr-Kinasen p38 sind Mitglieder der MAPK-Familie, zu der hauptsächlich noch extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen (Erks) und JNKs zählen.^[49] Es wird zwischen vier p38-Isoformen unterschieden (p38 α , β , γ und δ), die zwar eine hohe Sequenzidentität teilen, jedoch in bestimmten Geweben verschieden stark exprimiert vorliegen und jeweils spezifische Aufgaben erfüllen.^[50] p38 α (MAPK14) ist von diesen Isoformen am eingehendsten in seiner Funktion verstanden und wird als die relevanteste bzw. eine essentielle Variante des Enzyms angesehen.^[51-52]

Die zelluläre Lokalisation von p38 α hängt insb. vom Aktivitätszustand und dem jeweiligen Zelltyp ab. Beispielsweise kann zuvor im Cytoplasma „ruhendes“ p38 α nach Phosphorylierung, u.a. als Antwort auf Ultraviolett- (UV-)Strahlung oder Desoxyribonukleinsäure- (DNA-)Schäden, in den Nukleus translozieren und hat dort Zugang zu Transkriptions-involvierten Substraten (Abb. 4).^[53-54] Spezifische Reaktionen auf solche äußeren Reize werden durch Weiterleitung entsprechender Signale über sogenannte MAPK-Kaskaden hervorgerufen.^[55] Im Fall von p38 α zählen neben den bereits genannten Stimuli oxidativer Stress^[56], Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine^[57], osmotischer Schock^[58], Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren^[59] und ionisierende Strahlung^[57] zu Auslösern, die eine Aktivierung des Signalweges initiieren. Das extrazelluläre Signal wird von membranständigen Rezeptoren aufgenommen und im Zellinneren an die kleinen Guanosin-5'-triphosphatasen Rac und Cdc42 weitergegeben, bevor es das MAPK-Modul erreicht, welches die sequentielle Abfolge nacheinander geschalteter Proteinkinasen bezeichnet. Am Anfang dieser charakteristischen, das eintreffende Signal verstärkenden und dirigierenden Kaskade stehen je nach Stimulus spezifische MAPKKs (MAPK-Kinase-Kinasen), zu deren Substraten MAPKKs (MAPK-Kinasen) zählen, welche nach ihrer Aktivierung wiederum letztendlich MAPKs (hier: p38 α) phosphorylieren.^[60-62]

Die Aktivierung von p38 findet über eine konventionelle duale Phosphorylierung an Thr180 und Tyr182 im Thr-Gly-Tyr-Motiv der Aktivierungsschleife statt und ermöglicht Reaktionen auf den initialen Reiz, die von Dauer und Intensität des eintreffenden Signals abhängen. Durch Modulation der Aktivität beteiligter Komponenten des jeweiligen Transduktionspfades bspw. in Form von Dephosphorylierung durch Phosphatasen oder Expressionsregulation, können diese Parameter kontrolliert werden.^[63-64] Knapp 100 Substrate von p38 α sind derzeit bekannt, zu denen u.a. weitere Proteinkinasen und diverse Transkriptionsfaktoren zählen.^[65-66] Eine der ersten Entdeckungen diesbezüglich war die Identifikation von p38 α als Aktivator der MAPK-aktivierten Proteinkinase 2.^[67] Ansonsten zählen zu den Hauptfunktionen von p38 α z.B. die Regulation der Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie Interleukinen oder dem Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und die damit verbundene Kontrolle von Zellproliferation, -differenzierung, -migration und -überleben^[68-69], die Reparatur von DNA-Schäden und dadurch bedingte Auswirkungen auf kardiovaskuläre Homöostase^[70] und Fortschreiten von Krebserkrankungen^[71] sowie Angiogenese und dem Umbau von Aktinfilamenten in Endothelzellen^[52].

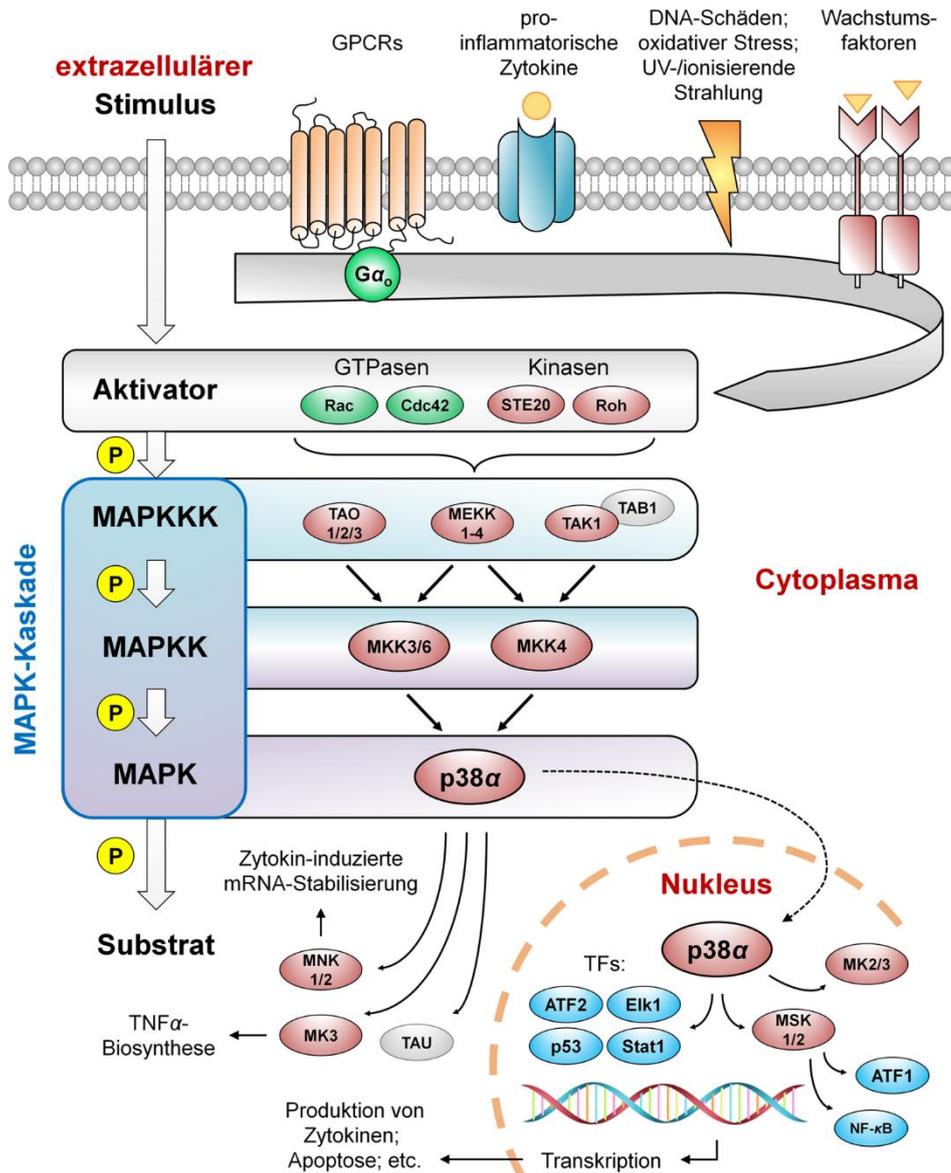


Abb. 4: Zentrale Position von p38 α in Signalnetzwerken. Ausschnitt der p38 α -vermittelten Signaltransduktion, beginnend von einem extrazellulären Stimulus über Induktion der MAPK-Kaskade bis zur Aktivierung verschiedener Substrate; Kinasen (rot), Transkriptionsfaktoren (TFs, blau), G-Proteine (grün). Legende: ATF1/2: aktivierender TF 1/2; Cdc42: Zellteilungskontrollprotein 42-Homolog; Elk1: ETS-Domänen-enhaltender TF; MEKK: MAPKKK1; MK2/3: MAPK-aktivierte Proteinkinase 2/3; MKK3/4/6: MAPKK3/4/6; MNK1/2: MAPK-interagierende Ser/thr-Proteinkinase 1/2; MSK1/2: Ribosomale Protein-S6-Kinase 1/2; P: Phosphat; Rac: Ras-verwandtes C3 Botulinum-Toxin-Substrat; Rho: Ras-ähnliches GTP-bindendes Protein; Stat1: Singal-Überträger und -Aktivator der Transkription 1; STE20: Ser/Thr-Kinase 20; TAO: Ser/Thr-Kinase TAO; TAU: Mikrotubuli-assoziiertes Protein TAU.

Wie bereits geschildert fokussiert sich die Kinaseforschung im Wesentlichen auf die Entwicklung potenter Inhibitoren klinisch relevanter Vertreter, zu denen auch p38 α zählt. Als eine der ersten entzündungshemmenden Wirkstoffe wurden (Imidazolyl)pyridine entdeckt, zu denen auch SB203580 als prominentes Beispiel eines Typ I-Inhibitors von p38 α zählt.^[72] BIRB 796 stellt einen ausgiebig charakterisierten Typ II-Inhibitor dar, der sich durch eine besonders langsame Dissoziation und dadurch entsprechend effiziente Hemmung von p38 α auszeichnet.^[73] Zu den potentesten bislang bekannten p38-

Inhibitoren zählt der Typ I-Binder Skepinone-L, welcher durch seltene Interaktionen innerhalb der Scharnierregion ein ausgezeichnetes Selektivitäts- und Aktivitätsprofil erreicht, die an späterer Stelle dieser Arbeit detaillierter besprochen werden (vgl. Kapitel 5.1).^[74] Alle genannten Substanzen sind Beispiele ATP-kompetitiver Hemmstoffe (Abb. 5), die jedoch nicht als therapeutisch einsetzbare Wirkstoffe zugelassen wurden. In der Forschung fungieren sie allerdings als unentbehrliche chemische Sondenmoleküle zur Analyse und Aufklärung zellulärer Funktionen und Prozesse, in denen p38 α involviert ist (vgl. Kapitel 1.3).

Interessanterweise wurden im Laufe der Zeit alternative Mechanismen identifiziert, die (neben der Aktivierung über die MAPK-Kaskade) zur Modulation der p38 α -Aktivität führen. Die Bindung von TAB1 (transformierende Wachstumsfaktor- β -aktivierte Proteinkinase 1-bindendes Protein 1) induziert bspw. eine konformative Umordnung der Aktivierungsschleife in p38 α und ermöglicht so eine Autophosphorylierung.^[75-76] Außerdem kann p38 α in T-Zellen im Rahmen der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung an Tyr323 durch die ζ -Ketten-assoziierte Proteinkinase ZAP70 aktiviert werden.^[77] Ein besonderes Beispiel wurde mit der Entdeckung eines rein allosterischen Inhibitors beschrieben, der eine Binderegion in der C-terminalen Subdomäne der Kinase adressiert.^[78]

Diese Studien veranschaulichen einmal mehr die zunehmende Bedeutung der Identifikation von alternativen Regionen, die von Interaktionspartnern in der Zelle oder niedermolekularen Substanzen besetzt werden können sowie der Aufklärung ihrer Funktion im physiologischen Kontext. In diesem Zusammenhang wird folgend eine mögliche solche Region, die in p38 α entdeckt wurde, im Detail erläutert.

1.2.2 Lipophile Bindetasche in p38 α

Die lipophile Bindetasche (LP) ist in der C-terminalen Subdomäne von p38 α lokalisiert und beschreibt eine vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaute Binderegion für eine Auswahl bekannter Liganden (LiPoLis) (Abb. 5). Zum Teil existieren Ko-Kristallstrukturen im Komplex mit der Kinase, die eine Analyse der konformativen Auswirkungen bei Bindung der LiPoLis ermöglichen, wobei maßgebliche Strukturelemente innerhalb der LP identifiziert wurden (siehe unten). Allerdings ist die biologische Funktion dieser Tasche und ihrer Liganden noch nicht vollständig verstanden, wobei je nach Studie verschiedene Hypothesen hierzu aufgestellt wurden.

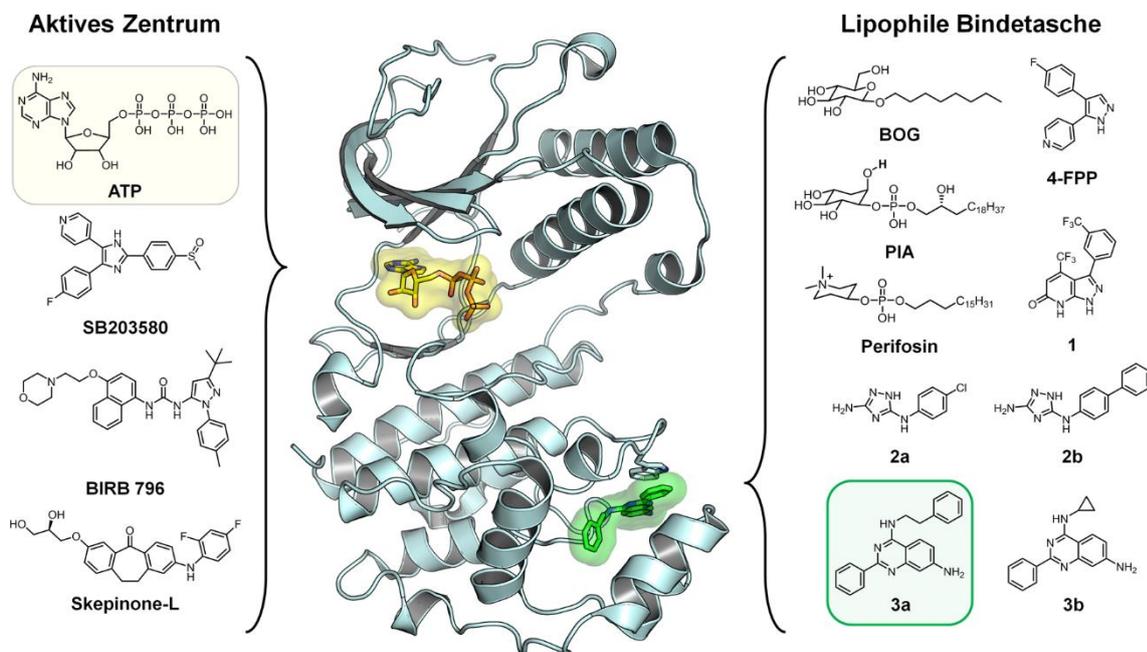


Abb. 5: ATP-kompetitive Inhibitoren und LiPoLis für p38 α . Übersichtsdarstellung der Kinasedomäne von p38 α mit gebundenem ATP (gelb) im aktiven Zentrum und **3a** (grün) in der LP (PDB: 1ATP, 4DLJ); links: Vertreter ATP-kompetitiver Inhibitoren, rechts: Literatur-beschriebene LiPoLis.

Die LP befindet sich in einer Region der Kinasedomäne, die als MAPK *insert* bezeichnet wird und für die entsprechende Familie bzgl. des ansonsten typischen Aufbaus der Kinasedomäne einzigartig ist. In der Literatur findet dieser Bereich nur wenig Erwähnung, wobei z.B. Studien an Erk2 (MAPK1) zeigten, dass ein Entfernen des *insert* zum Ausschluss des Enzyms aus dem Zellkern führt.^[79] Diskin *et al.* lösten 2007 die Kristallstruktur des Detergens *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (BOG) im Komplex mit p38 α und beobachteten eine signifikante Konformationsänderung im MAPK *insert*.^[80] Anhand dieser Studie erfolgte erstmals die Identifikation der LP als Bindetasche für Lipid-artige Moleküle und der an ihrer Ausbildung beteiligten Strukturelemente dieser Region.

Im Wesentlichen wird die LP durch die zwei α -Helices 1L14 und 2L14, die durch eine kurze Schleife miteinander verbunden sind sowie die α EF/ α F-Schleife ausgebildet (Abb. 6A). Diese Bereiche sind plastisch flexibel und ermöglichen eine Öffnung der Tasche und somit die Bindung von LiPoLis. Dabei spielen insb. Trp197 und Met198 in der α EF/ α F-Schleife eine maßgebende Rolle. In Abwesenheit eines LiPoLis als passendes Substratmolekül besetzen die Seitenketten dieser Aminosäuren als „Pseudoliganden“ den Zugang zur LP und der geringe Abstand zwischen den beiden zuvor genannten strukturgebenden Bereichen führt zu einer Schließung der Tasche. Eine Umordnung der Trp197- und Met198-Seitenketten wird in Anwesenheit von LiPoLis induziert, sodass das

konformative Gleichgewicht auf Seite eines geöffneten Zustands der LP verlagert wird. Im Fall von BOG rotiert Trp197 um ca. 90° aus der Tasche und das zuvor vergrabene Met198 wechselt in eine Lösungsmittel-exponierte Orientierung, woraufhin bis zu zwei BOG-Moleküle in die auf diese Weise (teilweise) freigegebene LP binden können und sich α EF/ α F-Schleife und 1L14/2L14 räumlich voneinander entfernen (Abb. 6B). Die lipophile Octyl-Kette von BOG bindet dabei tief in die LP, während die polare Kopfgruppe WBBs mit polaren Aminosäureseitenketten (Asn201, Lys249, Asp292, Ser293, Asp294), dem Proteinrückgrat (His199, Asn201, Ser293) sowie mit umgebenden Wassermolekülen einget. Andere LiPoLis (siehe unten) induzieren eine Konformationsänderung in Form einer Trp-Rotation um bis zu ca. 180° und eine vollständige Freigabe des Innenraums der Tasche. Das Vorhandensein des zentralen Trp in p38 α , welches anderen Vertretern der MAPKs im *insert* fehlt, stellt eine strukturelle Besonderheit dar und könnte angesichts der tragenden Rolle bei der Ligandenbindung eine distinkte biologische Funktion der Tasche nahelegen.^[81]

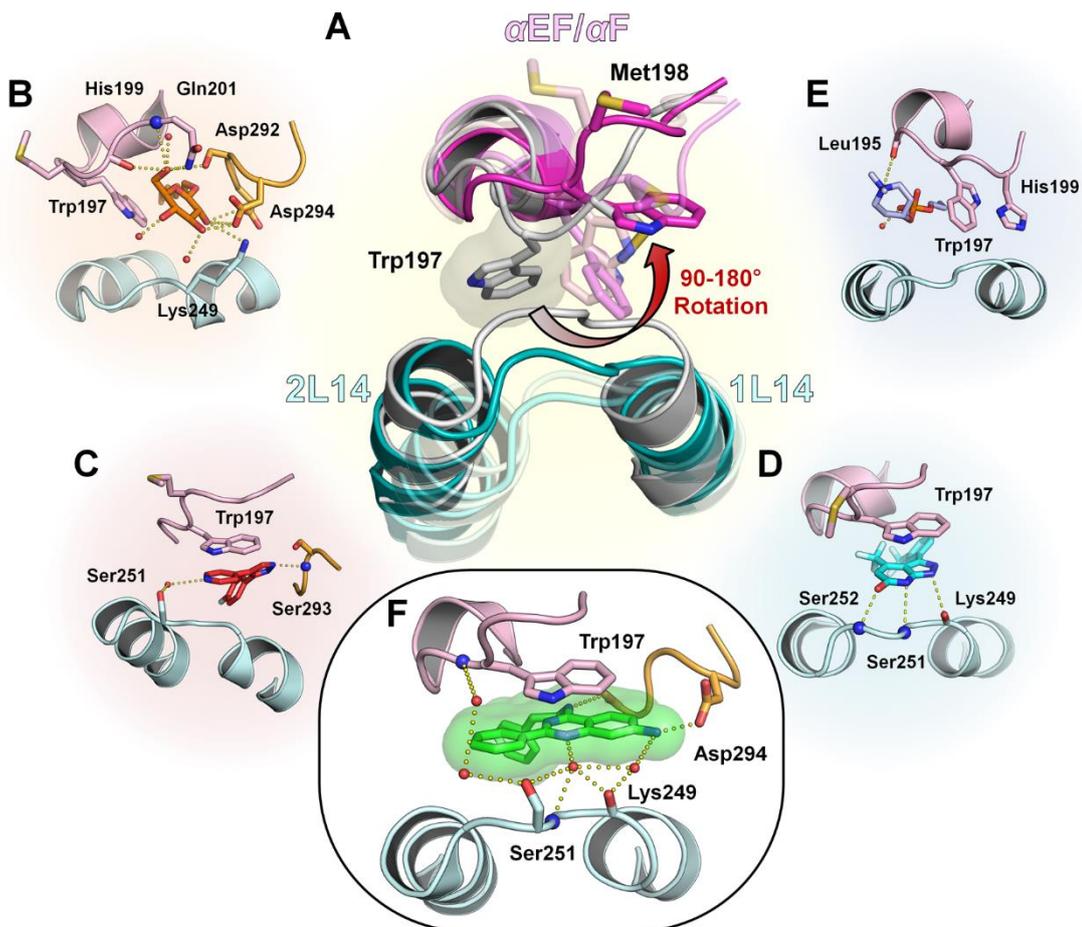


Abb. 6: Plastische Flexibilität der LP und Ko-Kristallstrukturen von LiPoLis im Komplex mit p38 α . A) Freigabe der LP durch Konformationsänderungen von Trp197 und Met198; Trp197 rotiert dabei abhängig vom anwesenden LiPoLi um 90 - 180° und nimmt verschiedene Orientierungen der Seitenkette ein; flexible Öffnungszustände der Tasche (roter Pfeil). LP von p38 α im Komplex mit B) BOG (PDB: 2NPQ), C) 4-FPP (PDB: 3HVC), D) **1** (PDB: 3NEW), E) Perifosin (PDB: 4E6C), F) **3a** (PDB: 4DLJ); WBBs (gelbe Punkte).

Die Verwendung von Detergenzien und insb. von BOG führte in der Vergangenheit bereits zur Entdeckung von Lipidbindungsregionen in Enzymen.^[82-83] In einer weiterführenden Arbeit zeigten Diskin *et al.*, dass die Bindung von BOG in die LP keine direkte biologische Relevanz besitzt, stellten jedoch die Hypothese auf, dass die Tasche ebenfalls von strukturell ähnlichen Molekülen adressiert werden könnte.^[81] Auf Basis von Modellierungsstudien postulierten die Autoren die LP als Zielregion der als p38-Effektoren beschriebenen 12(s)- und 15(s)-Hydroxyeicosatetraensäuren, konnten dies experimentell allerdings nicht belegen.^[84-85] Bereits 2004 konstatierten Nolen *et al.*, dass die α EF/ α F-Schleife die Konformation der Aktivierungsschleife stabilisieren und auf diese Weise modulieren könnte, wodurch ihr (bzw. Liganden des MAPK *insert*) eine Rolle in der Feinregulierung der Kinaseaktivität zukommen würde.^[86]

Eine spätere Ko-Kristallstruktur zeigt p38 α im Komplex mit dem SB203580 strukturell verwandten 4-[3-(4-Fluorophenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]pyridin (4-FPP) sowohl im aktiven Zentrum als auch in der LP (Abb. 6C).^[87-88] Der Fluorophenyl-Substituent des Liganden besetzt das Innere der LP und induziert eine 180°-Rotation von Trp197. Dies ermöglicht die Ausbildung einer π - π -Stapelwechselwirkung zwischen dieser Seitenkette und der Pyridineinheit von 4-FPP, welche außerdem eine Wasser-vermittelte WBB mit der Seitenkette und dem Rückgrat-NH von Ser251 eingeht. Das Pyrazol-Grundgerüst bildet eine direkte WBB mit dem Ser293-NH aus. Bis auf eine Ausnahme konnten trotz des vergleichbaren chemischen Aufbaus keine Derivate von SB203580 in der LP beobachtet werden.^[89] Die veröffentlichte Struktur zeigt allerdings eine *meta*-Substitution des halogenierten aromatischen Systems, die eine optimale Orientierung des gesamten Moleküls in der LP begünstigen könnte (PDB: 1IAN).

Computer-gestützte Analysen legen nahe, dass die LP aufgrund der räumlichen Flexibilität Moleküle verschiedenster Form und Größe binden kann.^[87] Zu den bislang beschriebenen Funktionen des MAPK *insert* in anderen Kinasen zählen bspw. die Bereitstellung von Bindungsregionen für Struktur motive von spezifischen Substraten^[90-91] oder die direkte Involvierung in Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPIs) zur Vermittlung nicht-katalytischer Funktionen^[92-93]. Basierend darauf nahmen Perry *et al.* nach der Entdeckung von 4-FPP als LiPoLi ähnliche Mechanismen, wie bspw. die (Trans-)Lokation oder eine Beeinflussung der Konformation von p38 α bzw. entsprechender Substrate, für die LP an.^[87]

Im Rahmen von Hochdurchsatz-Screenings wurde von der Firma Abbot ein weiterer LiPoLi in Form von 4-(Trifluoromethyl)-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1,7-dihydro-6*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-6-on (**1**) gefunden (Abb. 6D).^[94] Ähnlich zu den vorherigen Strukturen verdrängt hier der Trifluoromethylphenyl-Substituent das Trp197 aus dem Inneren der LP und ermöglicht somit Stapelinteraktionen mit dessen Seitenkette und dem Pyrazolopyridinon-Kern von **1**. Die Heteroatome des Grundgerüsts bilden zudem direkte WBBs zu dem Rückgrat der Aminosäuren Lys249, Ser251 und Ser252 aus.

Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung von **1** war eine inhibitorische Aktivität im Screening-Assay von 1.2 μ M. In der entsprechenden Kristallstruktur wurde teilweise Differenzelektronendichte im aktiven Zentrum gefunden, die **1** zugeordnet werden und eine Erklärung für die hemmende Wirkung darstellen kann. Weiterhin gibt die Struktur keinen Aufschluss über einen möglichen Mechanismus einer postulierten allosterischen Inhibition (wie z.B. im Fall von Abl^[95] oder Akt^[96]). Die Autoren diskutieren (ähnlich wie Nolen *et al.*^[86], siehe oben) einen Zusammenhang mit der geometrischen Ausrichtung der Aktivierungsschleife. Dabei könnte das konservierte, im MAPK *insert* von p38 α befindliche APE-Motiv eine Rolle spielen, dessen Funktion im Zusammenhang mit der Interaktion zu Aminosäuren in der Aktivierungsschleife bereits beschrieben wurde.^[97]

BioFocus beschrieb im selben Jahr die Entdeckung und Weiterentwicklung von dem Fragment *N*⁵-(4-Chlorophenyl)-1*H*-1,2,4-triazol-3,5-diamin (**2a**) zu *N*⁵-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-1*H*-1,2,4-triazol-3,5-diamin (**2b**) als LiPoLis.^[98] Zu den hauptsächlichen Interaktionen innerhalb der LP zählen WWBs zu Ser293 und Lys294 sowie eine Umorientierung des Trp197.^a In der vorliegenden Publikation wurde dieser Mechanismus als Neuheit beschrieben, tatsächlich konnte dies jedoch bereits in vorangegangenen Publikation gezeigt werden.^[87,94] Interessanterweise wurde auch der hydrophobe Kontakt zum C β -Atom von Glu192 als wichtige Wechselwirkung mit dem tief in die Tasche bindenden Aromaten konstatiert.

^a Die in der Publikation beschriebenen Strukturen sind nicht in der PDB hinterlegt.

Mit Hilfe einer kleinen Substanzbibliothek konnten Einflüsse auf die Affinität der Liganden in Abhängigkeit des hydrophoben Restes in 5-Position des Triazolkerns abgeleitet werden, wobei mit steigender Größe des Substituenten die Affinität zu p38 α zunahm. Allerdings zeigten Ko-Kristallisationsstudien mit **2b**, dass im Vergleich zu **2a** zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum der Kinase beobachtet werden kann und somit wie im Fall von 4-FPP und **1** eine super-stöchiometrische Bindung vorliegt, die eine direkte, nicht-allosterische Inhibition des Enzyms bewirken könnte.

Ein weiteres Beispiel für die Adressierung der LP mit niedermolekularen Substanzen stellen Phosphatidylinositoether-Lipidanaloga (PIAs) dar.^[99] Ursprünglich wurden PIAs als Akt-Inhibitoren entworfen, allerdings wurde auch beobachtet, dass sie zu Autophosphorylierung von MAPKs führen.^[100-101] Insbesondere wurde die Aktivierung von p38 α anhand von PIA-induzierter Apoptose gezeigt und später mit dem strukturell verwandtem Perifosin Ähnliches beobachtet.^[102] Die Kenntnis der mit den PIAs und Perifosin vergleichbaren chemischen Struktur von BOG als bekannter LiPoLi führten zur Annahme, dass diese ebenfalls in entsprechender Weise in die LP binden könnten. In diesbezüglichen Ko-Kristallstrukturen zeigt sich ein geringfügig abweichender Bindungsmodus für die Lipid-artigen Moleküle, in dem die Seitenkette von Trp197 zwar um ca. 90° aus der Tasche rotiert, die Indoleinheit im Vergleich zu BOG jedoch um fast 90° gedreht ist, sodass der Aminosäurerest von dem bindenden LiPoLi und His199 flankiert und eingeklemmt wird (Abb. 6E). Die Ausbildung von van-der-Waals-Wechselwirkungen der Kohlenwasserstoff-Kette im Inneren der Tasche und polarer Interaktionen in der Peripherie der LP entspricht im Wesentlichen dem beobachteten Muster, das aus den bereits bekannten Strukturen hervorgeht.

Insbesondere die Liganden-induzierte konformative Stabilisierung von His199 führt zu einer bemerkenswerten konformativen Änderung in der α EF/ α F-Schleife und knüpft an Beobachtungen und Hypothesen von Nolen *et al.* an.^[86] In weiterführenden Kristallisationsexperimenten, in denen Trp197 durch Ala ersetzt wurde, zeigte sich wiederum eine vollständige Schließung der Tasche, was einer räumlichen Verschiebung der α EF/ α F-Schleife von ca. 6-8 Å entspricht.^[99] In diesem Zustand kann die LP weder von „Pseudoliganden“ Trp197 und Met198 besetzt noch von externen LiPoLis adressiert werden. Die Autoren postulieren außerdem, dass aufgrund der Diversität der bekannten LiPoLis verschiedene, d.h. begünstigende oder tendenziell unvorteilhafte Konformationsänderungen induziert werden, die unterschiedliche Effekte auf die katalytische Aktivität haben könnten.

Eine weitere Klasse von niedermolekularen Substanzen, die in die LP binden, sind 4-Amino-2-arylchinazoline (Abb. 6F).^[103] Die zufällige Entdeckung in der Arbeitsgruppe Rauh geht auf Studien zu ATP-kompetitiven Inhibitoren für p38 α zurück, wobei für einige ko-kristallisierte Derivate Differenzelektronendichte nicht im aktiven Zentrum, sondern in einer definierten Bindetasche im MAPK *insert* gefunden wurde.^[104] Diese LiPoLis bestehen aus einem Chinazolinkern, der an 2-Position mit einem arylischen Strukturmotiv (i.d.R. Phenyl, Ph), versehen ist, in 4-Position einen Amin-verknüpften hydrophoben Substituenten trägt und in 7-Position ein primäres anilinisches Amin aufweist. In den Kristallstrukturen lassen sich charakteristische Wechselwirkungen wie die π - π -Stapelinteraktion zwischen dem Chinazolin-Grundgerüst und Trp197 sowie eine direkte WBB des 7-Amins zu Asp294 beobachten (PDB: 4DLI, 4DLJ).^[103] Die hydrophobe Einheit in 4-Position des Liganden bindet tief in die LP und Wasser-vermittelte WBBs werden zur Ser251-Seitenkette und dem Rückgrat von Ser251 und Lys249 ausgebildet.

Mit einem bestimmten Substitutionsmuster der Liganden konnte ebenfalls Elektronendichte in der ATP-Bindetasche gefunden werden. Allerdings können LiPoLis so modifiziert werden, dass sie eine exklusive Besetzung (gemessen an der Differenzelektronendichte) der LP aufweisen. Ähnlich wie in den Studien zu **2a** und **2b** wurde für die Charakterisierung der Chinazolin-basierten LiPoLis **3a,b** eine steigende Affinität mit wachsender Größe des 4-Substituenten beobachtet. Interessanterweise konnte kein direkter Effekt auf die enzymatische Aktivität der Kinase, weder inhibitorisch noch aktivierend, festgestellt werden.^[105]

Zusammenfassend wird in einem Großteil der publizierten Arbeiten zu LiPoLis neben der Funktion als allosterische Hemmstoffe eine Involvierung abseits der katalytischen Aktivität von p38 α postuliert. Hypothesen beziehen sich auf intra- oder intermolekulare Interaktionen, in denen bspw. PPIs eine Rolle spielen. Die genaue Aufklärung der an der Bindung von LiPoLis beteiligten Mechanismen, wie bspw. die Identifikation potentieller Wechselwirkungspartner der LP im physiologischen Kontext, stellt bis heute eine unbeantwortete Fragestellung dar. Zur Bearbeitung solcher chemisch-biologischer Aufgaben steht mittlerweile eine Vielzahl experimenteller Methoden zur Verfügung.

1.3 Technologien und Methoden in der Chemischen Biologie

Im Allgemeinen wird Chemische Biologie als die Wissenschaft bezeichnet, die mit Hilfe von chemischen Methoden versucht biologische Phänomene und Prozesse aufzuklären.^[106] Die Bandbreite der hierbei angewandten Methoden und Technologien wird durch die Vielzahl der hierzu beisteuernden Teildisziplinen ermöglicht. Wesentliche Meilensteine der Chemischen Biologie, wie u.a. die Sequenzierung und Synthese von DNA, der Einsatz bioorthogonaler Chemie in lebenden (Test-)Systemen oder maßgebliche Beiträge zur Wirkstoffforschung und -entwicklung, hätten nicht ohne das Zusammenspiel der Expertisen aus bspw. organischer Chemie, Molekularbiologie und Biochemie oder System- und Strukturbiologie erreicht werden können.^[107] Zum Beispiel schafft die auf chemo-informatische und kristallographische Vorarbeiten beruhende struktur-basierte Entwicklung und Synthese von niedermolekularen Sonden oder Peptiden die Voraussetzung für die Generierung von Substanzbibliotheken. Mit Hilfe von Assay- und Screening-Systemen können letztere getestet werden und sind potentiell in der Lage spezifische biologische Ereignisse sichtbar zu machen und auf diese Weise funktionelle Implikationen aufzuzeigen.^[108-112]

1.3.1 Biologische und chemische Perturbationsanalysen

Als Perturbation wird die Störung eines biologischen Systems auf Ebene des Genoms bzw. von Genprodukten bezeichnet, die zu einer Veränderung im beobachteten Phänotyp führen kann.^[113] Die biologische oder chemische Induktion von Perturbationen kann genutzt werden, um Informationen über Komponenten zellulärer Prozesse, insb. der Signaltransduktion, und deren molekulare Interaktionen zu erhalten.

Praktisch kann dies mit Hilfe von genetischen Methoden, wie z.B. das gezielte Einfügen/Entfernen von codierenden DNA-Abschnitten (*knock-in/-out*) mittels Transkriptionsaktivator-artiger Effektor nukleasen^[114] oder dem CRISPR/Cas9 (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9*)-System^[115] sowie dem Abbau von *messenger*-RNA nach Transkription (*knock-down*) mittels *small interfering*-RNA^[116] erreicht werden. Durch diese Art von Perturbationen wird eine dauerhafte Reduktion des Expressionslevels der Zielstruktur bewirkt, sodass Auswirkungen bei Verlust des Genprodukts beobachtet werden, die einen Informationen über bis dahin unbekannte oder unerforschte Proteine gewonnen werden können.^[117]

Diesen Methoden gegenüber stehen chemische Perturbationsansätze, die sich i.d.R. Substanzen bedienen, die mit dem bereits exprimierten Zielprotein interagieren und es funktionell stilllegen. Zu solchen Substanzen zählen Nukleinsäure- oder Peptid-basierte Aptamere^[118] sowie insb. kleine chemische Moleküle wie bspw. Enzyminhibitoren. Beide Herangehensweisen erfordern allerdings gewisse Voraussetzungen in Form von Vorkenntnissen zur Zielstruktur um deren erfolgreiche Adressierung oder die Herstellung von benötigten Reagenzien zu ermöglichen.

Die genannten Beispiele der Genomchirurgie bedienen sich technisierter, maßgeschneiderter Nukleasen, wobei als resultierender Endeffekt das adressierte Genprodukt nicht mehr hergestellt wird. Im Vergleich dazu ermöglicht die Verwendung von chemischen Sonden die Untersuchung von gerüstgebenden Funktionen am nicht mehr funktionellen Protein, da es noch „physisch vorhanden“ ist. Weitere Vorteile dieser Art der Perturbation liegen in der generellen Reversibilität der Adressierung durch niedermolekulare Substanzen sowie der Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Beziehungen aufzustellen und den induzierten Phänotyp konzentrationsabhängig zu analysieren.^[119] Darüber hinaus ist bei der Störung mit chemischen Sonden gegenüber genetischen Methoden der eintretende Effekt deutlich schneller zu beobachten. Transport und Transfektion (wie bspw. das Passieren von Zellmembranen) können in manchen Fällen Herausforderungen darstellen, die jedoch mittels chemischer Optimierung oder Formulierungen der eingesetzten Substanzen bewältigt werden können.^[120-121]

1.3.2 Beispiele für Ansätze in der Chemischen Genetik

Grundsätzlich wird zwischen zwei Arten von chemisch-genetischen Ansätzen unterschieden, die einen Rückschluss auf den hervorgerufenen Phänotyp zulassen: Vorwärts- und rückwärts-gerichtete Chemische Genetik (*forward* und *reverse chemical genetics*). In vorwärts-gerichteten Strategien wirken die eingesetzten Substanzen als Auslöser einer bestimmten (biologischen) Reaktion, die analysiert werden kann. Demgegenüber stehen rückwärts-gerichtete Methoden, mittels derer durch Einführen eines mutierten Allels des Zielproteins eine spezifische Sensitivität gegenüber individuell konzipierter Moleküle und eine entsprechende Sondierung erlaubt wird.^[122]

Ein prominentes Beispiel für einen solchen Ansatz stellt die sogenannte *bump-and-hole*-Strategie dar. In der Vergangenheit wurde hiermit bereits mehrfach erfolgreich die Identifikation von Substraten von Proteinkinasen demonstriert, die mit klassischen

genetischen Methoden aufgrund der hohen strukturellen Homologie der aktiven Zentren nur schwierig zu untersuchen sind, da in *knock-out*-Experimenten oftmals eine funktionelle Kompensierung des getroffenen Zielproteins bewirkt wird. Mit Hilfe strukturell modifizierter und radioaktiv markierter ATP-Analoga ($\gamma^{32}\text{-P}$) und einer entsprechend genetisch maßgeschneiderten Zielkinase, die eine Mutation in der hochkonservierten Türsteher-Position trägt, kann der Transfer des Phosphats auf Substrate nachvollzogen werden.^[123-125] Hierzu besitzt das ATP-Analog einen geeigneten, zum eingebrachten Zielprotein komplementären Substituenten, der eine durch Einführung einer sterisch weniger anspruchsvollen Aminosäure (i.d.R. Gly/Ala) erzeugte Kavität besetzt und darüber hinaus die Kinaseaktivität nicht beeinflussen darf sowie die Wildtyp (WT)-Variante der Kinase aussparen muss.^[126]

Dieses Konzept wurde bezüglich chemischer Perturbationsstudien ebenfalls auf Allelspezifische Inhibition der manipulierten Zielstrukturen übertragen, wobei artifizielle Sensitivität bzw. Affinität gegenüber dem jeweiligen Protein ausgehend von zuvor unspezifischen Hemmstoffen erzielt wurde.^[127] In ähnlicher Form fand die Strategie Anwendung für Transkriptionsfaktoren mit gesteigerter Nukleotid-Spezifität und wurde später bzgl. der Identifikation von Kinasesubstraten und -funktionen von Shokat und Mitarbeitern methodisch etabliert (Abb. 7A,B).^[128-129] Ein weiteres gepaartes bzw. beidseitiges Selektionselement neben der Mutanten/Liganden-Kompatibilität stellt die Kombination mit irreversibel bindenden Inhibitoren dar, d.h. die Adressierung strukturell einzigartiger oder mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführter Cysteine. Solche kovalenten Sondenmoleküle können weiterhin mit Reporterfunktionen versehen werden (bspw. Affinität-*tags* oder Fluorophoren), um eine detektierbare Signalgebung (*read-out*) zu ermöglichen.^[130]

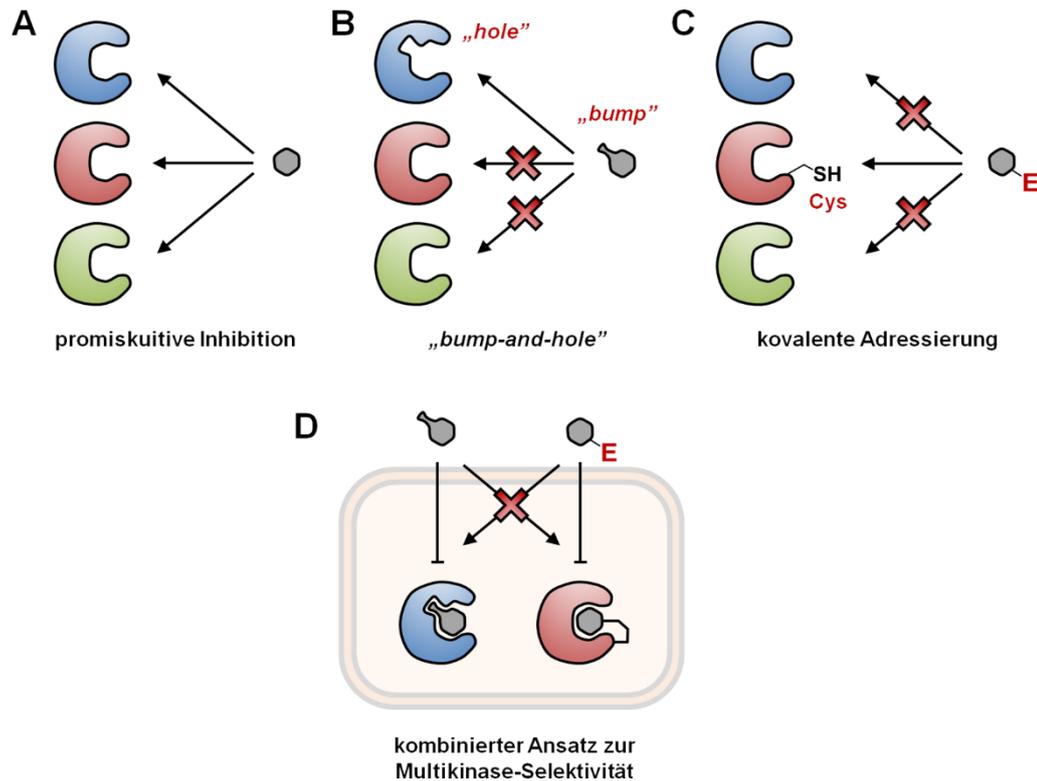


Abb. 7: Chemisch-genetische Strategien zur selektiven Adressierung von Kinasen. A) Unselektive, promiske Inhibition mit konventionellen Kinaseinhibitoren; B) *bump-and-hole*-Ansatz: Selektive Adressierung eines Analog-sensitiven Allels („hole“) mit einem maßgeschneiderten Inhibitor („bump“); C) kovalente Adressierung Cys-tragender Kinasen mit Elektrophil (E)-tragenden Inhibitoren; D) Multikinase-Selektivität durch orthogonale Adressierung zweier Kinasen mittels Kombination der vorgestellten Methoden. (Abb. nach Kung *et al.*)

So konnte in entsprechenden Studien bspw. gezeigt werden, dass im direkten Vergleich (für die gewählte Zielkinase) durch Cys-Mutation die katalytische Aktivität weniger (negativ) beeinflusst wird als durch Einführung eines Analog-sensitiven Allels (Türsteher-Position). Ein artifizielles Cystein an gegebener Position dient als strukturelles Merkmal, um die Zielkinase gegenüber speziell entwickelter Elektrophil-tragender Inhibitoren zu sensibilisieren, wobei mit kovalenter Bindung eine Erhöhung von Potenz und Selektivität einhergehen sollte (Abb. 7C).^[131-132] Ein weiterer Vorteil der beiden Ansätze liegt in ihrer Orthogonalität zueinander, d.h. zwei bestimmte Kinasen können gezielt und unabhängig voneinander inhibiert werden, was kombinatorische Studien zu Multikinase-Signalwegen ermöglicht (Abb. 7D).^[133]

1.3.3 Proteinidentifikation und -charakterisierung

Die zuvor genannten Methoden ermöglichen die Induktion von bestimmten Phänotypen durch (funktionelle) Perturbation der Zielstrukturen und stellen somit den Ausgangspunkt bzw. hilfreiche Werkzeuge für weiterführende Studien dar. Zur Identifikation und Charakterisierung von entsprechenden Proteinen, insb. im Hinblick auf PPIs, existiert ein vielfältiges Arsenal an biologischen Techniken.

Zunächst muss hierfür bspw. in Zellexperimenten oder durch Behandlung mit Lysaten die Bildung von Protein-Komplexen zwischen dem zu untersuchenden „Köder“ (*bait*) und seinen als „Beute“ (*prey*) bezeichneten Interaktionspartnern erfolgen sowie ein späterer Nachweis ermöglicht werden. Letzteres kann im Allgemeinen mittels primärer Antikörper (Abs) gegen die bekannte Zielstruktur oder ein zuvor eingeführtes detektierbares Epitop in Form eines *tags* (His, GST, FLAG, CBD, etc.) realisiert werden. Das resultierende komplexe Probengemisch wird anschließend entweder direkt analysiert oder zunächst biochemisch getrennt (Gelelektrophorese, Chromatographie, etc.), um eine Reinigung oder sogar Isolation von Köder/Beute-Komplex(en) zu erzielen.

Beispielsweise stellen Co-Immunpräzipitation^[134] und andere *pull-down*-Experimente Möglichkeiten dar, Wechselwirkungspartner eines bestimmten Proteins ausfindig zu machen, indem dieses entweder über Abs präzipitiert oder über einen Affinitäts-*tag* an Polymerkugeln (*beads*) immobilisiert wird.^[135] Mit Hilfe von Far-Western Blots erfolgt der Nachweis von PPIs über gelelektrophoretische Auftrennung eines Lysats, Übertrag auf eine Membran und darauffolgende Inkubation mit dem Köder, welcher schließlich über spezifische Abs oder Markierungen detektiert werden kann.^[136] Die Anwendbarkeit dieser Methoden hängt von der Stärke der zu Grunde liegenden Wechselwirkung ab, die entweder stabil oder transient sein kann, wobei viele wesentliche PPIs kurzzeitiger Natur und deswegen eher schwach sind.^[137-138] Eine Identifikation kann in solchen Fällen mittels *cross-linking*^[139] oder Markierungs-Reagenzien^[140] realisiert werden. Ein weiterer prominenter Ansatz zur Untersuchung von PPIs stellt das Hefe-Zwei-Hybrid-System dar, welches viele direkte Vorteile bietet, da auch weniger starke Wechselwirkungen *in vivo* nachgewiesen werden können und keine weiteren Reagenzien oder vorherige Reinigung erforderlich sind. Allerdings wird dabei vorausgesetzt, dass Proteine in Hefe exprimiert und korrekt gefaltet werden. Außerdem existieren Limitierungen in der Detektion falsch positiver Ergebnisse aufgrund veränderter Proteinoberflächen oder Auslösen der Transkription ohne tatsächlicher Assemblierung eines Komplexes.^[141]

Neben Anwendungen in (chemo-)proteomischen Fragestellungen avancierte die vielseitig einsetzbare Massenspektrometrie (MS) zu einer unentbehrlichen Technologie in der Identifikation und Validierung von PPIs.^[142] Beispielsweise liefern Tandem-MS (MS/MS)-Studien durch Erzeugung, Isolation und Detektion mehrerer Molekülionenfragment-Generationen Masseninformatoren, die zur Sequenzaufklärung von Peptiden herangezogen werden können.^[143] Fundamentale Voraussetzung für eine erfolgreiche Identifizierung gefundener Proteine auf Basis genannter Daten oder eines Peptidmassen-Fingerprints^[144] stellen bioinformatische Verfahren und der Zugang zu entsprechenden Datenbanken dar. Die Kombination von biochemischer Tandem-Affinitäts-Reinigung von Protein-Komplexen und instrumenteller MS-Analytik stellt einen leistungsfähigen Ansatz zur Identifikation von PPIs dar, indem die Signalqualität durch signifikante Reduktion des Hintergrund-Rauschens, d.h. ungewünschte Proteine in der Probe, verbessert und die anschließende Auswertung erleichtert wird.^[145] Zusätzlich können quantitative MS-Studien bspw. über isobare Markierungs- (iTRAQ)^[146] oder stabile Isotopen-Labeling-Ansätze (SILAC)^[147] durchgeführt werden. Bezüglich Aktivitäts-basierten Protein-Profilings^[148] und Substanz-zentrierter chemischer Proteomik^[149] wird (quantitative) MS zur (potentiell proteomweiten) Identifikation der gefundenen Proteine genutzt.

Zur Charakterisierung von (bio-)molekularen Interaktionen existieren u.a. eine Vielzahl an biophysikalischen Methoden, wie z.B. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie, Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), Thermal-*Shift*-Assay (TSA), *Microscale*-Thermophorese (MST) oder Bio-*Layer*-Interferometrie (BLI), welche (zum Teil) an entsprechender Stelle dieser Arbeit erläutert werden (Kapitel 3.3).

Als ein weiteres zentrales Element im Repertoire chemisch-biologischer Methoden liefert die (Protein-)Kristallographie wertvolle Informationen bzgl. Einsicht in die räumliche Struktur (makro-)molekularer Komplexe, bspw. zwischen Liganden (bzw. Inhibitoren) und Enzymen oder zweier Proteine, auf atomarer Ebene und bietet somit eine Grundlage für die Wirkstoffforschung sowie die Identifikation und Charakterisierung entsprechender Interaktionen.^[150]

1.4 Proteinkristallographie

Anders als von der Lichtmikroskopie bekannt, bedarf es zur Auflösung von Strukturen im atomaren Detail Wellenlängen von etwa 1 Å, d.h. Röntgenstrahlen. Da es praktisch bislang nicht möglich ist ein Röntgenstrahlen-Streumuster zur Detektion zu fokussieren, muss auf eine computergestützte, mathematische Auswertung von Diffraktionsbildern zurückgegriffen werden. Die von einem einzelnen Molekül verursachte Beugung wäre allerdings zu schwach, um gemessen werden zu können, sodass stattdessen hochgeordnete, dreidimensionale Anordnungen von (gleichen) Molekülen in Form eines Kristalls benötigt werden, um das Signal zu amplifizieren. Ein Kristall kann demnach mit einem dreidimensionalen Beugungsgitter für Röntgenstrahlen verglichen werden, welches zu Interferenzen im Diffraktionsmuster führt, das auf einem entsprechenden Detektor als eine Reihe von einzelnen Signalen (Reflexen) erscheint. Jedes Atom trägt dabei zu der Intensität eines jeden Reflexes im Beugungsmuster bei. Da Röntgenstrahlen an den Elektronen der Moleküle im Kristall gebeugt werden, führt die Auswertung eines Datensatzes von Diffraktionsbildern zu einer dreidimensionalen Kartierung der Elektronenverteilung der untersuchten Struktur, einer sogenannten Elektronendichte(-karte). Mathematisch kann das Beugungsexperiment als Fouriertransformation (I) beschrieben werden.^[151]

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (I)$$

$\rho(x, y, z)$: Elektronendichte; V : Volumen der Einheitszelle; h, k, l : Miller-Indices;

$|F_{hkl}|$: Strukturfaktoramplituden; α_{hkl} : Phasen der Strukturfaktoren

Die Strukturfaktoren F_{hkl} werden durch Amplitude ($|F_{hkl}|$) und Phase (α_{hkl}) definiert, die für jeden Reflex bekannt sein müssen, um mittels reverser Fouriertransformation wieder in eine Elektronendichtekarte umgerechnet werden zu können. Allerdings kann nur die Amplitude experimentell direkt bestimmt werden, während die Phaseninformation verloren geht, was als Phasenproblem bezeichnet wird.^[152] Für das erfolgreiche „Lösen“ einer Kristallstruktur müssen ausreichend gute Phasen-Informationen erhalten werden, um eine interpretierbare Elektronendichtekarte zu berechnen.

Im Folgenden wird das Kristallisations-Verfahren der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen (im Gegensatz zum „sitzenden Tropfen“) beschrieben (Abb. 8A). Hierbei befindet sich in einer mit einem Deckglas gasdicht verschlossenen Kavität eine Reservoirlösung, die im Allgemeinen Fällungsmittel (z.B. Polyethylenglykol (PEG), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und Puffer verschiedener pH-Werte sowie ggf. Additive (Detergenzien, Metallionen, etc.) enthält. Auf die Deckglas-Innenseite wird ein (konzentrierter) Proteintropfen einer möglichst reinen und homogenen Präparation pipettiert und mit Reservoirlösung versetzt. Getrieben durch das Bestreben nach Konzentrationsausgleich findet über Dampfdiffusion eine stetige Anreicherung des Fällungsmittels im Kristallisationstropfen statt. Während dieses Prozesses wird auch das Protein konzentriert und erreicht unter begünstigenden Bedingungen (Temperatur, Proteinkonzentration, Reservoirzusammensetzung, pH, Verhältnis Protein/Reservoir, etc.) einen Zustand der „Supersaturierung“ (Übersättigung) und wird in Form von Kristallen, bzw. Kristallisationskeimen aus der Lösung getrieben (Abb. 8B).^[153] Allerdings können während des Vorgangs auch Präzipitation des Proteins oder die Entstehung von Salzkristallen auftreten bzw. die Tropfen klar verbleiben.

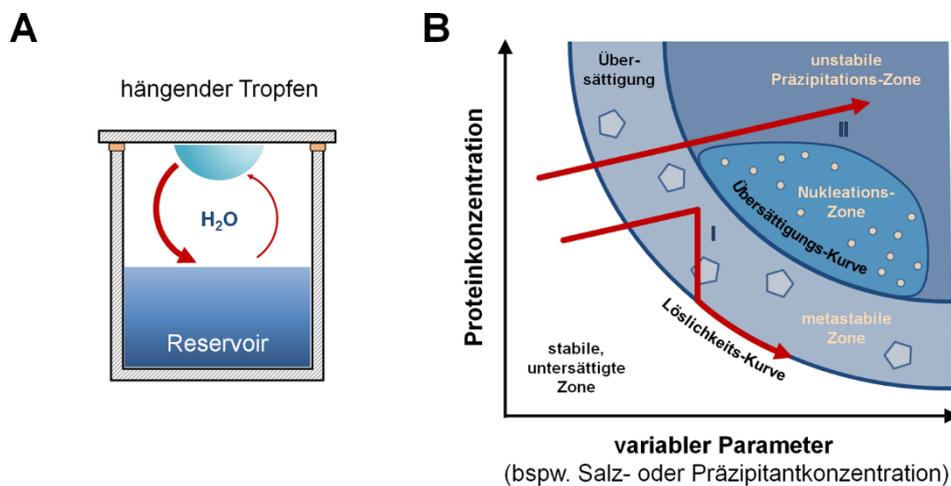


Abb. 8: A) Kristallisationsexperiment im hängenden Tropfen; B) Phasendiagramm der Proteinkristallisation in Abhängigkeit variabler Parameter; I: Direkter Übergang von der untersättigten Zone in die instabile Zone führt zur Präzipitation des Proteins; II: Erreichen der metastabilen Zone führt zur Kristallisation bzw. Keimbildung und einem folglichem Abfall der Proteinkonzentration in Lösung.

Nach erfolgreicher Kristallisation werden Kristalle mit einer Nylonschleife (*loop*) aus dem Tropfen präpariert und in flüssigem N_2 gekühlt, nachdem sie zuvor zum Schutz vorm Gefrieren ggf. in eine kryogene Lösung getaucht wurden (Abb. 9A). Der *loop* lässt sich über Magneten an einen Goniometer-Kopf montieren, welcher die präzise Ausrichtung des Kristalls im Röntgenstrahl ermöglicht. Unter fortwährendem N_2 -Kaltluft-Strom wird der Kristall dann mit kollimierten Röntgenstrahlen beschossen, die in einem entsprechenden Generator als charakteristische $Cu-K_{\alpha}$ -Strahlung des Anodenmaterials entstehen. In der Röntgenstrukturanalyse wird vermehrt von Synchrotron-Strahlenquellen Gebrauch gemacht, da die hier beim Abbremsprozess beschleunigter Elektronen erzeugte, hochenergetische Strahlung u.a. eine schnellere Aufnahme von Daten gewährleistet und zu besseren Auflösungen führt.^[154]

Röntgenstrahlen treffen nach Ablenkung durch den Kristall auf einen Detektor und erzeugen ein charakteristisches Beugungsmuster (Abb. 9B). Ein einzelnes Diffraktionsbild reicht bereits aus, um Kenntnis über Raumgruppe, Einheitszelle sowie ggf. Auflösung des Kristalls zu gewinnen. Die Aufnahme eines Datensatzes erfolgt abhängig von der Kristallsymmetrie durch inkrementelle Drehung des Kristalls im Röntgenstrahl und anschließende computergestützte Auswertung der gemessenen Reflexe (Datenprozessierung).

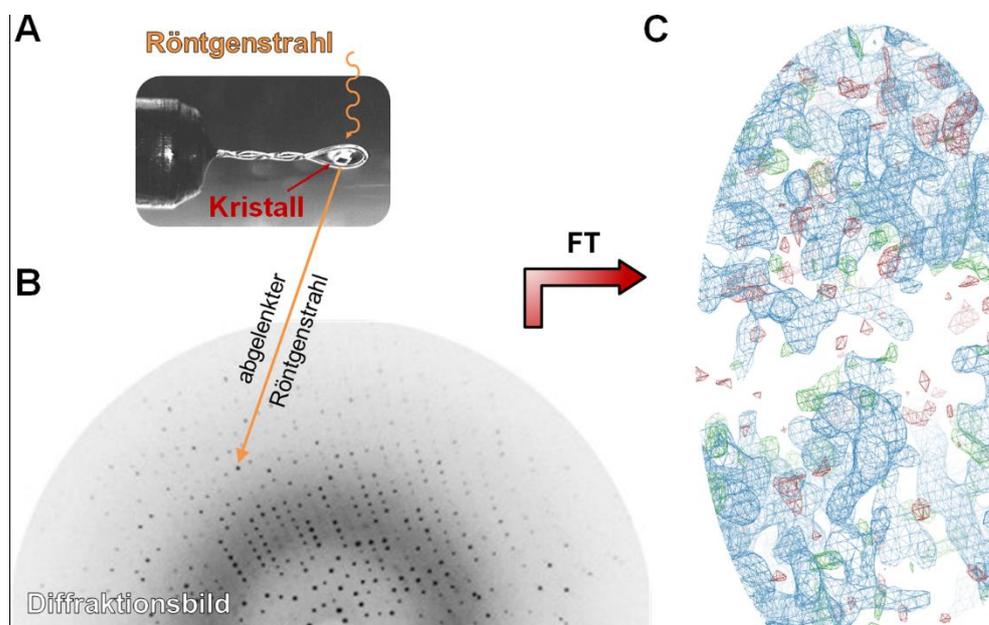


Abb. 9: Vom Kristall zum Strukturmodell. A) Sich in Schleife befindender Proteinkristall wird mit Röntgenstrahlen beschossen; B) an den Elektronen des Kristalls abgelenkte Röntgenstrahlen erzeugen ein aus Reflexen bestehendes Diffraktionsbild; C) Elektronendichte (F_o-F_c : grün (positiv), rot (negativ); $2F_o-F_c$: blau) wird nach Lösen des Phasenproblems mittels Fourier-Transformation berechnet (Bilder von: <https://www.qiagen.com/no/shop/sample-technologies/protein/protein-crystallization/>, 21.02.2017, 15:50 h; www.slideshare.net/ChristineMeyer6/christine-meyer-senior-seminar-presentation, 21.02.2017, 15:55 h; <http://journals.iucr.org/j/issues/2003/01/00/ks0174/ks0174fig3.html>, 21.02.2017, 16:00 h).

Experimentell gelingt das „Lösen“ des Phasenproblems grundlegend, indem Informationen über die Zielstruktur zugänglich gemacht werden. Eine häufig verwendete Methode stellt der molekulare Ersatz dar, wobei die Struktur(koordinaten) eines ähnlichen Proteins, dem (Sequenz-)Homologiemodell, mittels Rotation und Translation mit den experimentellen Daten zur Übereinstimmung gebracht und die resultierenden Phasen des Modells genutzt werden.^[155] Das Fehlen eines Startmodells verkompliziert eine Lösung der Struktur, sodass bspw. elektronenreiche „schwere Atome“ an verschiedenen Positionen im Protein implementiert werden, die messbare Unterschiede in den Reflexintensitäten verursachen ((multipler) isomorpher Ersatz).^[156] Alternativ kann sich (zusätzlich) das anomale Streuverhalten bestimmter Atome zu Nutze gemacht werden, um Phaseninformationen zu erhalten, indem ein oder mehrere aufeinanderfolgende Datensätze desselben Kristalls bei Wellenlängen im Bereich der Absorptionskante (des anomalen Streuers) aufgenommen werden (*single- oder multiwavelength anomalous dispersion*), wobei oftmals Selen, bspw. in Form von Selenomethionin, Anwendung findet und darüber hinaus Synchrotronstrahlung erfordert wird.^[157] Sind sowohl Amplituden und Phasen der Strukturfaktoren bekannt, kann mittels der reversen Fouriertransformation schließlich eine Elektronendichte(karte) berechnet werden (Abb. 9C).

Die Interpretation der Elektronendichte erfolgt anschließend in Form eines Modells aus Atom-Koordinaten, das der Proteinsequenz entsprechend aus Aminosäure-„Bausteinen“ aufgebaut wird. Die erstellte Struktur wird in einem Abgleich mit den experimentell bestimmten Daten verfeinert und auf diese Weise optimierte Phasen kalkuliert. Diese können genutzt werden, um deutlichere Elektronendichtekarten und damit wiederum bessere Modelle zu erhalten. Dabei werden wiederholt Zyklen von Modellbau und Verfeinerung durchlaufen bis keine Verbesserung mehr erzielt wird. Eine Differenzelektronendichte wird auf Basis der Unterschiede zwischen berechneten und beobachteten Strukturfaktor-Amplituden sowie den bestimmten Phasen erstellt und spiegelt Unterschiede zwischen tatsächlicher Struktur und dem derzeitigen, zu verfeinernden Modell wieder (F_o-F_c -Karte). Bereiche, die im Modell fehlen, werden dabei als positive Differenz dargestellt, während jene Bereiche, die (fälschlicherweise) eingebaut wurden, jedoch nicht mit der experimentell bestimmten Struktur übereinstimmen, negative Differenz verursachen. Als weitere Differenzelektronendichte repräsentiert eine $2F_o-F_c$ -Karte fehlende oder überzählige Atome als geringere bzw. erhöhte Dichte und zeigt eine Kontur des Moleküls.^[158]

Bestimmte kristallographische Parameter dienen als wichtige Kenngrößen bei der Datensatz-Prozessierung und hauptsächliches Maß für die Qualität einer Kristallstruktur nach Verfeinerung.^[159] Als Auflösung der Diffraktionsdaten werden die minimalen Abstände der Kristallgitter-Ebenen bezeichnet, die eine noch messbare Streuung der Röntgenstrahlen gewährleisten und somit über das Detail der Elektronendichte(karte) bestimmen. Das gemittelte Verhältnis von Reflex-Intensität und Fehler (Signal-zu-Rauschen) $\langle I/\sigma(I) \rangle$ sollte oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes (i.d.R. > 2.0) liegen und definiert die Auflösungsgrenze, mit $\sigma(I)$ als Unsicherheit der Messungen. Weitere relevante Parameter in diesem Zusammenhang sind u.a. R_{merge} (oder R_{sym} , R_{int}) bzw. R_{meas} ^[160], Redundanz (oder Multiplizität) und die Vollständigkeit eines Datensatzes.

Der R-Faktor (R_{work}) drückt die Übereinstimmung der beobachteten Reflex-Amplituden mit den berechneten Amplituden des generierten Modells während der Verfeinerung aus und ist somit ein Indikator für die Abweichung des Modells von der tatsächlichen Position der Atome im Kristall. R_{free} berechnet sich analog zu R_{work} , allerdings nur für einen kleinen Prozentsatz zufällig ausgewählter Reflexe, die vom kompletten Verfeinerungsprozess des Modells ausgeschlossen wurden, und dient somit als Maß für Überinterpretation der experimentellen Daten.^[161] Die sogenannten B-Faktoren geben Auskunft über thermische Dynamik eines Atoms, wobei flexiblere Bereiche i.d.R. nicht gut aufgelöst sind und in der Struktur zu erhöhten Temperaturfaktoren führen.^[159] Zur Validierung des erstellten Modells wird weiterhin ein Ramachandran-Plot herangezogen, eine Auftragung der Torsionswinkel-Paare φ/ψ des Protein-Rückgrats gegen deren statistisch zu erwartende Verteilung.^[162] Die Deponierung finaler Strukturmodelle erfolgt in die öffentlich zugängliche *Protein Data Bank* (PDB).^[163-164]

2 Motivation und Zielsetzung

Die hauptsächliche Bedeutung von Proteinkinasen wird traditionell dem katalytischen Phosphattransfer, u.a. als „molekularer Schalter“ in Signaltransduktionswegen, und der damit verbundenen Beteiligung in der Entstehung vielzähliger Krankheiten, aus der sich eine klinische Relevanz ableitet, zugesprochen. Allerdings werden zunehmend spezielle, Kinase-unabhängige Funktionen dieser Enzyme aufgedeckt, insb. als gerüstgebende Komponenten in Multi-Protein-Komplexen, von denen angenommen wird, dass sie in Anzahl und Wichtigkeit die bislang vornehmlich beschriebene biologische Rolle übersteigen. Aus diesem Grund existiert ein generelles Interesse an der Identifikation von Oberflächenregionen oder Bindungstaschen, die in der Ausbildung von PPIs oder der Bindung von Liganden involviert sind. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind meistens nicht trivial und kompliziert aufzuklären, sodass bspw. molekulare Sonden wertvolle Hilfsmittel darstellen, entsprechende Fragestellungen nach nicht-katalytischen Kinase-Funktionen zu beantworten.

Vor Kurzem wurden im Rahmen von Ko-Kristallisationsexperimenten im Arbeitskreis Rauh die 7-Amino-2-phenylchinazoline **3a,b** als Liganden einer lipophilen Bindetasche in der MAPK p38 α beschrieben. Im Vergleich zu Strukturen in Abwesenheit solcher LiPoLis stabilisieren diese Substanzen durch die Ausbildung charakteristischer Wechselwirkungen innerhalb der LP eine spezifische Konformation eines Trp-Restes (Trp197) innerhalb der Tasche. In Vorarbeiten konnte allerdings gezeigt werden, dass in Gegenwart der Chinazoline kein direkter Einfluss auf die katalytische Aktivität der Kinase zu beobachten ist. Trotz diverser Hypothesen zur biologischen Rolle der LP in p38 α ist die genaue Funktion der Tasche bis heute noch nicht vollständig verstanden. Die beschriebenen Liganden könnten hierbei als Hilfsmittel in entsprechenden Studien dienen und somit das Verständnis möglicher Implikationen, bspw. die Rekrutierung von Substraten oder feinregulierender Effektoren bzw. die Involvierung in komplexeren Prozessen, fördern.

In dieser Arbeit soll ausgehend von den bekannten LiPoLis **3a,b** im Komplex mit p38 α zunächst eine fokussierte Substanzbibliothek von 2-Arylchinazolin-Derivaten modelliert, synthetisiert und anschließend biophysikalisch charakterisiert werden. Insbesondere unter Etablierung und Anwendung eines geeigneten SPR-Assays soll die Verfolgung und Untersuchung von Bindeereignissen in Echtzeit ermöglicht werden. Als orthogonale Testsysteme kämen bspw. TSA, MST oder BLI in Frage. Die Validierung der Struktur-basierten Entwicklung soll mit Hilfe der Analyse von Ko-Kristallstrukturen realisiert werden. Ausgehend von einem ersten Synthese- und Charakterisierungszyklus sollen Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet und relevante, Affinitäts-vermittelnde Strukturelemente weiterhin optimiert werden, sodass schließlich für den Einsatz als molekulare Sonden geeignete Liganden generiert werden.

Hierfür stellt die Entwicklung eines chemisch-genetischen, kovalenten Ansatzes eine attraktive Alternative zur Adressierung mit reversiblen LiPoLis dar, da eine in diesem Zusammenhang vorteilhafte maximal andauernde Besetzung der LP erzielt werden könnte. Die Verwirklichung eines solchen artifiziellen Systems umfasst die Planung und Synthese von Elektrophil-modifizierten Liganden sowie Konzeptionierung und Expression Cystein-tragender p38 α -Mutanten und einen abschließenden Nachweis einer kovalenten Bindungsknüpfung mittels MS und Ko-Kristallisation.

Eine Weiterentwicklung der Parentalsubstanzen **3a,b** zu einsatzfähigen Sondenmolekülen legt somit den Grundstein für *in vitro*- und *in vivo*-Perturbation der Kinase und bereitet den Weg für vertiefende Studien zur Aufklärung der biologischen Funktion der LP in p38 α .

In einem weiteren Teil der Arbeit sollen strukturbiochemische Untersuchungen von Kinaseinhibitoren der MAPK p38 α durchgeführt werden. Zum einem könnten entsprechende Ko-Kristallisationen Erklärungen für experimentell beobachtete Besonderheiten liefern, wie bspw. die außerordentliche Verweildauer ausgewählter Skepinone-L-Derivate am Enzym. Des Weiteren sollen Protein-kristallographische Analysen herangezogen werden, um den Bindungsmodus neuartiger Liganden aufzuklären und die Interpretation von SAR-Profilen zu ermöglichen.

3 Liganden der lipophilen Bindetasche in p38 α

3.1 Struktur-basierte Entwicklung von LiPoLis

Zunächst sollte das Design einer fokussierten Bibliothek von 2-Arylchinazolin-basierten LiPoLis auf Grundlage von Ko-Kristallstrukturen der Parentalverbindungen **3a,b** im Komplex mit der Zielkinase p38 α erfolgen. Die Analyse der entsprechenden Komplexe zeigte die in Kapitel 1.2.2 beschriebenen Interaktionen der Liganden innerhalb der Bindetasche, die im Rahmen der vorzunehmenden Derivatisierung beibehalten werden sollten. Dabei handelte es sich im Wesentlichen um eine π - π -Stapelwechselwirkung mit der Seitenkette von Trp197 im Zentrum der LP, einer direkten WBB mit Asp294 und der Besetzung einer hydrophoben Untertasche durch einen größeren lipophilen Rest in 4-Position des Chinazolins (Abb. 6F). Unter Beibehaltung des chemisch auf diversen Wegen zugänglichen und modifizierbaren Grundgerüsts wurde der über das 4-Amin verknüpfte Substituent, der Lösungsmittel-exponierte Phenylring in 2-Position und die Region um das primäre Amin in 7-Position für potentielle Derivatisierungen als geeignet postuliert (Abb. 10).

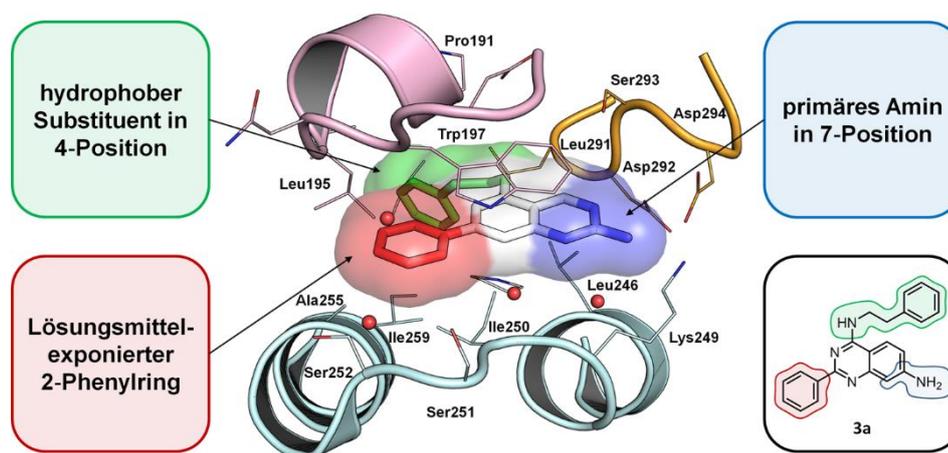


Abb. 10: Analyse der Ko-Kristallstruktur von **3a** im Komplex mit p38 α hinsichtlich der Generierung einer fokussierten LiPoLi-Substanzbibliothek. Folgende geeignete Derivatisierungspositionen wurden demnach postuliert: 1) Die 4-Position (grün), an der ein größerer lipophiler Rest sitzt und tief in eine hydrophobe Untertasche der LP bindet; 2) der Phenylring in 2-Position (rot), der dem Solvens zugewandt ist und eine Einführung Löslichkeit-vermittelnder Gruppen ermöglicht; 3) die 7-Position und direkt benachbarte Stellen am Chinazolin-Grundgerüst (blau), wo eine Möglichkeit zur Interaktion mit vornehmlich polaren Aminosäureseitenketten in der Peripherie der Bindetasche gegeben ist.

Ein wesentlicher Schwerpunkt wurde auf die Variation des Restes in 4-Position gelegt, da dieser aufgrund der zahlreichen van-der-Waals-Wechselwirkungen tief im Inneren der LP einen wesentlichen Beitrag zur Bindungsaffinität der Liganden beitragen könnte. Aus diesem Grund wurden als Syntheseziel diverse Substituenten, die sich in Form und Größe, bspw. durch Einführung von Bioisosteren^[165] sowie im Fluorierungsmuster von Aromaten unterscheiden sollten, ausgewählt (Abb. 11). So wurden zum Beispiel Linkerlängen zu den in dieser Position i.d.R. befindlichen Arylgruppen variiert und Phenyle durch Thiophene ersetzt. Die Substitution von Wasserstoffen durch ähnlich große Fluoratome an Aromaten ermöglicht die Untersuchung des Einflusses erhöhter Lipophilie oder Elektronegativität.^[166] Außerdem stellen Fluorierungen eine Möglichkeit dar, Halogen-Bindungen zu in der Nähe befindlichen Elektronenakzeptoren^[167], wie z.B. Carbonylfunktionen des Proteinrückgrats, auszubilden oder die metabolische Stabilität von Wirkstoffen an leicht oxidierbaren Positionen zu verbessern^[168].

Des Weiteren wurden LiPoLis auf Basis von Modellierungsstudien entworfen, die einerseits zu einem „Hybrid“ aus dem Chinazolin-Grundgerüst und Strukturelementen von 4-FPP (**3k**) führten, mit der Absicht durch Kombination zweier bekannter Binder einen vorteilhaften Effekt auf die Ligandenaffinität erzielen zu können. Desweiteren wurde ein Ligand mit verlängertem Cyclopropylmethyl-Rest am arylischen Substituenten in 4-Position (**3l**) designt, um potentiell eine möglichst effiziente Ausnutzung des Raumes in der hydrophoben Untertasche der LP zu bewirken (Abb. 12A,B).

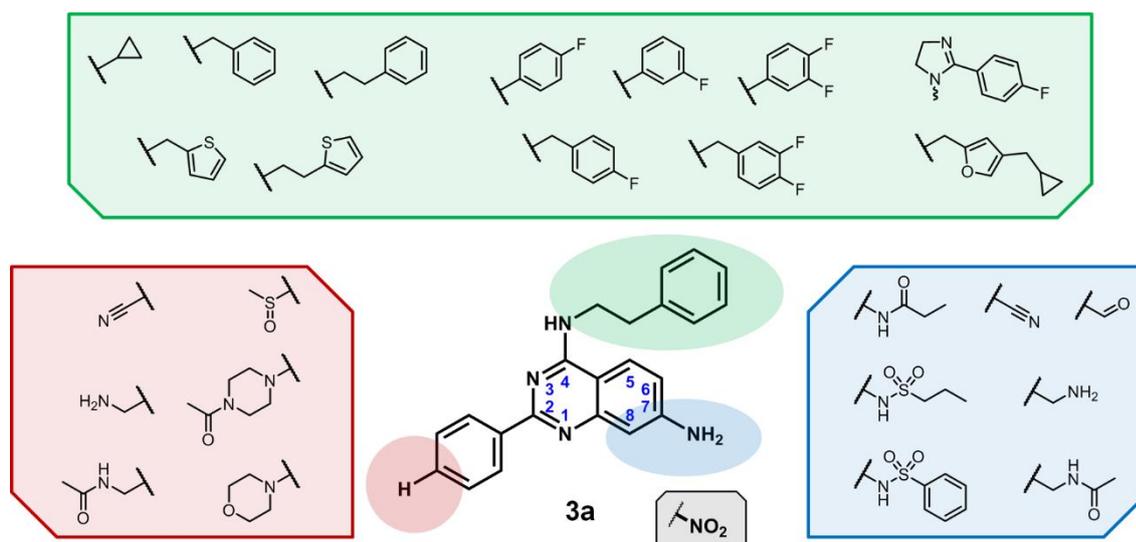


Abb. 11: Geplante Struktur motive zur Einführung in das Chinazolin-Grundgerüst. Die Nomenklatur des Grundgerüsts bzgl. der Positionen am Chinazolin-Kern ist als blaue Ziffern dargestellt.

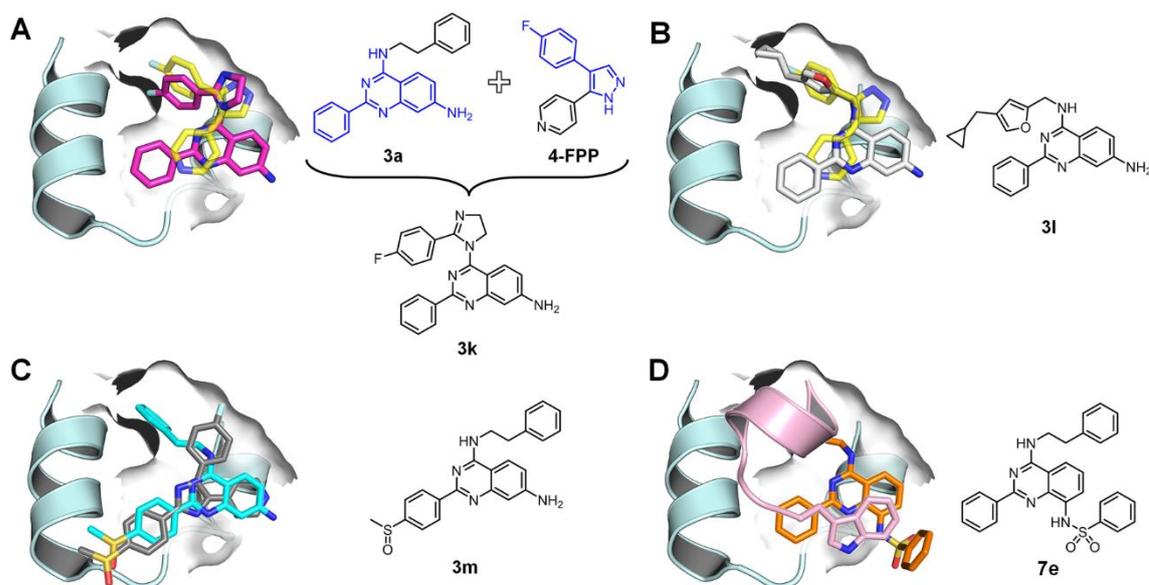


Abb. 12: Modellierung von entworfenen LiPoLis in die LP von p38 α . A) „Hybrid“ **3k** (magenta), der aus dem Chinazolin-Grundgerüst und Strukturelementen von 4-FPP (gelb) zusammengesetzt wurde; B) entworfenen Ligand **3l** (weiß) mit Cyclopropylmethyl-substituiertem Furan als aromatischer Ring in 4-Position; C) in Anlehnung an SB203580 (grau) entworfenen LiPoLi **3m** (cyan); D) 8-Phenylsulfonamid-substituierter Ligand **7e** (orange) in der LP.

Der zum Lösungsmittel gerichtete Phenylring in 2-Position von **3a,b** wurde als mutmaßlich geeignete Stelle zur Einführung von solvatisierenden Gruppen ausgewählt. Zu solchen Löslichkeits-vermittelnden Resten gehören bspw. Piperazin- und Morpholinderivate.^[169] Zudem ergab sich aus der Überlagerung von **3a** und SB203580 in der LP die Idee in dieser Position eine Methylsulfinyl-Funktion einzuführen (**3m**) (Abb. 12C). Die exponierte Orientierung des Phenyls könnte ferner dazu genutzt werden, um in späteren Studien bspw. Biotin- oder Fluorophormarkierungen in die Liganden einzuführen.

Das primäre 7-Amin ist in Richtung polarer Aminosäuren in der Peripherie der LP positioniert und geht im Fall von **3a,b** eine direkte WBB mit Asp294 ein. Die angestrebte Beibehaltung dieser Interaktion setzt das fortwährende Vorhandensein eines Wasserstoffbrücken-Donors nach Derivatisierung der Liganden, bspw. in Form Amiden oder sekundären Aminen, voraus. Entsprechende (Sulfon-)Amide können verschieden große Reste aliphatischer oder aromatischer Natur tragen oder zur Verknüpfung mit diversen *tags* (siehe oben) dienen. Nach Einführung einer Aminfunktion in 8-Position des Chinazolin-Grundgerüsts wäre auch eine entsprechende Modifizierung an dieser Stelle möglich, da sich in diese Richtung die LP öffnet und ausreichend Platz für verschiedene Substituenten gegeben sein sollte. Beispielsweise könnte ein Phenylsulfonamid in dieser Region basierend auf Modellierungen eine zusätzliche Stapelwechselwirkung mit Trp197

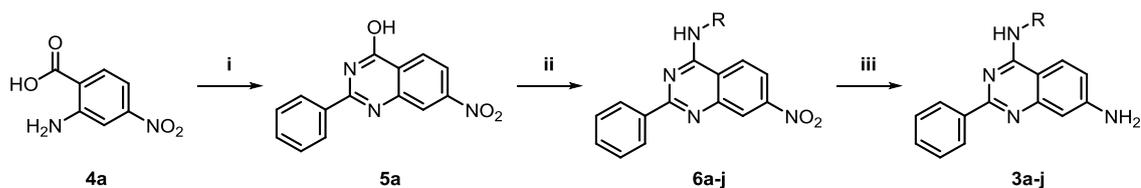
ausbilden und dieses in seiner Konformation weiter stabilisieren und fixieren (Abb. 12D). Als Intermediate der geplanten Syntheseroute zur Generierung der primären Amine würden sich korrespondierende Nitroderivate ergeben, die ebenfalls Raum zur Bindung in die Tasche finden und polare Interaktionen mit umliegenden Aminosäureseitenketten eingehen könnten.

Als Referenzverbindung für die biophysikalische Charakterisierung der Chinazolin-Liganden soll LiPoLi **1** synthetisiert werden (Abb. 5). Das Pyrazolopyridinon-Grundgerüst ließe sich in 4-Position modifizieren und auf diese Weise eine kleine Bibliothek generieren, um die Option für ein potentielles *scaffold hopping* zu untersuchen und ggf. in Verbindung mit gefundenen Substitutionsmustern Hybrids-substanzen zu entwerfen.

3.2 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek

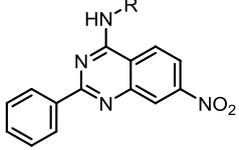
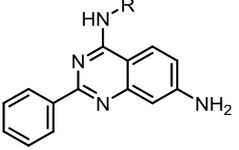
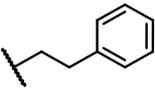
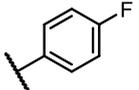
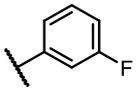
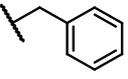
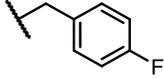
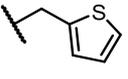
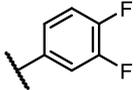
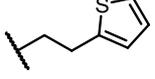
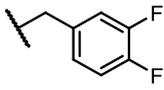
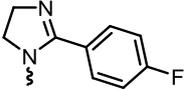
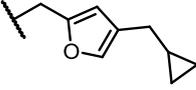
Zur schnellen Generierung einer diversen Substanzbibliothek Chinazolin-basierter LiPoLis wurde eine Syntheseroute genutzt, die eine Derivatisierung des Grundgerüsts, wie aus den vorherigen Modellierungsstudien abgeleitet, in möglichst wenigen Syntheseschritten erlaubt. In ähnlicher Form wurde diese Route bereits zur Herstellung von **3a,b** genutzt (Schema 1).^[103]

Ausgehend von Benzamidin-Hydrochlorid Hydrat erfolgte zunächst die Kondensation mit Anthranilamid **4a** zum Chinazolin-Kern **5a**. Danach wurde die 4-Hydroxylgruppe mit Thionylchlorid chloriert und anschließend unter basischen Bedingungen mit entsprechenden Aminbausteinen substituiert, um die 7-Nitro-2-phenylchinazoline **6a-j** zu erhalten. Die Reduktion dieser Intermediate mit Pd/C und Ammoniumformiat, bzw. Eisen und NH₄Cl in Gegenwart Schwefel-haltiger Substanzen, lieferte die Zielsubstanzen **3a-f** (Tab. 1). Diese Route führte zur erfolgreichen Synthese der angestrebten Derivate, ließ aber bereits in den ersten Schritten oftmals nur moderate Ausbeuten zu (18-66 %), sodass für den Aufbau des Chinazolin-Grundgerüsts und der Substitution in 4-Position nach alternativen Reaktionswegen gesucht wurde.

Schema 1:^a Reaktionssequenz zur Synthese von 7-Amino-2-phenylchinazolinen.

^a Reagenzien und Bedingungen: i) Benzamidin-Hydrochlorid Hydrat, *p*TsOH, DMAc, 130 °C, 18 h (18-32 %); ii) 1: SOCl₂, DMF, 80 °C, 4 h, 2: Amin (R-NH₂), DIPEA, DCM/*i*PrOH (3:2), rt, 18 h (66-95 %); iii) 10 % Pd/C, NH₄OOCH, EtOH, 80 °C, 1-3 h (56-96 %) oder Fe, NH₄Cl, MeOH/H₂O (4:1), 80 °C, 3-6 h (81-87 %).

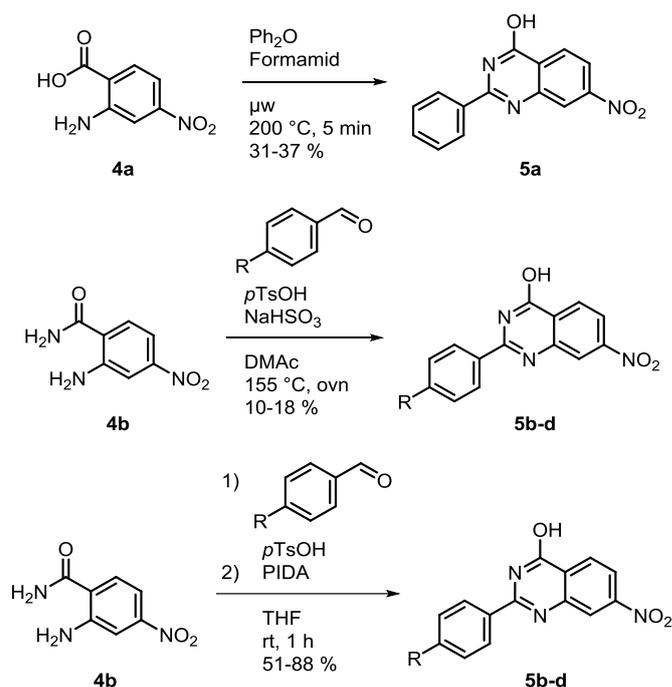
Tab. 1: Identität der 7-Nitro-2-phenylchinazolinen **6a-l** und 7-Amino-2-phenylchinazolinen **3a-l**.

 6a-l		 3a-l	
#	R	#	R
6a/3a		6f/3f	
6b/3b		6g/3g	
6c/3c		6h/3h	
6d/3d		6i/3i	
6e/3e		6j/3j	
6k/3k		6l/3l	

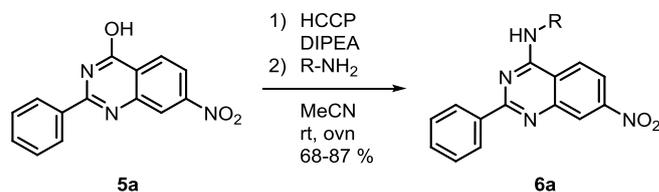
Eine Literaturrecherche und Durchmusterung verschiedener Bedingungen zur Darstellung von 2-Arylchinazolinen ergab zwei Vorschriften, die zu verbesserten Ausbeuten der entsprechenden Synthesestufe führten. Einerseits gelang dies mittels der Mikrowellen (μ w)-gestützten Umsetzung von Benzoesäureanhydrid und Anthranilsäure **4a** in Gegenwart von Formamid zu **5a**^[170], zum anderen durch Kondensation von unterschiedlichen Benzaldehyden und Anthranilamid **4b** in Anwesenheit von Phenyliod(III)diacetat (PIDA) als Oxidationsmittel^[171] (Schema 2). Neben einer Verbesserung der Ausbeuten führt die Verwendung alternativer Substrate in Form von

(a)symmetrischen Anhydriden oder Aldehyden zur Eröffnung eines größeren chemischen Raumes, indem bspw. eine Vielzahl kommerzieller oder zuvor hergestellter Bausteine eine direkte Derivatisierung des 2-Arylrings erlauben. Die Aktivierung der 4-Hydroxylgruppe mit Hexachlorcyclotriphosphazen (HCCP) anstatt mit SOCl_2 stellte sich als mildere und vielseitigere Option für die Substitution an dieser Stelle heraus und wurde in den späteren Reaktionen als Standardmethode verwendet (Schema 3).^[172]

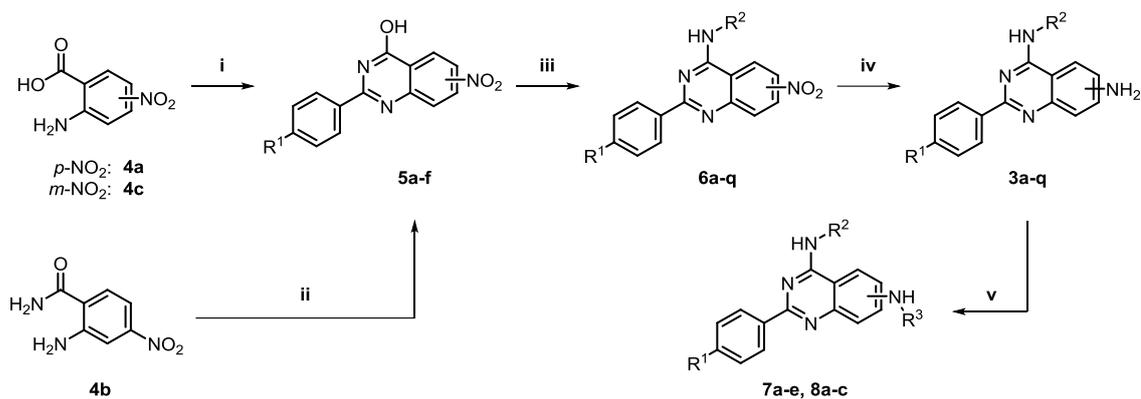
Schema 2: Reaktionsbedingungen zur Darstellung von 2-Aryl-4-Hydroxychinazolinen.



Schema 3: Reaktionsbedingungen zur HCCP-vermittelten Darstellung von 4-Aminochinazolinen.

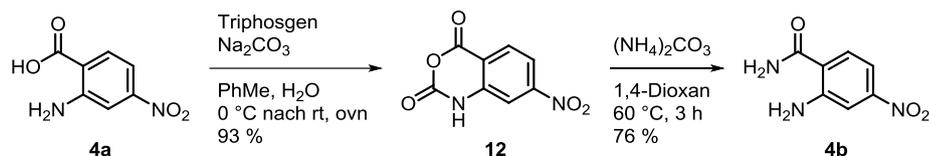


Die für die weiteren Arbeiten verwendete Reaktionssequenz wurde folglich durch die gefundenen Bedingungen ergänzt und gewährleistet einen schnelleren Aufbau von Chinazolin-basierten LiPoLis in durchschnittlich besseren Ausbeuten, ohne dabei die Anzahl der Einzelschritte zu erhöhen (Schema 4).

Schema 4:^a Optimierte allgemeine Reaktionssequenz zur Synthese von 2-Arylchinazolinen.

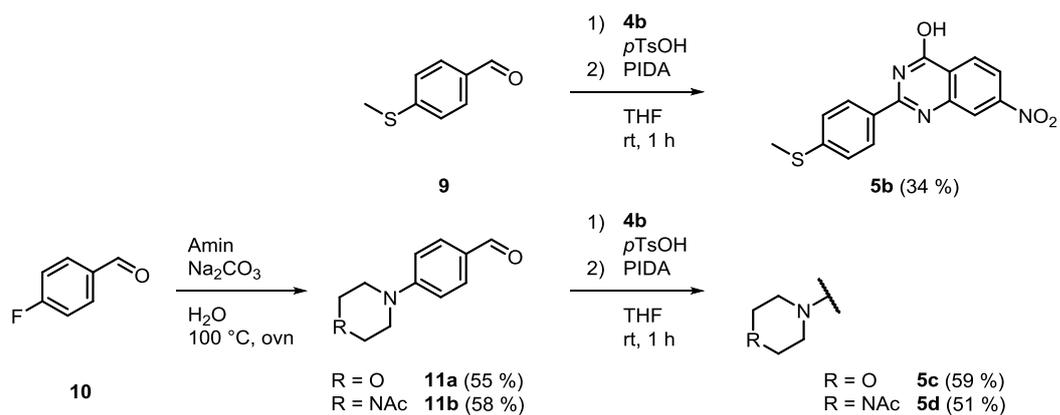
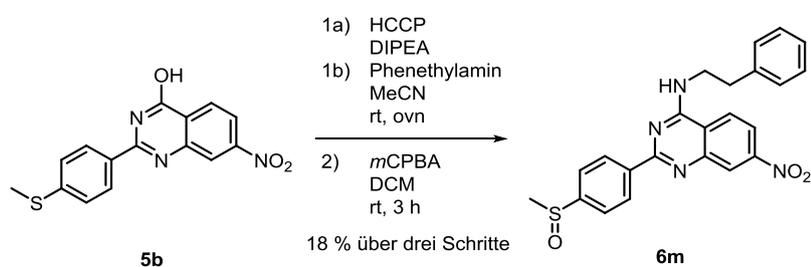
^a Reagenzien und Bedingungen: i) Ph₂O, Formamid, μ w: 200 °C, 5 min (31-37 %); ii) 1: Benzaldehyd (R¹), *p*TsOH, THF, rt, 30 min, 2: PIDA, rt, 1 h (51-88 %); iii) 1: HCCP, DIPEA, MeCN, rt, 1 h, 2: Amin (R²), rt, 18 h (68-87 %); iv) 10 % Pd/C, NH₄OOC, EtOH, 80 °C, 1-3 h (56-96 %) oder Fe, NH₄Cl, MeOH/H₂O (4:1), 80 °C, 3-6 h (81-87 %); v) Carbonsäurechlorid (R³), DIPEA, DCM, 0 °C zu rt, oder Sulfonsäurechlorid (R³), Py, 0 °C zu 50 °C, 1-6 h (69-80 %).

Das während der Arbeiten häufig verwendete Amid **4b** konnte über Umsetzung von Isatoanhydrid **12** mit (NH₄)₂CO₃ erfolgreich im größeren Maßstab hergestellt werden (Schema 5).^[173] Insbesondere die Kondensation von Anthranilamiden mit Benzaldehyd-Derivaten **9** und **11a,b** ermöglichte die Synthese von den Schlüsselintermediaten **5b-d** als Vorläufer der finalen Zielverbindungen **3m-o** (Tab. 2).

Schema 5: Darstellung von 4-Nitroanthranilamid **4b**.

Die entsprechenden Bausteine waren entweder kommerziell erhältlich (**9**) oder wurden zuvor in einer Reaktion mit **10** generiert (**11a,b**) (Schema 6). Um das Methylsulfinyl-substituierte 2-Arylchinazolin **6m** zu erzeugen, wurde **5b** zunächst wie beschrieben mit Phenethylamin substituiert und anschließend mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) oxidiert (Schema 7).

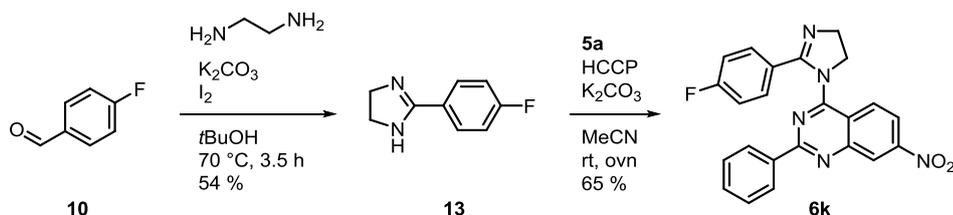
In die spätere Charakterisierung der reversiblen LiPoLis flossen drei weitere Substanzen (**3r-t**, Tab. 2) ein, die im Rahmen der Synthese kovalenter Liganden entstanden sind, welche in Kapitel 4.3 dieser Arbeit beschrieben ist.

Schema 6: Darstellung der Benzaldehyde **11a,b** und der 2-Arylchinazoline **5b-d**.**Schema 7:** Darstellung von 2-Arylchinazolin **6m**.**Tab. 2:** Identität der 4-Amino-2-Arylchinazoline **6/3m-o** und **3r-t**.

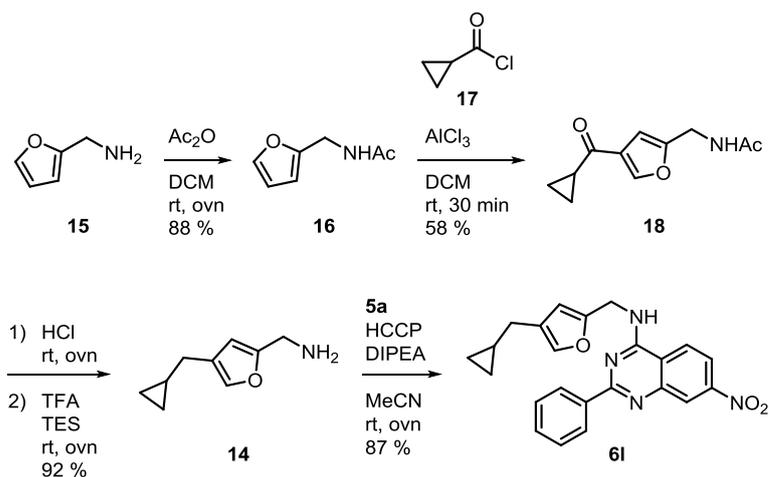
#	R	#	R
6m-p, 6r		3m-o, 3r-t	
6n/3n		3s	
6o/3o		3t	

Weiterhin stellt die HCCP-vermittelte Substitution in 4-Position des Grundgerüsts neben der genannten Vorteile ebenfalls einen Weg zur Generierung des postulierten „Hybriden“ **6k** dar, wofür die Einführung eines entsprechenden Benzamidins **13** unter Verwendung von K_2CO_3 als Base erforderlich war (Schema 8). Das Benzaldehyd **10** wurde hierfür zuvor mit Ethylendiamin, Iod und K_2CO_3 zu **13** umgesetzt. Ein weiteres Amin, das unter diesen Bedingungen eingeführt wurde, um Substanz **6l** zu liefern, ist der Baustein **14**, der zuvor in einer dreistufigen Synthese hergestellt wurde (Schema 9). Ausgehend von der Schützung des primärenamins von Furan **15** erfolgte anschließend eine Friedel-Crafts-Acylierung von **16** mit Säurechlorid **17**. Das finale Amin **14** wurde unter gleichzeitiger Reduktion des Ketons **18** als Hydrochlorid freigegeben.^b

Schema 8: Darstellung des Bausteins **13** und des 2-Arylchinazolins **6k**.



Schema 9: Darstellung des Bausteins **14** und des 2-Arylchinazolins **6l**.

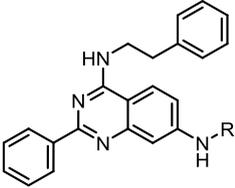
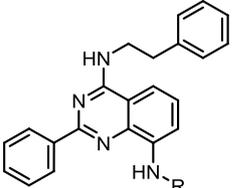
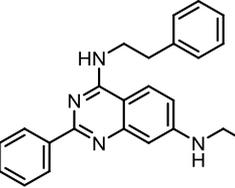
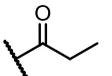
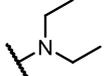
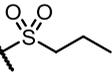
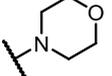
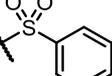
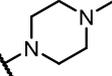
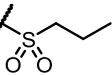
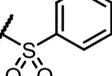


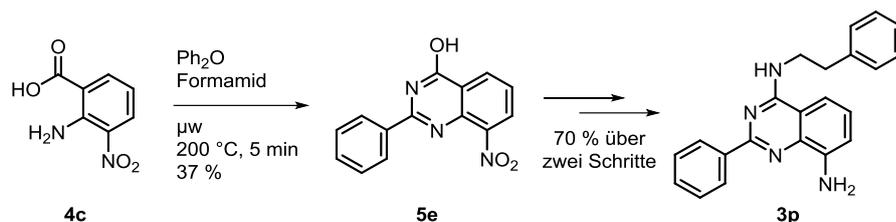
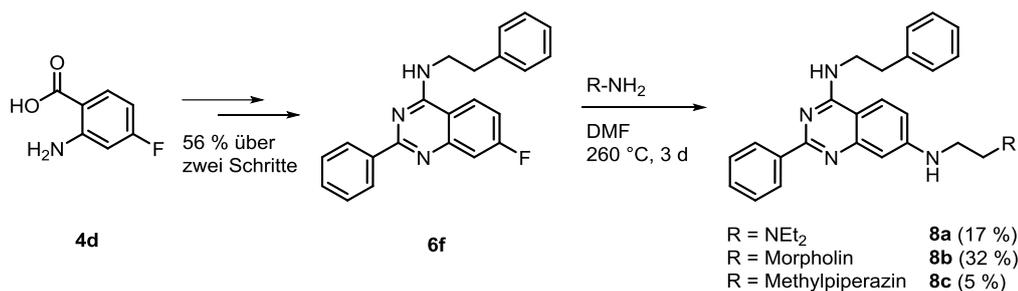
^b Die Synthese der Derivate **3d-I** war Bestandteil der Masterarbeit von Bianca Wiedemann. Die Synthese von **3n** was Bestandteil der Bachelorarbeit von Maria Ecke. Die Synthese von **3o** war Bestandteil der Bachelorarbeit von Julia Hardick.

Die aus der Reduktion mit Pd/C bzw. Eisen hervorgehenden Amine stellen geeignete Substrate für eine nukleophile Substitution an diversen Carbon- oder Sulfonsäurechloriden dar. Entsprechende Derivate (**7a-e** und **8a-c**) wurden abhängig von dem gewählten Säurechlorid entweder in Gegenwart von DIPEA bei rt oder von Pyridin (Py) bei 50 °C synthetisiert (Schema 4). Dabei wurden sowohl in 7- als auch in 8-Position entsprechende Reste jeweils unter Beibehaltung eines sekundärenamins als Wasserstoffbrücken-Donor eingeführt (Tab. 3). Für die Derivate **7d,e** diente dabei 8-Amin **3p** als Vorstufe (Schema 10).

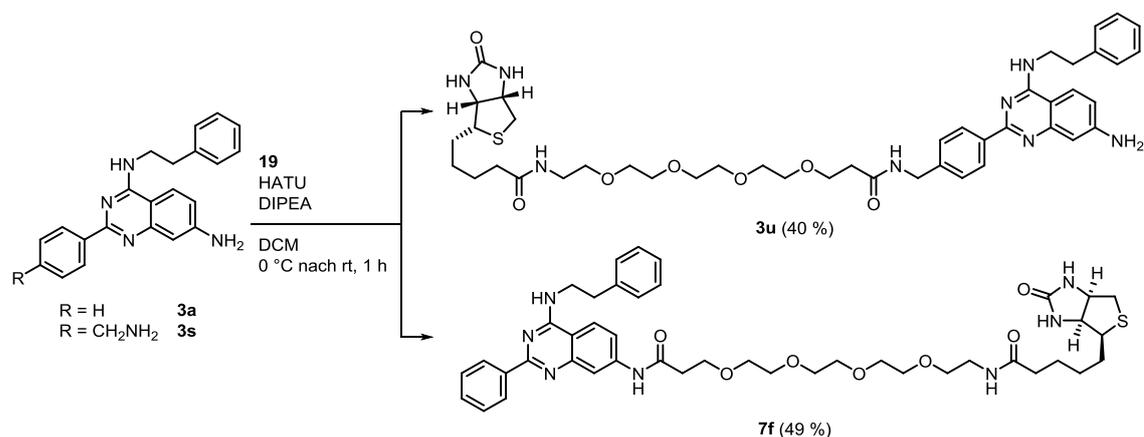
Eine weitere Gruppe von 7-Aminochinazolinen (**8a-c**) wurde hergestellt und durch Umsetzung mit primären Alkylaminen mit solvatisierenden Gruppen dekoriert. Ausgehend von Anthranilsäure **4d** wurde zunächst 7-Fluorochinazolin **6f** nach den zuvor beschriebenen Vorschriften synthetisiert. Klassische Buchwald-Hartwig-^[174] oder Ullmann-artige Bedingungen^[175] mit Pd- bzw. Cu-Katalysatoren führten weitergehend nicht zur Bildung der gewünschten Zielsubstanzen. Eine erfolgreiche Darstellung konnte letztendlich unter thermischer Reaktionsführung in hochsiedenden Lösungsmitteln erzielt werden (Schema 11).

Tab. 3: Identität der 7- und 8-derivaisierten 2-Phenylchinazoline **7a-e** und **8a-c**.

 7a-c		 7d,e		 8a-c	
#	R	#	R		
7a		8a			
7b		8b			
7c		8c			
7d					
7e					

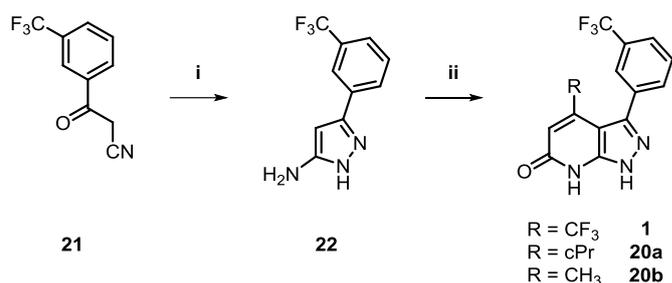
Schema 10: Darstellung von 8-Amino-2-Phenylchinazolin **3p**.**Schema 11:** Darstellung der 7-Aminochinazoline **8a-c**.

In weiteren Reaktionen wurden LiPoLis **3a** und **3s** in mit Biotin-PEG₄-säure **19** (17-Oxo-21-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-4,7,10,13-tetraoxa-16-azaheneicosansäure) und HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexyfluorophosphat) als Kupplungsreagenz zu **3u** bzw. **7f** umgesetzt (Schema 12). Die daraus resultierten Liganden tragen Biotin-Modifizierungen an den Positionen des Grundgerüsts, die bei Bindung in die LP zum Lösungsmittel orientiert sind und könnten in Studien zur LiPoLi-Charakterisierung verwendet werden oder als Vorläufer funktioneller Sondenmoleküle dienen.

Schema 12: Darstellung der Biotin-modifizierten LiPoLis **3u** und **7f**.

Neben den Chinazolin-basierten LiPoLis sollte der Literatur-beschriebene Ligand **1** als Referenzsubstanz für eine nachfolgende Charakterisierung hergestellt werden. Das allgemeine Syntheschema umfasst eine Darstellung in zwei Schritten (Schema 13), wobei zunächst ausgehend von dem Nitril **21** im Rahmen einer Umsetzung mit Hydrazin der Pyrazolring **22** aufgebaut wurde. Dieser diente abschließend als Substrat in der Kondensation mit verschiedenen Oxobutyrate, um die entsprechenden Pyrazolopyridinon-Derivate **1** und **20a,b** zu generieren.

Schema 13:^a Allgemeine Reaktionssequenz zur Darstellung von Referenzsubstanz **1** und Derivate **20a,b**.



^a Reagenzien und Bedingungen: i) Hydrazin, EtOH, 80 °C, 21 h (50 %); ii) Oxobutyrate (R), AcOH, 120 °C, 19 h (51-60 %).

Zusammenfassend wurden auf Grundlage der Ko-Kristallstrukturen von **3a,b** im Komplex mit p38 α verschiedene Serien Chinazolin-basierter Liganden entworfen, welche die LP der MAPK adressieren sollen. Die allgemeine Syntheseroute zur Darstellung von 2-Arylchinazolinen wurde hinsichtlich erhöhter Ausbeuten, kürzerer Reaktionszeiten sowie einer Erweiterung des chemischen Raumes an zugänglichen LiPoLis optimiert. Insgesamt wurde eine fokussierte Bibliothek von 49 entsprechenden 7-/8-Nitro-, Amin- und (Sulfon-)Amid-Derivaten hergestellt, die unterschiedliche hydrophobe Reste in 4-Position und größtenteils polare, Löslichkeits-vermittelnde Gruppen am 2-Phenylring oder in 7- und 8-Position des Grundgerüsts tragen. Weitere synthetisierte Liganden stellen die mit Biotin versehenen Moleküle **3u** und **7f** sowie Referenzsubstanz **1** und dessen Analoga **20a,b** dar.

Im Folgenden sollte die erstellte Substanzbibliothek im Rahmen von SPR-Experimenten bzgl. Bindungsaffinität gegenüber p38 α untersucht und die erhaltenen Ergebnisse mit Hilfe orthogonaler biophysikalischer Methoden validiert werden. Zusätzlich sollten mit den neuen Derivaten Kristallisationsstudien durchgeführt werden. Idealerweise können aus dieser Charakterisierung Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet und daraufhin die Planung weiterer Syntheseyklen angeregt werden. Beispielsweise könnten Substitutionsmuster von Derivaten der ersten Serien miteinander kombiniert werden und somit eine iterative Optimierung der Liganden hinsichtlich des Einsatzes als Sondenmoleküle in biologischen Systemen erfolgen.

3.3 Biophysikalische Charakterisierung

In der Beschreibung der Assay-Systeme werden nachstehend die Terminologien „Ligand“ und „Analyt“ verwendet. „Ligand“ bezeichnet hierbei, abweichend zu den restlichen Teilen dieser Arbeit, ein Rezeptormolekül (bspw. p38 α), dessen Wechselwirkung mit „Analyten“ in Form niedermolekularer Substanzen (bspw. LiPoLis) detektiert wird.

3.3.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

3.3.1.1 Theoretischer Hintergrund

Die SPR-Spektroskopie stellt eine leistungsfähige Technologie zur Markierungsfreien Detektion und Charakterisierung von (bio)molekularen Interaktionen in Echtzeit dar. Ein Wechselwirkungspartner, i.d.R. der Ligand, ist dabei auf einer Sensoroberfläche immobilisiert, über welche dann der sich im Fluss befindliche Analyt geführt wird. Dabei werden Assoziation und Dissoziation des Bindungsereignisses gemessen und in einem sogenannten Sensorgramm dargestellt. Eine Quantifizierung der Affinität von Interaktionspartnern erfolgt in Form von den charakteristischen kinetischen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} sowie der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D .^[176]

Bei SPR handelt es sich um einen physikalischen Prozess, der beobachtet wird, wenn parallel polarisiertes Licht unter Totalreflexions-Bedingungen auf eine dünne Metallschicht (bspw. Gold) trifft. Einen gebräuchlichen Versuchsaufbau stellt ein Prisma-gekoppeltes, als Kretschmann-Konfiguration bezeichnetes, System dar (Abb. 13A).^[177] Mit einer bestimmten Feldenergie bzw. im Resonanzwinkel einfallende Photonen können von gemeinsam schwingende Leitungsbandelektronen der Goldoberfläche absorbiert werden und diese sogenannten Oberflächenplasmonen anregen. Die unter diesen Bedingungen stattfindende Absorption verringert die Intensität des reflektierten Lichtes, die mit Hilfe von bildgebender SPR (SPRi)-Spektroskopie detektiert werden kann und eine gleichzeitige Verfolgung vieler SPR-Regionen auf einem einzelnen Sensor ermöglicht.^[178] Der Resonanzwinkel des eingestrahnten Lichts hängt hauptsächlich von den Eigenschaften der untersuchten Grenzfläche ab, sodass bspw. die durch Bindung von Biomolekülen an einen Sensor verursachten Änderungen im Brechungsindex detektiert werden können.^[179]

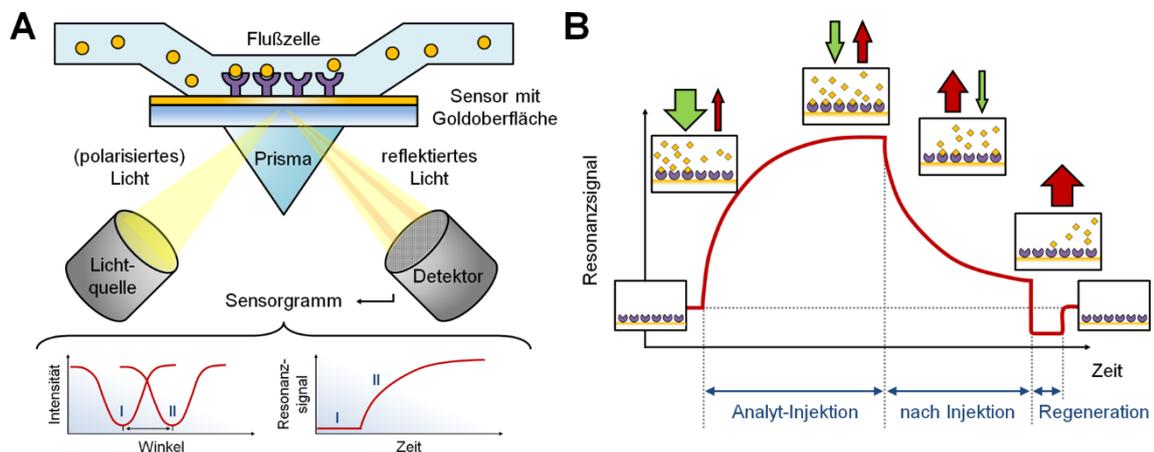


Abb. 13: Schematischer Aufbau eines SPR-Experimentes. A) Kretschmann-Konfiguration und SPR-Phänomen. Durch ein Prisma gelenktes, polarisiertes Licht trifft auf eine mit Gold beschichtete Sensoroberfläche und wird nach Totalreflexion auf einen optischen Detektor zurückgeworfen. Analyt-Lösung (orange) wird im Fluss über den mit immobilisierten Liganden (lila) modifizierten Sensor geführt und die Intensität des reflektierten Lichtes in Abhängigkeit des Resonanzwinkels verfolgt. Dieses Signal lässt sich in RU überführen und als zeitaufgelöstes Sensorgramm darstellen; der Übergang von „I“ nach „II“ beschreibt hier die Verschiebung des Resonanzwinkels bei molekularen Wechselwirkungen auf der Sensoroberfläche; B) Charakteristische Phasen eines Sensorgramms. Assoziation: Bindung von Analyt an Sensoroberfläche; Fließ-Gleichgewicht (*steady state*): Die Menge an bindenden Analyten entspricht der Menge an sich von der Oberfläche lösender Analyten (d.h. keine Netto-Assoziation); Dissoziation: Lösen der Interaktionen des Analyten an der Sensoroberfläche; Regeneration: Wiederherstellung des Basislinien-Signals nach bspw. unvollständiger oder nur sehr langsamer Dissoziation des Analyten. (Abb. nach Cooper^[180])

Die gemessenen, zeitabhängigen Signale werden meist in einfacher zu interpretierende Resonanzeinheiten (RU) umgewandelt und in Form eines Sensorgramms abgebildet, wobei charakteristische Phasen unterschieden werden können, aus denen sich dann die kinetischen Parameter bestimmen lassen (Abb. 13B). Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation, k_{on} und k_{off} , geben Aufschluss über die Dynamik der untersuchten Wechselwirkung, während die Dissoziationskonstante K_D , d.h. das Verhältnis k_{off}/k_{on} dieser beiden Kenngrößen, das System im Gleichgewicht beschreibt.

3.3.1.2 Assay mit NeutrAvidin-Sensoren

Für die Charakterisierung der synthetisierten LiPoLis wurde zunächst eine Immobilisierungsstrategie des Liganden über NeutrAvidin (NAv) verfolgt. Hierzu wurde eine entsprechend modifizierte Oberfläche hergestellt, indem zunächst eine Aktivierung mit EDC/NHS stattfand und danach NAv über Amidkupplung auf den Sensor gebracht wurde. Noch nicht modifizierte Aktivester wurden abschließend mit Ethanolamin abreagiert. Dann erfolgte die Injektion von biotinylierten Liganden und ggf. Blockieren von freien NAv-Bindungsstellen mit Biotin(-Derivaten) (Abb. 14).

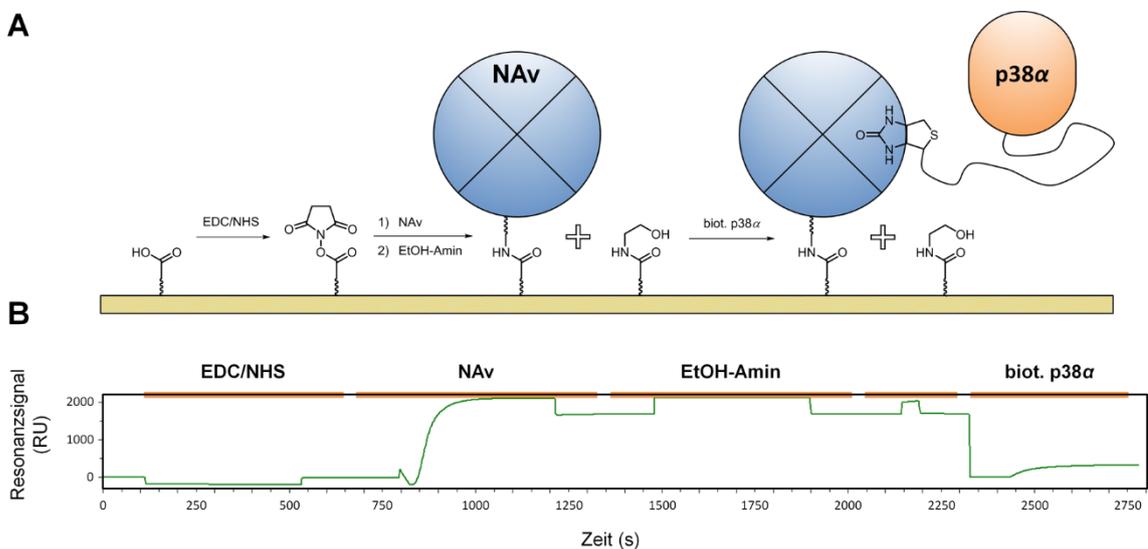


Abb. 14: NAv-Sensoren zur Immobilisierung von biotinyliertem p38 α . A) Schematische Darstellung der Immobilisierungsstrategie: Die Aktivierung der Carboxylgruppen-tragenden Sensoroberfläche erfolgte mit EDC/NHS. Kupplung von NAv fand anschließend über die freien Amine des Proteins statt. Schließlich wurden biotinylierte p38 α immobilisiert und nicht-modifizierte Aktivester mit Ethanolamin abreagiert; B) Sensorgramm der NAv-vermittelten Immobilisierung von p38 α .

Die hierfür benötigte Kinase wurde unter Verwendung von Amin-reaktiven NHS-Reagenzien biotinyliert, wobei die Markierung des Proteins zufällig erfolgte. In initialen Experimenten mit den auf diese Weise generierten Sensoren wurde eine niedrige Aktivität von p38 α beobachtet, d.h. sehr geringe Bindungssignale bei Injektion von Analyten im Bereich des Rauschens. Vergleichbares wurde ebenfalls nach direkter Kupplung der Kinase auf die Sensoroberfläche beobachtet, sodass von dieser Immobilisierung-Methode abgesehen wurde.

Casper *et al.* beschrieben, dass die Biotinylierung von Kinasen zu einer Beeinträchtigung der in SPR-Messungen detektierten Aktivität führen kann, da bspw. reaktive Seitenketten wie das katalytische Lys53 in p38 α bevorzugt mit den eingesetzten Reagenzien umgesetzt werden.^[181] Die Autoren führten die Markierung der Kinase in Abwesenheit und in Gegenwart von SB203580 als potenten ATP-kompetitiven Inhibitor durch und beobachteten signifikante Auswirkungen auf das erhaltene Resonanzsignal bei Analyt-Injektion. Sie postulierten daraufhin, dass reversible Liganden des aktiven Zentrums während der Biotinylierung reaktive Aminosäuren vor einer Modifikation schützen könnten. Eine Markierung in Anwesenheit von SB203580 führte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen ebenfalls zu einer Verbesserung der Kinaseaktivität nach Immobilisierung, wobei der Effekt im Vergleich nicht so signifikant war, wie es in der Literatur beschrieben wurde (Daten nicht gezeigt).

Injektion von SB203580 als Referenzsubstanz führte zu charakteristischen, konzentrationsabhängigen Resonanzsignalen, wobei die detektierte Intensität im Fall dieses ATP-kompetitiven Inhibitors sehr niedrig war (ca. 0.5 RU) (Abb. 15A). Dennoch konnte eine Dissoziationskonstante für diesen Analyten bestimmt werden, die gut mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen korreliert ($K_D = 36$ nM) (Tab. 4).^[182-183] Dieses System wurde demnach zur Charakterisierung der synthetisierten LiPoLis genutzt. Beispielhafte Sensorgramme für die Parentalsubstanz **3a**, dem analogem Bioisoster **3e** und dem mit einer Löslichkeits-vermittelnder Gruppe versehenem Derivat **3o** zeigten ebenfalls einen typischen, konzentrationsabhängigen Verlauf der Messkurven (Abb. 15B-D). Im Allgemeinen wiesen die charakterisierten LiPoLis eine niedrige Affinität aufgrund schneller Assoziation und Dissoziation auf (Tab. 4).

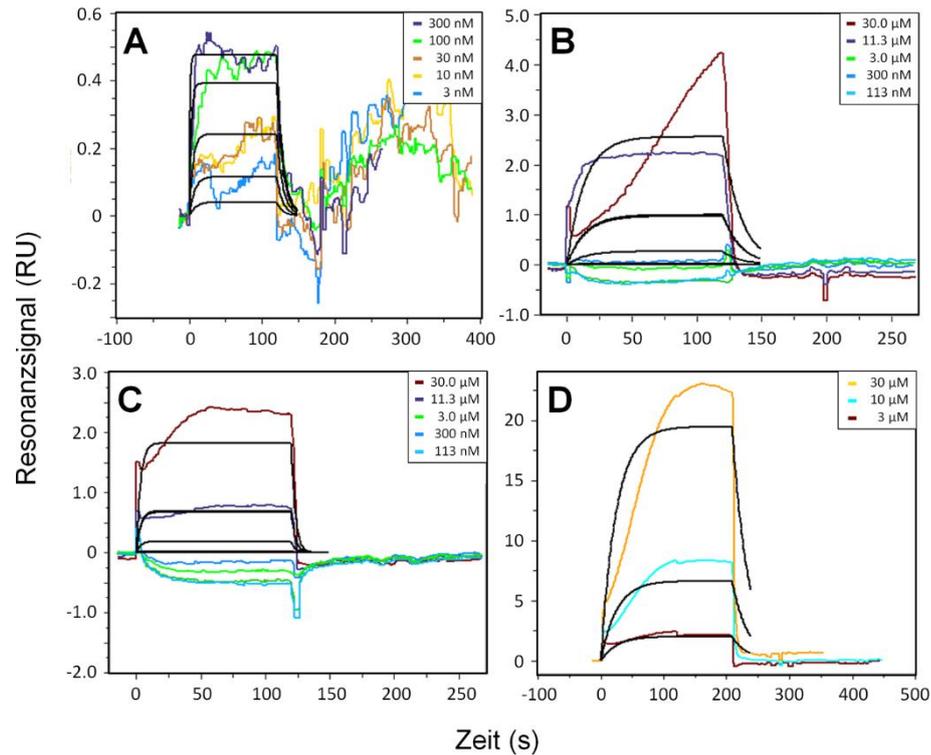


Abb. 15: SPR-Assays mit biotinyliertem p38 α auf NAV-Sensoren. Sensorgramme von A) SB203580, B) **3a**, c) **3e** und D) **3o**; eingesetzte Analytkonzentrationen reichten von 3-300 nM (SB203580) bzw. 113 nM - 30 μ M (LiPoLis); 1:1-Langmuir-Fit (schwarz).

Tab. 4: Bestimmte kinetische Parameter für die Analyten SB203580, **3a**, **3e** und **3o** im SPR-Assay mit biotinyliertem p38 α als Ligand auf NAV-Sensoren.

	k_{on} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_{D} (M)	χ^2 (RU^2)
SB203580	$3.21 \cdot 10^6$	$11.53 \cdot 10^{-2}$	$35.97 \cdot 10^{-9}$	$7.99 \cdot 10^{-3}$
3a	140.00	$7.17 \cdot 10^{-2}$	$5.12 \cdot 10^{-4}$	0.53
3e	110.30	$33.34 \cdot 10^{-2}$	$3.02 \cdot 10^{-3}$	0.25
3o	41.22	$4.03 \cdot 10^{-2}$	$9.77 \cdot 10^{-4}$	7.73

Insgesamt ist die beobachtete Signalintensität gemessen an dem Immobilisierungslevel des Liganden sehr gering. Ein niedriges Signal/Rauschen-Verhältnis kann darin resultieren, dass nur ungenaue Aussagen bzgl. der Konzentrationsabhängigkeit der injizierten Analyten sowie der Bestimmung kinetischer Parameter getroffen werden können. Die relativ hohen Werte für χ^2 für die angelegten 1:1-Langmuir Fit-Modelle zur Auswertung der beschriebenen Daten raten demnach zu einer kritischen Interpretation der Sensorgramme und den abgeleiteten Geschwindigkeits- und Dissoziationskonstanten. Ein möglicher Grund könnte in der gewählten Immobilisierungs-Methode und einer damit verbundenen Beeinträchtigung der Enzymintegrität bzw. -funktionalität liegen.

Weitere Nachteile dieser Strategie stellen die ungerichtete, statistische Orientierung des zufällig biotinylierten Liganden auf der NAV-Oberfläche sowie die Quasi-Irreversibilität der Biotin-Avidin-Wechselwirkung dar, wodurch eine Regenerierung der Sensoren nach Denaturierung des Liganden ausgeschlossen wird. Erstrebenswert wäre daher ein wiederverwendbares bzw. regenerierbares System, das darüber hinaus auf die Verwendung von Kupplungsreagenzien oder die nachträgliche chemische Modifizierung des Liganden verzichtet. Nachfolgend wurde die Charakterisierung von LiPoLis mittels zwei unterschiedlicher Strategien, die diese Kriterien erfüllen, verfolgt.

3.3.1.3 Assay mit biotinylierten LiPoLis

Eine reverse Strategie des zuvor genutzten Systems stellt die Immobilisierung der zuvor hergestellten LiPoLis **3u** und **7f** auf NAV-Sensoren dar, wobei die Liganden auf dem Sensor unter den experimentellen Bedingungen signifikant stabiler als die meisten Kinasen bzw. Proteine sein sollten und somit eine nachhaltigere Nutzung der Sensoren gewährleisten (Abb. 16A). Da die Einbringung einer Biotin-Markierung potentiell mit der Bindung der Liganden interferieren könnte, wurden unterschiedliche Positionen am Chinazolin-Grundgerüst entsprechend derivatisiert.

Die NAV-vermittelte Immobilisierung der Derivate von Parentalsubstanz **3a** (**3u** und **7f**) erfolgte analog zu Kapitel 3.3.1.2. Aus den vorherigen Experimenten ging hervor, dass die Affinität der LiPoLis im mikromolaren Bereich liegt, sodass in diesen Messungen entsprechend hohe Proteinkonzentrationen (3.125-50 μ M) im Bereich des angenommenen K_D -Wertes für **3a** eingesetzt wurden. Unter diesen Bedingungen zeigte p38 α als Analyt unspezifische Bindung (NSB) an die Referenzoberflächen (ohne LiPoLi) und die aktiven Sensor-Oberflächen (Abb. 16B), welche mit steigenden Proteinkonzentrationen besonders betont war. Bei geringeren konzentrierten Injektionen war die NSB weniger signifikant bzw. konnte angesichts des höheren Resonanzsignals im Vergleich zum umgekehrten System als vernachlässigbar angesehen werden. Um die beobachtete Adsorption von Proteinen an die Oberflächen^[184] während des Assays zu verhindern, wurden dem zuvor verwendeten PBS-T-Laufpuffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung + 0.01 % TritonTM X-100) Additive in Form von BSA (Rinderalbumin) und Salzen wie CaCl₂ und MgCl₂ beigefügt. Diese Modifizierung führte zu einer Verbesserung des Signals, wobei die NSB fast vollständig unterdrückt und eine Auswertung der Sensorgramme ermöglicht werden konnte (Abb. 16C).

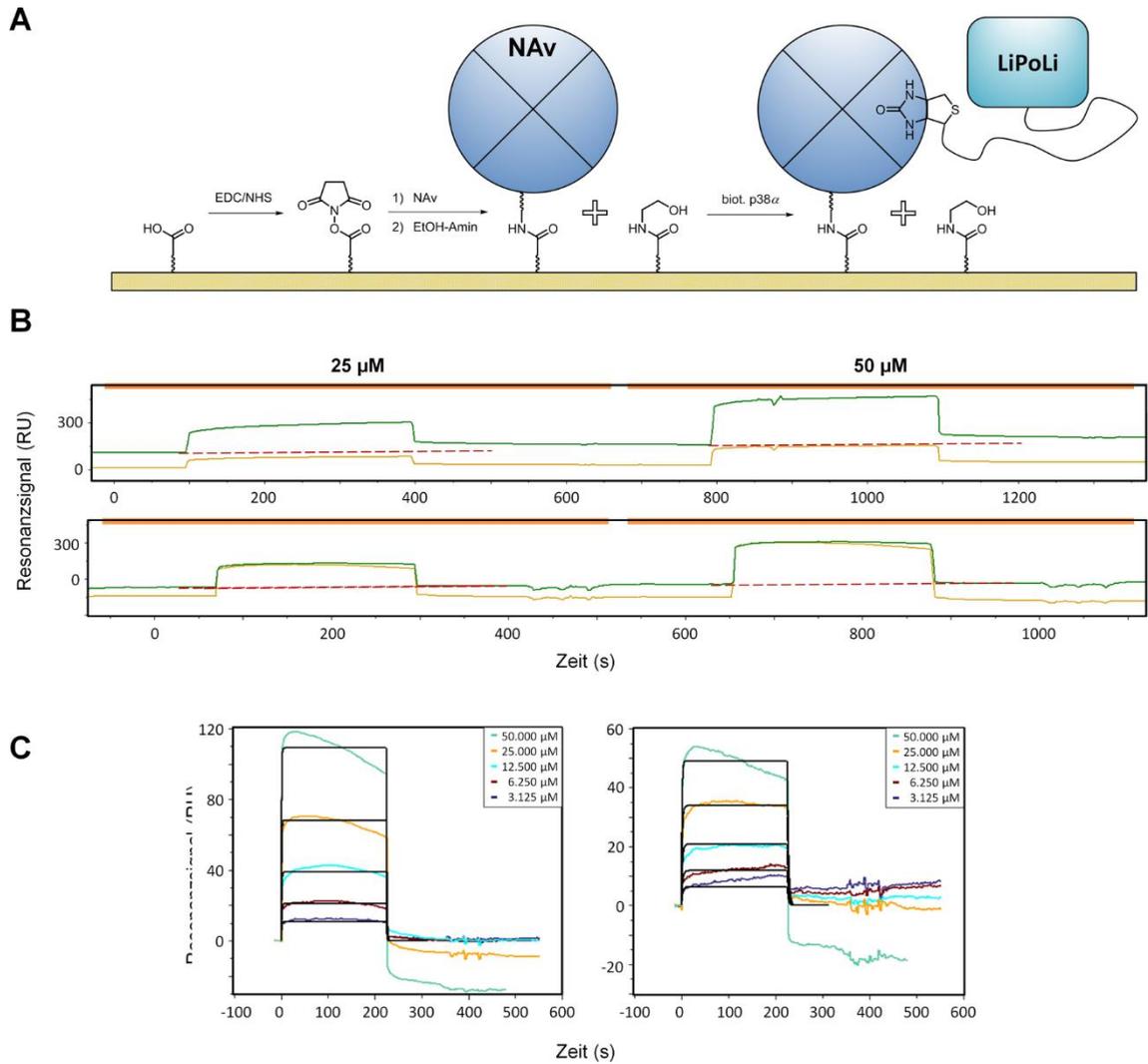


Abb. 16: NAV-Sensoren zur Immobilisierung von biotinylierten LiPoLis. A) Schematische Darstellung der Immobilisierungsstrategie; B) Roh-Sensorgramme von p38 α -Injektionen (25 μ M, 50 μ M) über mit **7f** (gelb) und **3u** (grün) modifizierten Oberflächen; oben: PBS als Laufpuffer, unten: PBS mit Additiven (5 mg/mL BSA, 250 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ · 2 H₂O, 0,5 mM MgCl₂ · 6 H₂O) als Laufpuffer; rot gestrichelte Linien indizieren das basislinien-Niveau vor Analyt-Injektion; C) links: Sensorgramm von **7f**, rechts: Sensorgramm von **3u**; eingesetzte Analyt-Konzentrationen reichen von 3.125–50 μ M (p38 α); 1:1-Langmuir-Fit (schwarz).

Die Analyt-Injektionen zeigten ein konzentrationsabhängiges Resonanzsignal, wobei der beobachtete Wert für R_{\max} im Bereich der gemäß (2) berechneten theoretischen Maximalresonanz lag.^[185] Allerdings wiesen die beiden aktiven Oberflächen verschiedene Kapazitäten bzgl. der Bindung von p38 α auf, was auf eine jeweils unterschiedliche Immobilisierungsdichte auf dem Sensor zurückzuführen sein könnte.

$$R_{\max} = R_{\text{immob}} \cdot \frac{MW_{\text{Analyt}}}{MW_{\text{Ligand}}} \cdot n_{\text{Ligand}} \quad (2)$$

R : Resonanzsignal; MW: Molekulargewicht; n : Anzahl der Analyt-Bindestellen des Liganden (Valenz)

In Übereinstimmung mit den Experimenten, in denen biotinylierte Kinase verwendet wurde, zeigte sich mit der hier verfolgten umgekehrten Strategie ebenfalls eine durch vergleichsweise rapide Assoziation und Dissoziation charakterisierte Interaktion. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Messungen wurde jedoch statt eines steten Anstiegs des Resonanzsignals (insb. bei hohen Analyt-Konzentrationen) für jede Injektion ein rasches Erreichen eines Plateaus im Sensorgramm beobachtet. Aus den angelegten 1:1-Langmuir-Fits konnten die kinetischen Parameter k_{on} und k_{off} sowie die K_{D} abgeleitet werden, die im Vergleich zwischen **3u** und **7f** Werte in derselben Größenordnung aufwiesen, von den Ergebnissen der Charakterisierung von **3a** jedoch teilweise abweichen (Tab. 5). In einer Gegenüberstellung der bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für **3u** bzw. **7f** und **3a** zeigten sich für die Assoziation eine ca. 100-fache (ca. $10 \cdot 10^3$ vs. $140 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und für die Dissoziation eine ca. 7-fache Erhöhung (ca. 0.1 vs. 0.7 s^{-1}) unter Verwendung der biotinylierten LiPoLis und p38 α als injizierten Analyten. Daraus ergab sich folglich ein ca. 10-fach niedrigerer K_{D} (ca. 3 vs. 0.5 mM).

Aufgrund der Form der detektierten Sensorgramme lassen sich jedoch von der Proteinpräparation herrührende *bulk*-Effekte nicht ausschließen, die sich in typischen rechteckigen Bindungskurven (*square curves*) äußern und ein potentiell Bindungsereignis maskieren können. Ursachen hierfür könnten bspw. in der Analyt-Stammlösung enthaltenes Glycerol oder andere Pufferbestandteile sein, wobei in den durchgeführten Messungen bereits Kalibrierungen gegen Glycerol als Co-Solvens in den Proben vorgenommen wurden, die keinen erkennbaren Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Auf der anderen Seite führt die Verwendung von Analyten mit hohem Molekulargewicht gemäß (2) zu einem erhöhten Resonanzsignal, sodass bspw. Oberflächendriffs eine vernachlässigbare Rolle spielen.

Tab. 5: Bestimmte kinetische Parameter für p38 α als Analyt im SPR-Assay mit biotinylierten LiPoLis **3u** und **7f** als Liganden.

	$k_{\text{on}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$	$K_{\text{D}} (\text{M})$	$\chi^2 (\text{RU}^2)$
3u	$9.46 \cdot 10^3$	$3.90 \cdot 10^{-1}$	$41.22 \cdot 10^{-6}$	19.17
7f	$12.89 \cdot 10^3$	$9.58 \cdot 10^{-1}$	$74.35 \cdot 10^{-6}$	43.01

Die Position der Biotin-Markierung scheint auf die detektierten Sensorgramme keinen signifikanten Einfluss zu haben, da für beide Derivate vergleichbare kinetische Parameter bestimmt werden konnten. Um jedoch mit dieser Immobilisierungs-Strategie die Charakterisierung einer diversen Substanzbibliothek vorzunehmen, bedarf es eines wesentlichen synthetischen Aufwands. Die Derivatisierung der Biotin-LiPoLis im Rahmen von Struktur-Aktivitäts-Beziehungs (SAR)-Studien ist Ressourcen-intensiv, da z.B. die Herstellung von entsprechenden 7-Methylaminochinazolinen über sieben Stufen erfolgt, eine Einführung des *tags* erst mit der letzten Reaktion realisiert werden kann und kein gemeinsamer Vorläufer für eine späte Modifizierung der 4-Position innerhalb der Reaktionssequenz existiert (vgl. Kapitel 4.3). Ferner muss die Einführung des Biotin-PEG₄-Restes an den 2-Phenylring mit der geplanten Derivatisierung in dieser Position vereinbar sein. SAR-Studien könnten weiterhin die Optimierung der PEG-Linkerlängen und alternative Positionen sowie Verknüpfungen der Markierung umfassen.

Aus diesen Gründen wurde parallel zu der NAV-vermittelten Immobilisierung von Biotin-LiPoLis mit der Entwicklung eines alternativen Assays mit NTA-Sensoren zur Charakterisierung von His₆-markierter p38 α und der synthetisierten Substanzbibliothek begonnen.

3.3.1.4 Assay mit trisNTA-Sensoren

Die bspw. in der Affinitätschromatographie häufig verwendete Strategie der Immobilisierung von His-*tag*-markierten Proteinen an Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure (NTA) stellt ebenfalls eine geeignete Methode zur Herstellung von SPR-Sensoren dar. Da viele Proteine im Hinblick auf die Reinigung vorteilhafterweise bereits mit einer entsprechenden Modifikation exprimiert werden, ist dieses System relativ einfach auf eine Vielzahl von verschiedenen Liganden anwendbar. Außerdem ist ein His-*tag* vergleichsweise klein (i.d.R. 6-10 Aminosäuren), wodurch das Risiko verringert wird, dass die zu beobachtende Wechselwirkung durch Einbringung der Markierung negativ beeinflusst wird. Darüber hinaus kann eine milde Regeneration der NTA-Oberfläche durch Komplexierung von zweiwertigen Ionen mittels Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und dadurch verbundenem Lösen der koordinativen Bindung des Liganden zum Sensor erreicht werden.

Ein typisches Immobilisierungsprotokoll umfasst dabei die Injektion von Ni²⁺ (bspw. als NiCl₂) auf einen Chelator-tragenden Sensor, gefolgt von der Zugabe von Poly-His-Ligand und ggf. dem Blockieren der freien Oberflächen mit für die untersuchte Fragestellung irrelevanten Liganden (Abb. 17A).

Da die Interaktion zwischen Ni²⁺-NTA und Polyhistidin reversibel ist, kommt es zu einer steten Dissoziation des immobilisierten Proteins von der Sensoroberfläche. In initialen Versuchen mit kommerziell erhältlichen NTA-Sensoren führte dieser Effekt zu einem signifikanten Driftverhalten und verhinderte eine Auswertung der resultierenden Sensorgramme. Um eine stabilere Immobilisierung von Poly-His-markierten Liganden zu erzielen, wurden spezielle Chelatoren (trisNTA (**23**)), die multiple, auf einem rigiden Grundgerüst gekoppelte NTA-Einheiten tragen, synthetisiert (Schema 14).^[186]

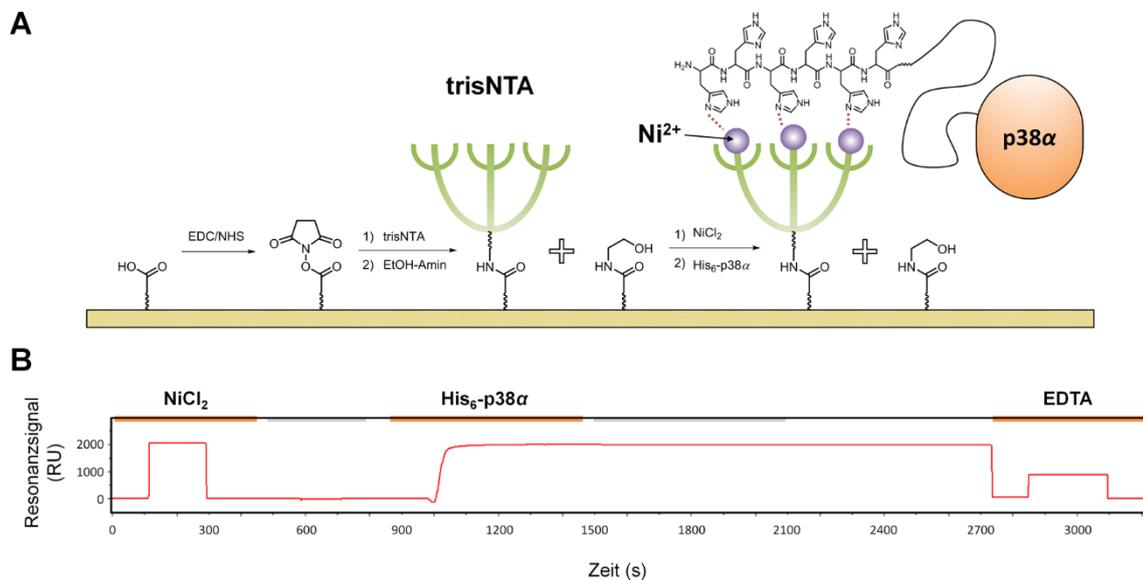
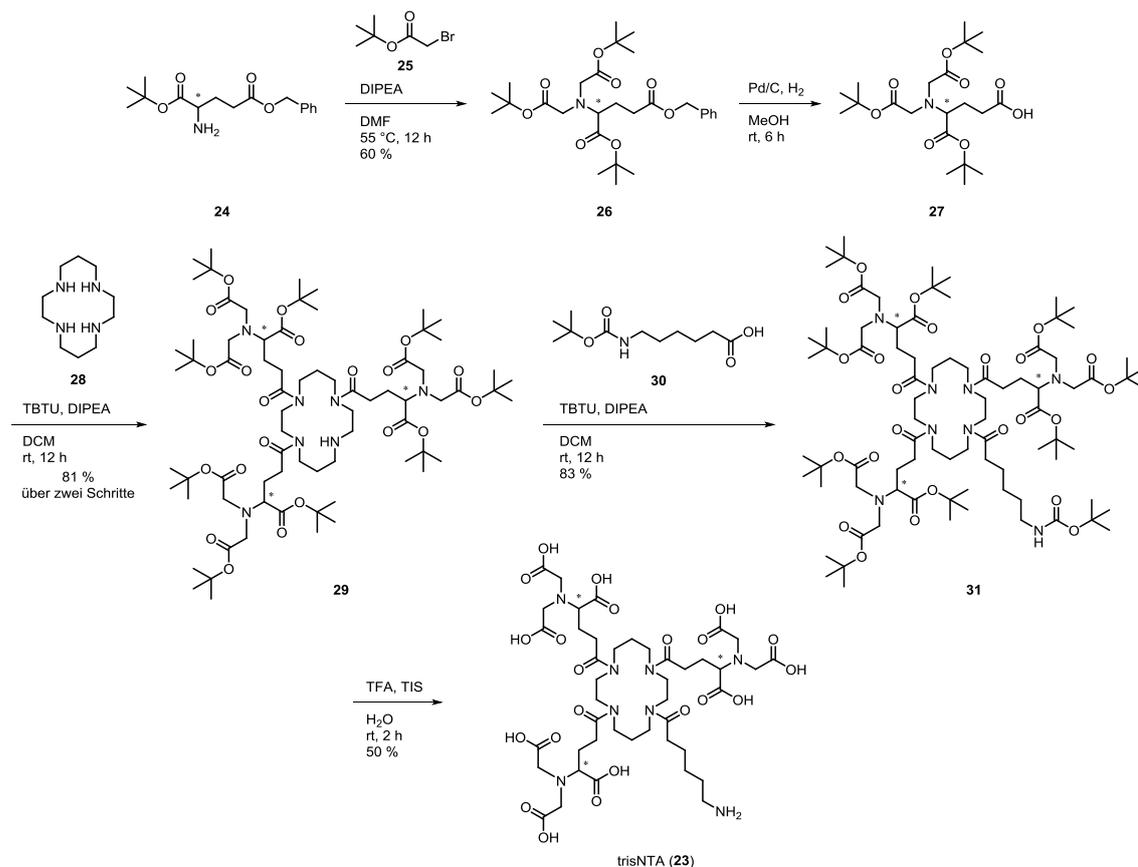


Abb. 17: trisNTA-Sensoren zur Immobilisierung von His₆-p38 α . A) Schematische Darstellung der Immobilisierungsstrategie; rote Punkte indizieren koordinative Bindungen zwischen Ni²⁺ und His-tag; ^c B) Sensorgramm der trisNTA-vermittelten Immobilisierung von His₆-p38 α .

^c Hierbei handelt es sich um eine vereinfachte, schematische Darstellung. In Wirklichkeit komplexieren jeweils zwei Histidine ein Ni²⁺-Ion.

Schema 14: Reaktionssequenz zur Darstellung von trisNTA (**23**).

Ausgehend von Amin **24** und *tert*-Butylbromacetat **25** wurde zunächst der geschützte NTA-Baustein **26** hergestellt. Nach Abspaltung der Benzylschutzgruppe unter reduktiven Bedingungen wurde **27** erhalten und jeweils drei Äquivalente über die freigegebene Säurefunktion an das Grundgerüst **28** gekuppelt. Am verbliebenen sekundären Amin von **29** erfolgte im Rahmen einer weiteren Reaktion mit Peptidkupplungs-Reagenzien die Einführung des *tert*-Butyl-geschützten Linkers **30**. Nach abschließender saurer Abspaltung der Schutzgruppen wurde als Zielsubstanz der finale Chelator trisNTA (**23**) erhalten.

Die Herstellung der trisNTA-Sensoroberfläche erfolgte mittels Aktivierung mit EDC/NHS, Modifikation über die freie Amin-Funktion am Linker von **23** und Blockieren der nicht abreagierten Aktivester mit Ethanolamin (Abb. 17A). Die anschließende Immobilisierung von His₆-p38 α verlief analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise (Abb. 17B). Dabei wurde beobachtet, dass hier die zeitabhängige Dissoziation des Liganden von der Oberfläche im Vergleich zu den kommerziellen „mono“-NTA-Sensoren signifikant reduziert werden konnte. Nach beendeter Injektionen wurde innerhalb einer Wartezeit von ca. 30 min eine stabile Basislinie, d.h. einem

vernachlässigbaren Drift von < 2 RU, erreicht. Im Assay mit trisNTA wurden in den erhaltenen Sensorgrammen insgesamt höhere Intensitäten des Resonanzsignals als in den vorherigen Methoden detektiert, die sich im Rahmen der theoretischen maximalen Immobilisierung gemäß (2) befanden.

Ähnlich wie bei den NAV-basierten Experimenten wurden zunächst initiale Messungen mit SB203580 als ATP-kompetitive Referenzsubstanz durchgeführt, um die Integrität des Liganden zu gewährleisten. Die entsprechenden Sensorgramme des Inhibitors ließen die Berechnung reproduzierbarer kinetischer Parameter auf Basis des angelegten 1:1-Langmuir-Bindungsmodells zu, die mit in der Literatur beschriebenen Werten übereinstimmten ($k_{\text{on}} = 1400 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 2.43 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1.7 \text{ nM}$) (Abb. 18A).^[182-183] Folglich wurde dieses System für die Charakterisierung der zuvor synthetisierten LiPoLis herangezogen.

In den Assays zeigten einige der Chinazolin-basierten Analyten jeweils ein konzentrationsabhängiges Signal, was generell auf eine spezifische Bindung an den immobilisierten Liganden (His₆-p38 α) hindeutet (Abb. 18B-D). Bei anderen Derivaten war hingegen kein Anstieg der Resonanz detektierbar (Abb. 18F). Somit wurde anhand der Messungen eine prinzipielle Unterscheidung zwischen Bindern und „Nicht-Bindern“ und entsprechend eine Ableitung der tolerierten Derivatisierungen ermöglicht.

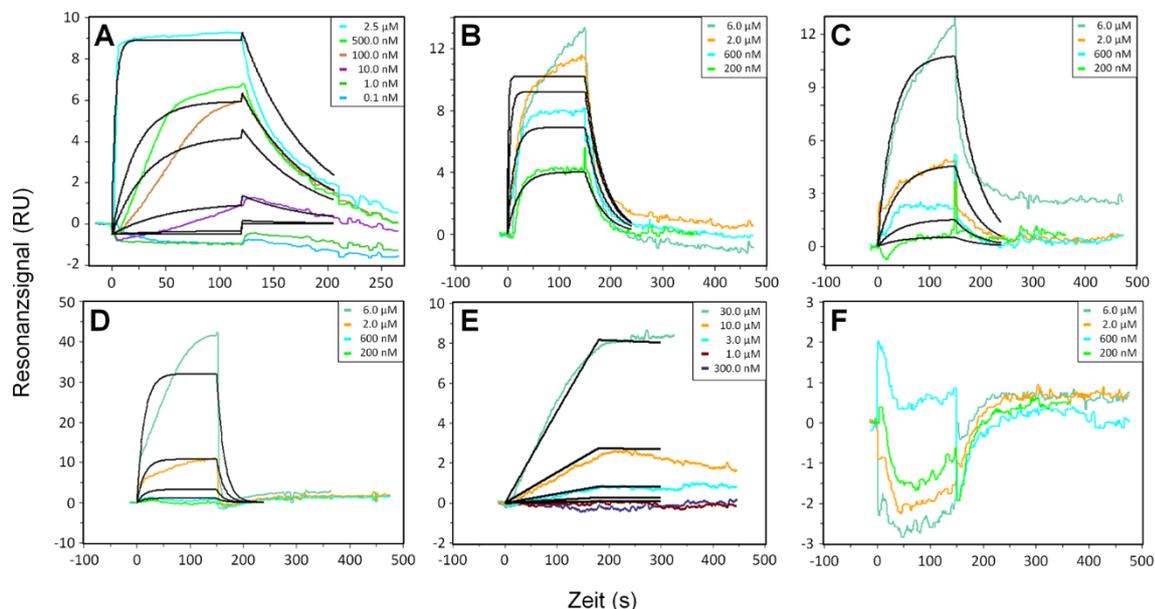


Abb. 18: Sensorgramme der SPR-Assays mit His₆-p38 α auf trisNTA-Sensoren. Sensorgramme von A) SB203580, B) 3a, C) 3e, D) 3o, E) 3l, F) 1; eingesetzte Analytkonzentrationen reichten von 0.1 nM - 2.5 μM (SB203580) bzw. 0.2 - 30 μM (LiPoLis); 1:1-Langmuir-Fits (schwarz).

Zu denjenigen Analyten, die keine charakteristische Antwort bei Injektion zeigten, zählen einerseits die 7-Nitrochinazoline **6a-r** sowie die 7- und 8-substituierten Derivate **7a-e**, **3p** und **8a-c**, von welchen daher angenommen wird, dass sie unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht an p38 α binden. Das Vorhandensein einer Nitrofunktion bzw. die Einführung von (Sulfon-)Amiden oder Alkylresten in 7- und 8-Position des Grundgerüsts könnte daher zu einem Verlust der Affinität gegenüber der Kinase führen. Darüber hinaus zeigten der als Referenzsubstanz synthetisierte Analyt **1** und die entworfenen Analoga **20a,b** ebenfalls keinen Anstieg in der Resonanz (Abb. 18F). Unter Umständen müssten in dem hier verwendeten SPR-Assay höhere Konzentrationen eingesetzt werden, um eine Bindung detektieren zu können, die allerdings hinsichtlich niedriger Wasserlöslichkeit der entsprechenden Substanzen zu Präzipitation führten. In der Literatur wurde die Affinität von **1** gegenüber p38 α in Kernspinresonanz (NMR)-Experimenten charakterisiert, wobei zur Bestimmung der K_D (10 μ M) die Daten aufgrund von limitierter Löslichkeit extrapoliert wurden.^[94]

Die LiPoLis, die im SPR-Assay an p38 α gebunden haben, zeigten weitestgehend einen vergleichbaren Verlauf des Sensorgramms im Vergleich zu dem von Parentalsubstanz **3a** (Abb. 18B-D). Zunächst erfolgte ein von der Basislinie ausgehender Anstieg des Resonanzsignals, wobei jeweils eine Konzentrations-Abhängigkeit der Analyt-Injektionen festgestellt werden konnte, was ein wesentliches Indiz für ein „tatsächliches“ Bindungsereignis am immobilisierten Liganden darstellt.

Die entsprechende Ni²⁺-NTA-Oberfläche wurde mit einem kurzen His₆-Peptid blockiert, um erfolgreich ungewünschte polare Interaktionen zu unterbinden und NSB an den Sensor auszuschließen, wie aus Kontrolle des Referenzkanals hervorging. Bei hohen Analyt-Konzentrationen (> 2 μ M) wurde allerdings eine anhaltende Assoziation an den immobilisierten Liganden beobachtet, ohne dass sich ein Fließgleichgewicht einstellte. Dies könnte ein möglicher Hinweis auf Akkumulation der LiPoLis, bspw. durch unspezifische Anlagerung an die Proteinoberfläche, sein. Dieses Verhalten erschwert die Auswertung der Sensorgramme bzw. die Erhebung belastbarer kinetischer Parameter, da die zur Bestimmung der kinetischen Parameter angelegten 1:1-Langmuir-Fits (und ggf. andere Modelle) die experimentellen Daten nicht angemessen beschreiben (Tab. 6, Sensorgramme siehe Anhang 9.1).

Tab. 6: Bestimmte kinetische Parameter für SB203580, **1** und **3a-p** im SPR-Assay mit His₆-p38 α auf trisNTA-Sensoren.

	R	k_{on} (M ⁻¹ · s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (M)	χ² (RU ²)
SB203580		1.4 · 10 ⁶	2.43 · 10 ⁻³	1.7 · 10 ⁻⁹	0.78
1		n.b.	n.b.	n.b.	
3a		8460.0	2.80 · 10 ⁻²	33.5 · 10 ⁻⁶	3.25
3b		9400.0	4.30 · 10 ⁻²	45.7 · 10 ⁻⁶	3.94
3c		1869.0	20.30 · 10 ⁻²	109.0 · 10 ⁻⁶	0.80
3d		17.6	1.90 · 10 ⁻²	1.1 · 10 ⁻³	0.63
3e		1911.0	2.30 · 10 ⁻²	12.1 · 10 ⁻⁶	0.62
3f		103.7	56.90 · 10 ⁻²	5.5 · 10 ⁻³	0.39
3g		55.0	1.60 · 10 ⁻²	290.0 · 10 ⁻⁶	48.28
3h		1468.0	5.60 · 10 ⁻²	38.2 · 10 ⁻⁶	0.87
3i		61.1	9.60 · 10 ⁻²	1.6 · 10 ⁻³	1.79
3j		n.b.	n.b.	n.b.	
3k		3976.0	5.90 · 10 ⁻²	14.9 · 10 ⁻⁶	1.60
3l		5.7	5.29 · 10 ⁻⁴	92.5 · 10 ⁻⁶	0.02
3m		7948.0	1.50 · 10 ⁻²	1.9 · 10 ⁻⁶	0.25
3n		209.7	5.00 · 10 ⁻²	238.0 · 10 ⁻⁶	2.40
3o		146.5	7.30 · 10 ⁻²	501.0 · 10 ⁻⁶	13.08
3p		n.b.	n.b.	n.b.	

n.b.: keine Bindung (*no binding*)

Allerdings war der beobachtete Effekt reversibel und das anfängliche Basislinienniveau wurde nach Wechsel von Analyt auf Puffer-Injektion wieder erreicht. Wie bereits in den alternativen, vorgestellten Systemen verlief die Assoziation im Allgemeinen langsam und die Dissoziation erfolgte hingegen sehr schnell ($k_{\text{off}} > 0.02\text{-}0.06\text{ s}^{-1}$), wodurch sich entsprechend niedrige Affinitäten der LiPoLis im mikromolaren Bereich ergeben. Das beschriebene Bindungsverhalten lässt sich beispielsweise anhand der Sensorgramme von **3a**, **3e** und **3o** nachvollziehen (Abb. 18B-D).

Eine Substitution des Phenethylrestes in 4-Position der Chinazolin-basierten LiPoLis durch Bioisostere in Form von Thiophenen (**3d,e**) oder durch Fluorphenyl-Reste (**3f-h**) resultierte in reproduzierbaren und mit denen der Parentalsubstanz **3a** vergleichbaren Sensorgrammen (Abb. 18B-D). Der Difluorphenyl-derivatisierte Analyt **3j** zeigte jedoch als einziger 4-modifizierter LiPoLi einen Verlust der Affinität zum Protein.

Für die mit Löslichkeit-vermittelnden Gruppen am 2-Phenylring versehenen Chinazoline **3n,o** wurden zum Teil eine vergleichsweise langsamere Assoziation ($k_{\text{on}} = 209.7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$, $146.5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ vs. $8460\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ für **3a**) und dementsprechend hohe Werte für K_{D} ($238\text{ }\mu\text{M}$, $501\text{ }\mu\text{M}$ vs. $33.5\text{ }\mu\text{M}$ für **3a**) detektiert. Diese Ergebnisse weisen dennoch darauf hin, dass die Einführung sterisch anspruchsvoller Gruppen an dieser Position, wie bspw. Morpholin- und Acetylpiperazin-Ringe, bzgl. der Bindung an p38 α toleriert wird. Im Fall von **3l** wurde keine (vollständige) Dissoziation des Analyten, sowohl von der Referenz- als auch der aktiven Sensoroberfläche, beobachtet. Dies ist vermutlich auf unspezifische Bindung zurückzuführen. Im Sensorgramm äußerte sich dieses Verhalten als Quasi-Irreversibilität ($k_{\text{off}} = 5.3 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ vs. $2.8 \cdot 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ für **3a**), was zu einer Maskierung des vermeintlichen Bindungssignals führte (Abb. 18E).

Zusammenfassend wurde ein SPR-Assay zur Charakterisierung von Bindern (ATP-kompetitive Inhibitoren und LiPoLis) der MAPK p38 α erfolgreich etabliert, indem mittels Synthese von speziellen trisNTA-Chelatoren und Herstellung entsprechender Sensoren die Dissoziation Poly-His-markierter Proteine von der Sensoroberfläche im Vergleich zu herkömmlichen NTA-Sensoren minimiert wurde. Zu den Vorteilen dieser Methode zählt u.a. die prinzipiell einfache Immobilisierung diverser Liganden, für die lediglich ein oftmals bereits im Rahmen der Proteinreinigung verwendeter His-tag erforderlich ist. Die generierten Sensoren sind aufgrund der reversiblen Wechselwirkung zwischen Ni²⁺-NTA und Poly-Histidin nach Komplexbildung der Nickelionen mit EDTA regenerierbar und generell mehrfach wiederverwendbar.

Die Charakterisierung der LiPoLis mit Hilfe dieses Assays ließ basierend auf der beobachteten Antwort im Sensorgramm Rückschlüsse auf tolerierte Substitutionsmuster hinsichtlich der Adressierung von p38 α zu. Eine Auswertung der Messungen lässt allerdings auf eine allgemein geringe Affinität der Analyten im mikromolaren Bereich schließen. Diese Ergebnisse sollten nachfolgend in orthogonalen Assays (TSA, MST, BLI) validiert werden.

3.3.2 Thermal-Shift-Assay

3.3.2.1 Theoretischer Hintergrund

Bei dem Thermal-Shift-Assay handelt es sich um eine Methode zur Detektion und Messung von Proteinentfaltung über die Bestimmung des Schmelzpunktes (T_m).^[187] Dafür werden spezielle, fluoreszierende Farbstoffe (wie z.B. SYPRO® Orange^[188]) benutzt, die in wässriger Lösung zunächst eine gedämpfte Fluoreszenz aufweisen, in hydrophober Umgebung jedoch hochintensiv „leuchten“, wie z.B. nach Anlagern an die sich nach außen kehrenden, lipophilen Bereiche von denaturierenden Proteinen. Die Bindung von Analyten an zu untersuchende Liganden (Proteine) induziert die Stabilisierung bestimmter Konformationen und bewirkt damit einhergehend eine Schmelzpunkterhöhung, was bei der Charakterisierung von Bindungsereignissen genutzt werden kann.^[189-190]

Die beobachtete Fluoreszenz erreicht in Gegenwart von sich entfaltenden Proteinen bei einer bestimmten Temperatur ein Maximum und nimmt bei fortwährender Denaturierung aufgrund von mit der Protein-Aggregation verbundenen Dissoziation des Farbstoffs wieder ab (Abb. 19). Der entsprechende Schmelzpunkt lässt sich aus dem Wendepunkt der so erhaltenen Schmelzkurve, d.h. dem Bereich zwischen Basislinie und Fluoreszenz-Maximum, bestimmen. Aus der Differenz der bestimmten Schmelztemperaturen vom Apoprotein und dem mit Analyt inkubiertem Protein lässt sich der Thermal-Shift (ΔT_m) berechnen, der i.d.R. mit der Affinität des untersuchten Analyten korreliert ($\Delta T_m \sim K_D$) und ab einem Unterschied von ca. 2 °C als signifikant angesehen wird.^[191-192]

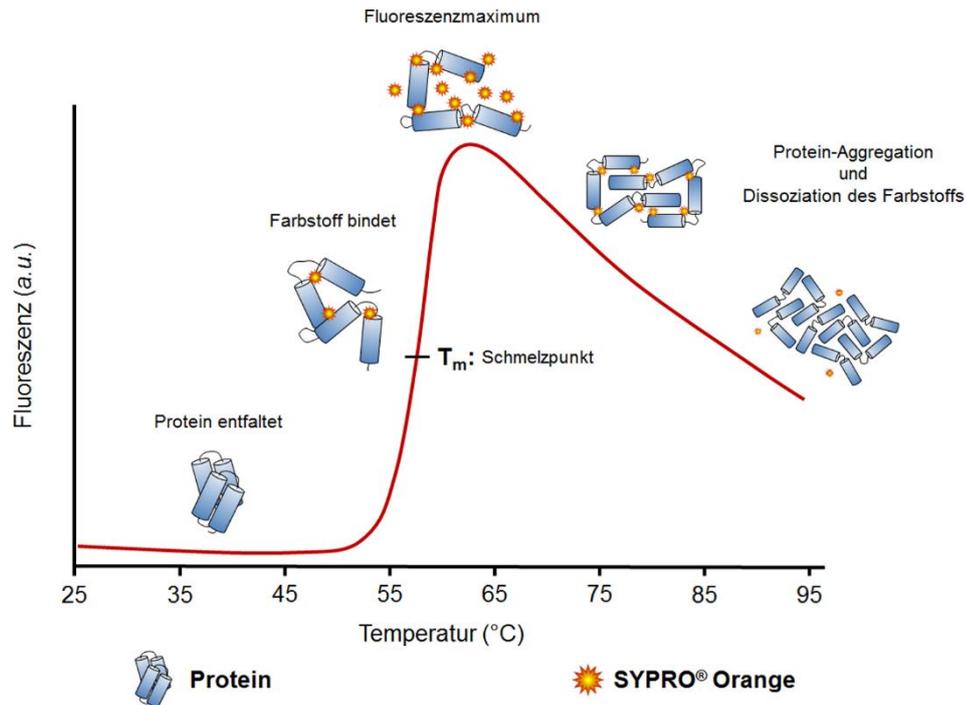


Abb. 19: Schematische Darstellung einer Protein-Schmelzkurve. Detektion der Temperatur-abhängigen Denaturierung durch Fluoreszenz des Farbstoffs SYPRO® Orange (verändert nach wikiwand.com).

3.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Erste TSA-Experimente wurden mit den ATP-kompetitiven Inhibitoren SB203580, Skepinone-L und BIRB 796 nach Inkubation mit p38 α durchgeführt. Proben mit DMSO anstelle von Analyt dienten dabei zur Bestimmung der T_m des Apoproteins in Abwesenheit von Bindern. Als Negativkontrolle erfolgte eine Messung mit H₂O statt Protein, die eine stabile Basislinie, d.h. keine Veränderung der Temperatur zeigte.

Es wurden signifikante Schmelzpunkterhöhungen für die eingesetzten Inhibitoren detektiert, wobei das Ausmaß des Thermal-Shift gut mit den beschriebenen Affinitäten der Analyten korreliert; d.h. je höher die beobachtete Schmelztemperatur, desto potenter war i.d.R. der dem Protein zugefügte Inhibitor (Abb. 18, Tab. 7).^[74,182] Der TSA stellt somit eine geeignete Methode für die Charakterisierung von Bindern der MAPK p38 α dar und wurde folglich für Messungen mit LiPoLis verwendet.

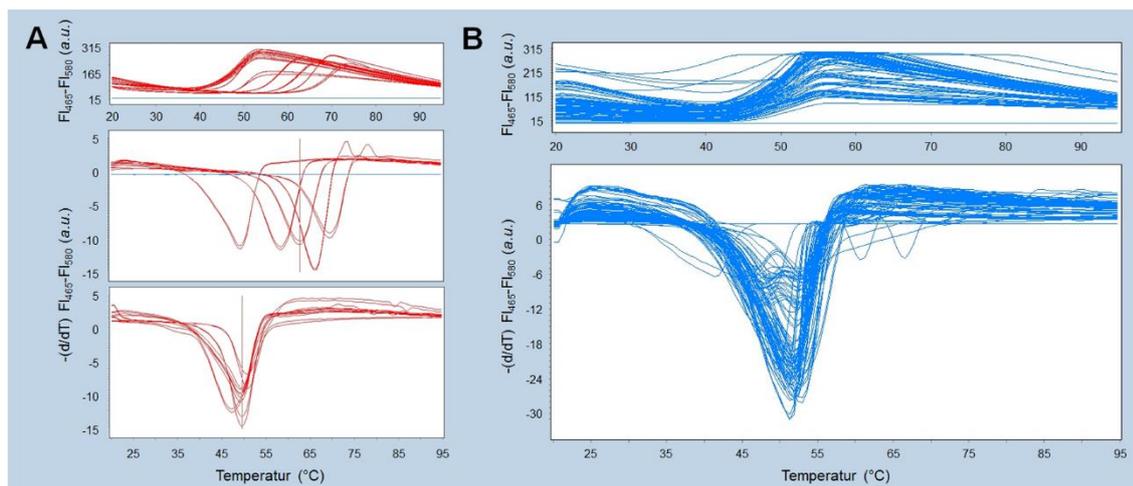


Abb. 20: Schmelzkurven von p38 α in Gegenwart von ATP-kompetitiven Inhibitoren und LiPoLis. A) oben: Schmelzkurven von p38 α in Gegenwart von H₂O (blau), DMSO, SB203580, Skepinone-L und BIRB 796 sowie den LiPoLis BOG, **1**, **3a**, **3e**, **3o**; mittig: Ableitungen der Schmelzkurven für H₂O (blau), DMSO und die ATP-kompetitiven Inhibitoren SB203580, Skepinone-L und BIRB 796; unten: Ableitungen der Schmelzkurven für DMSO und die LiPoLis BOG, **1**, **3a**, **3e**, **3o**; B) oben: Schmelzkurven von p38 α in Gegenwart von den synthetisierten LiPoLis; unten: Ableitungen der Schmelzkurven für die synthetisierten LiPoLis.

Sämtliche Chinazolin-basierten Nitro- und Amin-Derivate, als auch die als Referenzsubstanzen eingesetzten BOG und **1**, zeigten keine signifikante Änderung der Schmelztemperatur im Vergleich zur Probe mit DMSO, d.h. lediglich Unterschiede von < 2 °C. Exemplarisch wurden hierfür die Thermal-Shifts für BOG, **1**, **3a**, **3e**, **3o** berechnet (Tab. 7).

Tab. 7: Schmelztemperaturen und Thermal-Shifts der ATP-kompetitiven Inhibitoren und einer Auswahl an LiPoLis; T_m: Schmelztemperatur, Δ T_m: Thermal-Shift; die Konzentration der Analyten betrug jeweils 10 μ M.

	T _m (°C)	Δ T _m (°C)
DMSO	49.3	-
SB203580	61.2	11.9
Skepinone-L	67.6	18.3
BIRB 796	65.2	15.9
BOG	49.1	-0.2
1	49.1	-0.2
3a	50.3	1
3e	47.9	-1.4
3o	49.4	0.1

Die detektierten Schmelzkurven sowie insb. deren Ableitungen sind untereinander annähernd deckungsgleich. Ferner sind auch bzgl. des Verlaufs der Schmelzkurven keine Unterschiede zur Messung in Gegenwart von DMSO zu beobachten und liefern somit keine Hinweise auf eine (teilweise) Stabilisierung der Kinasekonformation durch die LiPoLis. Die Ergebnisse unterstützen demnach die auf Basis der SPR-Experimente getroffenen Schlussfolgerungen, deren zufolge die Affinität der Analyten zu gering ist, um im TSA eine Bindung an p38 α zu detektieren.

Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zur SPR liegt in der Aufnahme und Auswertung der Schmelzkurven in Thermocyclern, wodurch die parallele Messung verschiedener Proben in Mikrotiter-Platten ermöglicht wird. Ferner lassen sich aufgrund der graduellen Temperatur-Erhöhung mehrstufige (Entfaltungs-)Prozesse oder thermale Übergänge einer breiten Vielzahl von Proteinen in An- bzw. Abwesenheit von Analyten auflösen. Allerdings ist die Denaturierung der Liganden i.d.R. nicht reversibel, sodass mittels TSA keine Bestimmung von Kinetiken möglich ist. Außerdem wird mit dem fluoreszierenden Farbstoff eine weitere Komponente in das Testsystem eingebracht, die einen möglichen Einfluss auf die zu untersuchende molekulare Wechselwirkung haben kann. Diesbezüglich stellen andere Methoden Alternativen dar, bei denen der Ligand selbst mit Fluorophoren markiert wird oder Fluoreszenz von Proteinen genutzt werden kann, wie bspw. *Microscale*-Thermophorese.

3.3.3 *Microscale*-Thermophorese

3.3.3.1 Theoretischer Hintergrund

Unter Thermophorese versteht man die gerichtete Bewegung von Molekülen in einem Temperaturgradienten in Abhängigkeit ihrer Größe, Ladung und Hydratationshülle.^[193] Eine Wechselwirkung von Analyten mit Liganden bewirkt eine Änderung dieser Parameter, wodurch ein unterschiedliches Verhalten von freiem Ligand und gebundenem Komplex im Temperaturgradienten beobachtet werden kann.^[194-195]

Experimentell wird eine entsprechende Probe in einer Glas-Kapillare punktuell mit einem Infrarot (IR)-Laser erhitzt und dadurch ein lokales Thermophorese-Ereignis hervorgerufen. Dies führt einerseits zur Diffusion der Moleküle in Lösung aus dem Bereich erhöhter Temperatur und darüber hinaus zur Anregung von Fluorophoren in der Probe durch den Laser, deren emittierte Fluoreszenz detektiert werden kann (Abb. 21).

Hierzu kann entweder die Markierung von Liganden/Analyten mit Fluorophoren erfolgen oder die Eigenfluoreszenz von Molekülen genutzt werden (Markierungs-frei). Nach Erreichen eines Fließgleichgewichtes bei anhaltender Erhitzung findet im Zuge der Abkühlung durch Abschalten des Lasers eine Rückdiffusion aufgrund Brown'scher Molekularbewegung statt. Um die Diffusion der Probenmoleküle im Temperaturgradienten zu verfolgen und zu quantifizieren, muss entweder eine vorherige Fluorophor-Markierung einer der Wechselwirkungspartner stattfinden oder der Ligand bzw. der Analyt Eigenfluoreszenz^[196] aufweisen. MST-Messungen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Analyt ermöglichen die Bestimmung von Dissoziationskonstanten anhand der Unterschiede im thermophoretischen Verhalten.

3.3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Charakterisierung einer kleinen Auswahl an LiPoLis (**1**, **3a,n**) erfolgte im Rahmen einer Geräte-Demonstration der Firma NanoTemper mit dem Ziel, MST als eine geeignete orthogonale Methode zur SPR zu evaluieren. Auf eine Messung mit ATP-kompetitiven Inhibitoren wurde aus organisatorischen Gründen verzichtet. Der Ligand p38 α wurde zunächst unter Verwendung von Cystein-reaktiven Reagenzien mit einem Fluorophor des Herstellers markiert.

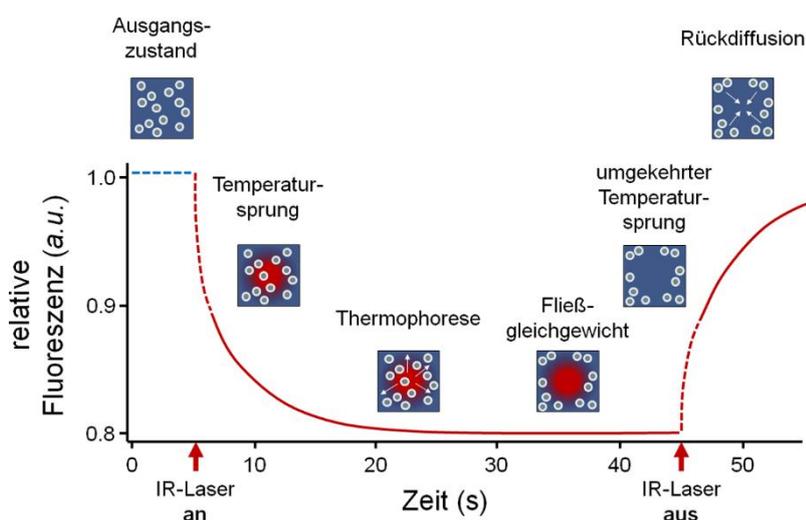


Abb. 21: Schematische Darstellung einer Thermophore-Messung. Die Fluoreszenz eines in der Probe befindlichen Fluorophors wird zeitabhängig nach Anregung durch einen IR-Laser verfolgt. Durch die lokale Erwärmung kommt es zu einer gerichteten Bewegung der in Lösung befindlichen Moleküle sowie nach Abkühlen zu deren Rückdiffusion (verändert nach Jerabek-Willemsen *et al.*^[193]).

Die Referenzverbindung **1** zeigte unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine konzentrationsabhängige Änderung der detektierten Fluoreszenz, weshalb in diesem Fall keine Affinität bestimmt werden konnte. Bei der höchsten Analyt-Konzentration (37.5 μM) wurde zudem eine Zunahme des Fluoreszenz-Signals nach bereits 5 s beobachtet, was als Anlagerung des Liganden an die Kapillarwand interpretiert werden kann.

In Gegenwart vom 2-Phenylchinazolin **3a** wurde hingegen eine klare Abhängigkeit zwischen Analyt-Konzentration und resultierender Fluoreszenz detektiert. Aus den erhaltenen Daten ließ sich ein K_D von 2.38 μM bestimmen. Ähnlich zu den Messungen mit **1**, obgleich weniger signifikant, wurde bei hohen Analyt-Konzentrationen (37.5 μM , 75 μM) ein Anstieg der Fluoreszenz noch vor Abschalten des IR-Lasers beobachtet.

Versuche in Anwesenheit von dem mit einer Löslichkeits-vermittelnden Gruppe versehenen LiPoLi **3n** zeigten ebenfalls eine Zunahme der Fluoreszenz mit steigender Konzentration, wobei hier in der gesamten Serie keine Unregelmäßigkeiten auftraten. Eine genaue Ableitung eines K_D -Werts war jedoch nicht möglich, da der abgedeckte Konzentrationsbereich lediglich eine Abschätzung der Affinität auf $> 10 \mu\text{M}$ zuließ.

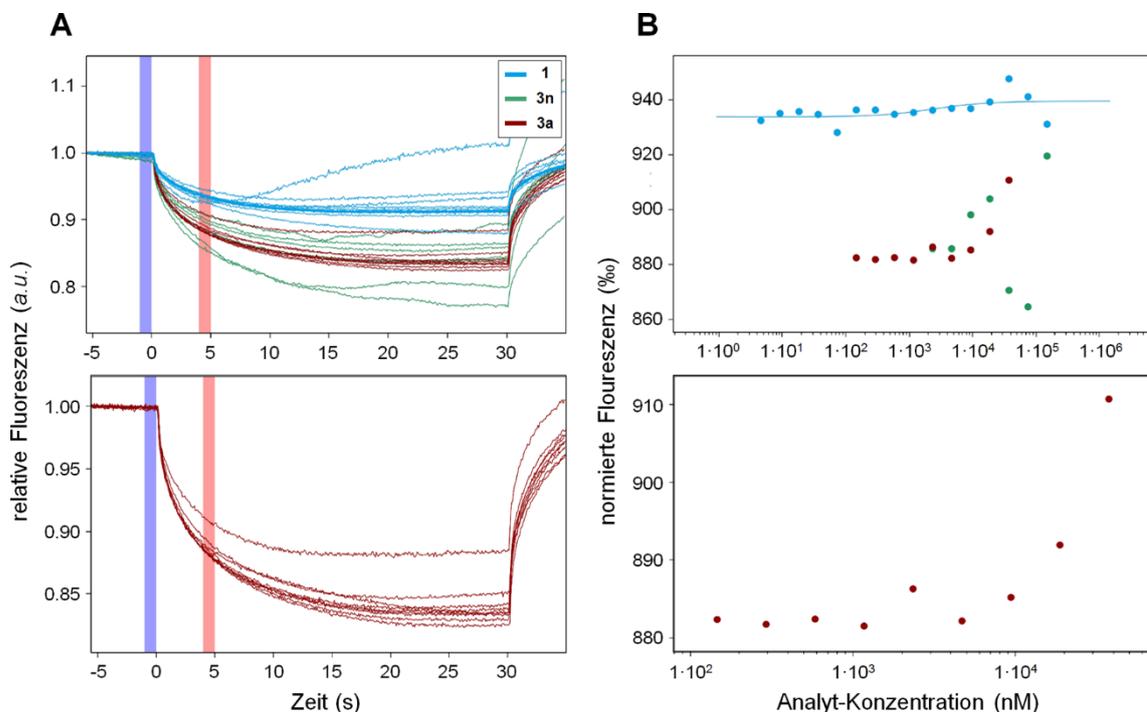


Abb. 22: MST-Messungen mit Fluorophor-markiertem p38 α und den LiPoLis **1** (blau), **3n** (grün) und **3a** (rot) als Analyten. A) Zeitabhängige Detektion der Fluoreszenz; oben: Thermophorese aller drei Analyten; unten: Thermophorese von **3n**; Beginn des Temperatursprungs (0 s, blauer Balken), gewählter Zeitpunkt zur Auswertung der Fluoreszenzänderung (5 s, roter Balken); B) Konzentrationsabhängige Änderung der normierten Fluoreszenz; oben: Auftragung für **1** (146 nM - 37.5 μM) und **3a,n** (2.34-150 μM); unten: Auftragung für **3a**.

Aufgrund der beobachteten Fluoreszenz-Signale für Proben nach Inkubation mit **1** und **3n** wurde eine Anlagerung des markierten Proteins an die Wände der Kapillaren vermutet. Die Ursache hierfür könnte auf eine limitierte Löslichkeit der Analyten zurückzuführen sein, die sich an die Oberfläche des Liganden lagern und auf diese Weise eine Aggregation verursachen. Ähnliche Schlussfolgerungen ließ ebenfalls eine Analyse der aus den SPR-Experimenten erhaltenen Sensorgramme zu. In den MST-Versuchen wurden bereits Kapillaren mit einer Beschichtung genutzt, die speziell für lipophile Analyten entworfen wurden, um bspw. Protein-Anlagerungen zu verhindern. Ein Vergleich der Messungen mit **3a,n** weist allerdings darauf hin, dass die Einführung von solvatisierenden Gruppen zu keiner Unterbindung der beobachteten Effekte führt. Der für diese Analyten bestimmte K_D liegt ferner im mikromolaren Bereich und steht somit im Einklang mit den Ergebnissen der vorherigen Assay-Methoden. Zusammenfassend könnte diese Methode demnach für bestimmte LiPoLis geeignet sein, um diese hinsichtlich der Affinität zu p38 α zu charakterisieren. Weiterführende Studien im Rahmen dieser Arbeit waren nicht realisierbar, da das Gerät nicht durchgängig zur Verfügung stand.

Ein potentieller Vorteil von MST kann bei vorhandener intrinsischer Fluoreszenz einer der Interaktions-relevanten Probenkomponenten die labelfreie Durchführung der Messung sein. Hierfür ist allerdings ein speziell darauf ausgelegtes Modell des Instruments notwendig. Davon abgesehen stellt die Reaktion mit Markierungsreagenzien eher einen Nachteil dar, da eine Beeinträchtigung der zu untersuchenden Wechselwirkung nicht ausgeschlossen werden kann. In einem MST-Experiment befinden sich zwar sowohl Analyt als auch Ligand in Lösung, wodurch immobilisierungsfrei gearbeitet werden kann, allerdings ist keine Echtzeitmessung der Interaktion, wie bspw. mittels SPR oder BLI, möglich.

3.3.4 Bio-Layer-Interferometrie

3.3.4.1 Theoretischer Hintergrund

Als Interferometrie wird im Allgemeinen der Vergleich von Phasenunterschieden zwischen mehreren optischen Strahlen (Wellen) zur Charakterisierung verschiedener physikalischer Parameter bezeichnet. Diese Methode kann zur Untersuchung (bio)molekularer Interaktionen genutzt werden, indem Änderungen im Interferenzmuster von weißem Licht gemessen werden, das von einer Oberfläche reflektiert wird.^[197] Hierzu kann bspw. die Spitze einer optischen Faser genutzt werden, an der die entsprechende Wechselwirkung stattfindet.

Das Licht passiert dabei ungehindert den Großteil der Faser und nur ein Teil wird an den vorhandenen Grenzflächen zurückgeworfen. Einerseits handelt es sich um eine interne Referenz-Oberfläche des Sensors, und weiterhin um die Grenzfläche zwischen Liganden-tragender Schicht und Lösung(smittel), die den Sensor umgibt (Abb. 23A). Das Interferenzmuster des reflektierten Lichts wird dann von einem Photodetektor registriert. In Abwesenheit von Analyten ist hierbei eine Basislinien-Messung zu erwarten, wohingegen bei Bindung von Substanzen an die zweite Grenzfläche aufgrund der einhergehenden Schichtdickenzunahme die optische Dichte des *Bio-Layers* zunimmt und sich die Interferenz ändert, die Reflexe an der internen Referenz jedoch konstant bleiben. Aus der Intensitätsmessung in Abhängigkeit zur detektierten Wellenlänge ergibt sich das resultierende Interferenzmuster (Abb. 23B). Eine Betrachtung der Wellenlängen- bzw. Schichtdickenänderung über die Zeit führt zu einer direkten und leichter interpretierbaren Darstellung des an dem Sensor stattfindenden Bindungsereignisses hinsichtlich Assoziations- und Dissoziationsphasen (Abb. 23C). Bei konzentrationsabhängiger Messung der Analyten kann hieraus eine Berechnung der Affinität in Form von K_D -Werten über entsprechende mathematische Fit-Modelle erfolgen.

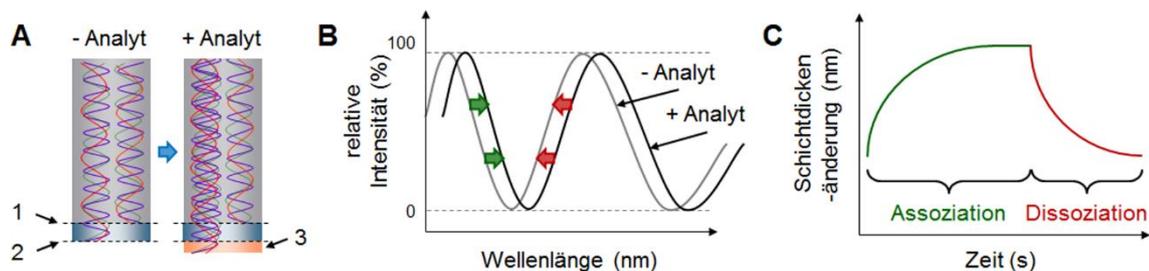


Abb. 23: Messprinzip eines BLI-Experiments. A) Interferenz in optischer Faser durch Reflexion an internen (1) sowie Bio-Layer-/Lösungsmittel-Grenzflächen in Abwesenheit (2, Basislinie) und Gegenwart (3) eines Analyten; B) Die Bindung von Analyten an Bio-Layer führt zu einer Änderung der Wellenlänge der detektierten Interferenz; C) Die Messung der zeitabhängigen Interferenzänderung spiegelt Bindung des Analyten zu immobilisierten Liganden auf der Sensoroberfläche wider, welche als Schichtdickenzunahme ausgedrückt werden kann (verändert nach fortebio.com).

3.3.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Die BLI-Messungen wurden ebenfalls im Rahmen einer Geräte-Demonstration durchgeführt. Hierbei wurde die Interaktion von sechs verschiedenen Analyten, SB203580 als ATP-kompetitive Substanz und fünf LiPoLis, mit biotinyliertem p38 α charakterisiert, welches analog zu den SPR-Experimenten hergestellt wurde. Zur Immobilisierung wurden spezielle Streptavidin (SAv)-Sensoren der Firma Pall ForteBio verwendet, die insb. zur Detektion von Wechselwirkungen mit niedermolekularen Substanzen entwickelt wurden.

Zunächst wurde der BLI-Assay mit SB203580 durchgeführt und ein K_D von 2.9 nM bestimmt, der mit Literaturwerten und den Ergebnissen der vorherigen Experimente gut übereinstimmt (Abb. 24A, Tab. 8).^[182-183] Das Signal der ersten Messung mit 15.7 nM Analyt liegt über den detektierten Schichtdickenänderungen der übrigen Konzentrationen. Dies kann als geringfügige, irreversible Adsorption an den Sensor und daraus folgende Blockierung von Bindungsstellen gedeutet werden. Dieser Effekt wurde in den nachfolgenden Messungen nicht beobachtet und stattdessen ein stabiles Fließgleichgewicht in Form eines Plateaus im Interferogramm erreicht.

Die Referenzsubstanz **1** zeigte im Einklang mit den vorhergegangenen Versuchen keine Bindung an das immobilisierte Protein (Abb. 24B). Im Gegensatz dazu konnten für die Chinazolin-basierten LiPoLis **3a**, **3e**, **3l** und **3n** aus den jeweils konzentrationsabhängigen Signalen Dissoziationskonstanten im hauptsächlich mikromolekularen Bereich bestimmt werden (Abb. 24C-F, Tab. 8). Auch diese Ergebnisse sind mit denen der zuvor erfolgten Messungen konform, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen Parentalsubstanz **3a** und dem Bioisoster **3e** sowie

Derivat **3l** beobachtet wurden ($K_D = 13 - 32 \mu\text{M}$). Lediglich mit Einführung einer Löslichkeits-vermittelnden Morpholin-Gruppe am 2-Phenylring des Grundgerüsts wurde eine Abnahme der Affinität zu p38 α festgestellt ($K_D = 21 \text{ mM}$; Tab. 8). Dieser Effekt korreliert ebenfalls mit Beobachtungen aus den SPR- und MST-Messungen.

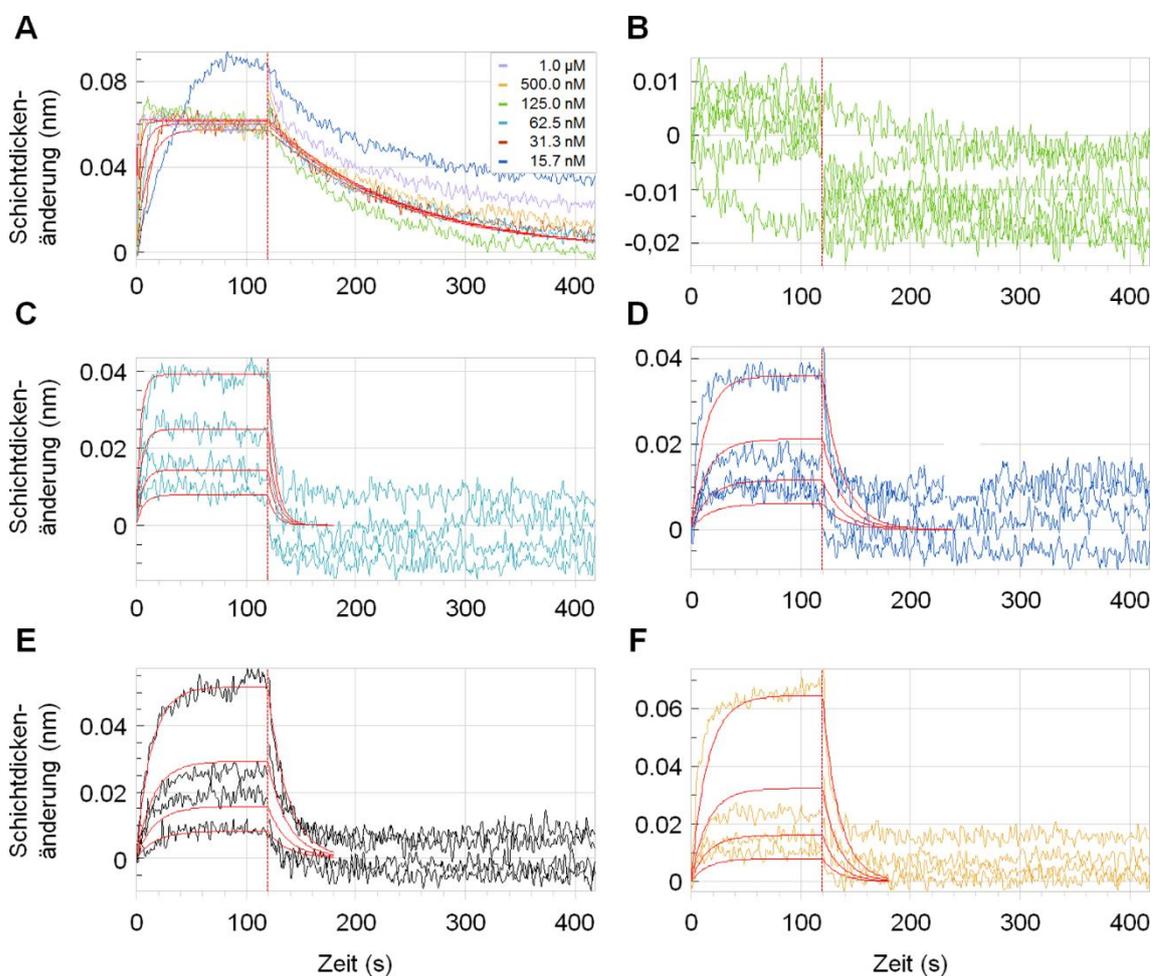


Abb. 24: Interferogramme der BLI-Assays mit biotinyliertem p38 α auf SAV-Sensoren. Interferogramme von A) SB203580, B) **1**, C) **3a**, D) **3e**, E) **3l**, F) **3n**; eingesetzte Analytkonzentrationen reichten von 16 nM - 1 μM (SB203580) bzw. 1.25-10 μM (LiPoLis); angelegtes Fit-Modell (rot).

Tab. 8: Bestimmte Dissoziationskonstanten und Parameter zur Fit-Qualität aus der Charakterisierung von SB203580, **1** und **3a,e,l,n** im BLI-Assay mit biotinyliertem p38 α auf SAV-Sensoren.

	K_D (M)	χ^2 (nm ²)	R^2
SB203580	$2.9 \cdot 10^{-9}$	$88 \cdot 10^{-3}$	0.90
1	n.b.		
3a	$13.0 \cdot 10^{-6}$	$19 \cdot 10^{-3}$	0.90
3e	$23.0 \cdot 10^{-6}$	$82 \cdot 10^{-3}$	0.87
3l	$32.0 \cdot 10^{-6}$	$089 \cdot 10^{-3}$	0.95
3n	$1.7 \cdot 10^{-3}$	$21 \cdot 10^{-3}$	0.92

n.b.: keine Bindung (*no binding*)

Zusammenfassend konnte BLI als eine geeignete Ergänzung zu SPR als Assay-System für die Charakterisierung von LiPoLis und Bindern von p38 α im Allgemeinen herangezogen werden. Insbesondere unter Berücksichtigung der Fit-Qualität, gemessen an χ^2 und dem Korrelationskoeffizienten R^2 , konnten mit diesem System aussagekräftige Daten generiert werden (Tab. 8). Generell zeigte sich jedoch eine niedrige Intensität der Interferenz und daher verrauschte Signale, was eine häufige Herausforderung bei der Detektion von Wechselwirkungen zwischen niedermolekularen Substanzen und Proteinen darstellt. Allerdings war ebenso eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit erkennbar. Damit wurde ein ähnliches Verhalten wie in den vorherigen SPR-Experimenten beobachtet, was sich auf die großen Unterschiede in den Molekulargewichten zwischen Analyten und Liganden gemäß der Beziehung (2) zurückführen lässt, die in vergleichbarer Weise auch für BLI gilt. Aufgrund der zeitlichen Begrenzung der Geräte-Vorführung war keine eingehendere Charakterisierung der LiPoLis im Rahmen dieser Arbeit möglich.

Die Informationen, die über eine bestimmte molekulare Interaktion hinsichtlich Geschwindigkeitskonstanten, Bindungsaffinität, thermodynamischen Parametern, etc. mittels der vielfältigen verfügbaren biochemischen und biophysikalischen Assay-Technologien erhalten werden können, geben jedoch keine Auskunft über die beobachtete Wechselwirkung zwischen Ligand und Analyt auf molekular Ebene. Darüber hinaus kann mit den hier verwendeten Methoden keine Aussage über die tatsächliche Adressierung der LP durch die LiPoLis getroffen werden, da lediglich die „globale“ Bindung an p38 α anstatt einer lokalisationspezifischen Interaktion detektiert wird. Für eine Struktur-basierte Entwicklung und Optimierung von niedermolekularen Substanzen für den Einsatz als Wirkstoffe oder potente Inhibitoren bzw. als Sondenmoleküle ist die Kenntnis über den genauen Bindungsmodus der untersuchten Strukturen besonders wertvoll. Kristallographische Methoden ermöglichen bspw. die atomare Auflösung von Protein-Komplexen und somit einen detaillierten Einblick in die zu Grunde liegenden Wechselwirkungen sowie Liganden-induzierte konformative Änderungen und stellen somit ein maßgebliches Verfahren zur Validierung molekularer Interaktionen dar.

Mit den synthetisierten LiPoLis und p38 α wurden daher Ko-Kristallisations-Experimente durchgeführt, um die Arbeitshypothese zu bestätigen, dass die entworfenen Derivate der Chinazolin-basierten Liganden weiterhin die LP adressieren.

3.4 Strukturbiologische Charakterisierung

Es wurden mit sämtlichen synthetisierten LiPoLis Kristallisations-Ansätze durchgeführt, einschließlich der vermeintlichen „Nicht-Binder“, um potentiell einen möglichst diversen Satz an Komplex-Strukturen erhalten zu können, bzw. die Ergebnisse der biophysikalischen Charakterisierung umfassend zu validieren. Im Rahmen dieser Experimente wurden verschiedene Bedingungen und Strategien verfolgt, die zur erfolgreichen Ko-Kristallisation strukturell unterschiedlicher Liganden im Komplex mit p38 α führten.

Zum einen erfolgten entsprechende Versuche in Gegenwart vom Detergens BOG, das häufig als Additiv in Kristallisations-Ansätzen verwendet wird.^[198] Diese Vorgehensweise stellte vor allem für Experimente mit ATP-kompetitiven Inhibitoren ein erfolgreiches System dar (siehe Kapitel 5) und führte i.d.R., unabhängig vom eingesetzten Liganden, zur Bildung nadelförmiger Kristalle (Abb. 25A,B). Diese Bedingungen führten bspw. zur erfolgreichen Aufklärung der Strukturen von **3d,e** im Komplex mit p38 α . Im Zusammenhang mit der Kristallisation der Chinazolin-basierten LiPoLis stellte sich die Anwesenheit von BOG allerdings in vielen Fällen als nicht optimal heraus, da es ebenfalls die LP adressieren kann und daher entweder mit anderen Liganden in Konkurrenz treten oder deren Bindung negativ beeinflussen könnte. Oftmals wurde nach Auswertung entsprechender Datensätze die Tasche leer oder im BOG-gebundenen Zustand vorgefunden, obwohl das Protein im Rahmen der Experimente zunächst mit LiPoLis inkubiert wurde. Aus diesem Grund wurden alternative Ansätze ohne BOG verfolgt.

Eine direkte Ko-Kristallisation von p38 α mit LiPoLis in Abwesenheit des Detergens in der Reservoir-Lösung führte in einigen Fällen zur Entstehung von kubischen Kristallen (Abb. 25B,D). Die unter diesen Bedingungen beobachtete neue Morphologie in Gegenwart von **3i**, **3o** **3t** und **3u** hatte keine veränderten Abmessungen der Einheitszelle im Vergleich zu den ansonsten erhaltenen Nadeln zur Folge. Alle Kristalle, die auf diese Weise erhalten wurden, wiesen nach Aufnahme und Prozessierung der entsprechenden Datensätze die jeweiligen Liganden in der LP auf. Die Kristall-Morphologie konnte demnach hinsichtlich der positiven Besetzung der Tasche als Indikator für eine positive Ko-Kristallisation genutzt werden.

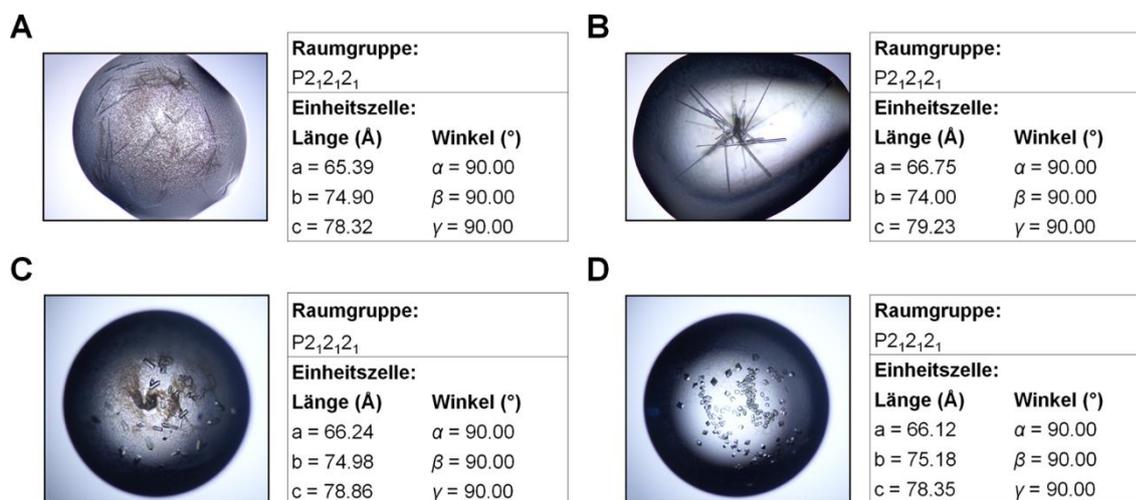


Abb. 25: Exemplarische Kristallbilder und Zellparameter unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Kristalle von p38 α in Gegenwart von A) BOG und Chinazolin-basierten LiPoLis, B) BIRB 796 und **3l** sowie LiPoLis C) **3n** und D) **3u**.

Weiterhin erfolgten Experimente, in denen das Protein mit ATP-kompetitiven Inhibitoren (in Gegenwart von LiPoLis) inkubiert wurden, die zur Stabilisierung einer bestimmten Kinasekonformation und damit ggf. zu einer begünstigten Keimbildung führen sollten. Unter Verwendung von BIRB 796, der als sehr potenter und hochaffiner Typ II-Binder von p38 α bekannt ist^[73], konnte auf diese Weise aus den resultierenden Nadeln erfolgreich die Komplex-Struktur von **3l** gelöst werden.

Als zusätzliche Alternative wurden *soaking*-Versuche mit unter den obigen Bedingungen erhalten Proteinkristallen durchgeführt. Hierfür wurden die Kristalle zunächst in Reservoir-Lösung gewaschen, um eine Dissoziation von ggf. gebundenen Liganden zu bewirken, und daraufhin in einem Tropfen mit Reservoir-Lösung, einer geringen Konzentration an Protein sowie dem jeweils zu ko-kristallisierenden Molekül überführt. Während der anschließenden Inkubation können Liganden in den Kristall diffundieren und in die Bindetasche des Proteins binden. Für die LiPoLis war dieser Ansatz jedoch nicht erfolgreich, führte allerdings zur erfolgreichen Ko-Kristallisation eines Kinaseinhibitors im Komplex mit p38 α (siehe Kapitel 5).

Generell wurde in den Experimenten mit den synthetisierten Liganden, unabhängig von der gewählten Methode, Kristallwachstum entweder spontan, d.h. direkt nach Ansetzen der Tropfen, oder innerhalb von 21 Tagen beobachtet. Zu den LiPoLis, die nicht kristallisiert werden konnten und zu sichtbarer Protein-Präzipitation führten, zählen im Allgemeinen alle Liganden, die kein primäres Amin in 7-Position tragen (d.h. sämtliche Nitro-Derivate **6a-r**, 7- und 8-(Sulfon-)Amide **7a-f** sowie 7-Alkylamine **8a-c**).

Vermutlich beeinträchtigt die Einführung sterisch anspruchsvoller Gruppen die Bindung der LiPoLis zum Protein bzw. bewirkt einen Rückgang der Affinität aufgrund des Verlusts wichtiger Wechselwirkungen wie z.B. die direkte WBB zwischen dem 7-Amin des Chinazolin-Grundgerüsts der LiPoLis und Asp294. Darüber hinaus wurden keine Kristalle für **1** und die Analoga **20a,b** erhalten. Die bisherigen Ergebnisse korrelieren insofern mit der biophysikalischen Charakterisierung, als dass die oben genannten Derivatisierungsmuster sowie die als Referenzverbindungen synthetisierten Substanzen keine Bindung in den jeweiligen Assays zeigten.

Zu den erfolgreich ko-kristallisierten Liganden zählten LiPoLis mit verschiedenen hydrophoben Substituenten in 4-Position des Chinazolin-Grundgerüsts. Insgesamt konnten vier entsprechende Strukturen gelöst werden, unter denen sich das Fluorphenyl-Derivat **3h**, die beiden Bioisostere **3d,e** sowie LiPoLi **3l** befanden, die sich hinsichtlich der Bindung der Liganden nicht wesentlich von den Kristallstrukturen von p38 α im Komplex mit **3a,b** unterschieden (Abb. 26A-D). Die charakteristischen Interaktionen zwischen LiPoLis und Kinase innerhalb der LP entsprachen dem für die Parentalsubstanzen beobachteten Bindungsmodus. Hierzu zählen insb. die π - π -Stapelwechselwirkung zwischen dem Chinazolin-Kern und der Seitenkette von Trp197, die direkte WBB zwischen dem primären Amin in 7-Position und Asp294 sowie ein Wasser-vermitteltes Netzwerk an WBBs mit den Aminosäuren in der Umgebung der Tasche. Letztere werden bspw. über Ser251 und Lys249 und teilweise über Glu336 des Symmetrie-Nachbarn im Kristall ausgebildet. Der in 4-Position eingeführte hydrophobe Substituent ragte in allen Fällen jeweils tief in das Innere der LP, ähnlich wie der Phenethyl-Rest in **3a**. Somit konnte gezeigt werden, dass die Tasche mit einer Vielfalt an Substituenten unterschiedlicher Form und Größe, und sowohl mit aromatischen als auch teilweise aliphatischen Resten (in **3l**) an dieser Stelle, adressiert werden kann.

Die allgemeinen Beobachtungen treffen auch auf das sterisch anspruchsvollste der kristallisierten Derivate (**3l**) zu, wobei keine signifikanten, konformativen Änderungen innerhalb der LP oder der Kinasedomäne festgestellt wurden. Allerdings war die Elektronendichte im Bereich des Cyclopropyl-Rings nicht eindeutig definiert, was auf eine gewisse Flexibilität dieses Restes und dementsprechend vorhandenen Freiraum in der Tasche hinweist. In Gegenwart von Difluorphenyl-Derivat **3i** konnte zwar die Bildung von Kristallen erzielt werden, welche jedoch sehr klein waren und keine Diffraktion im Röntgenbeugungsexperiment aufwiesen.^d

^d Die Ko-Kristallisation von **3d** war Bestandteil der Masterarbeit von Bianca Wiedemann.

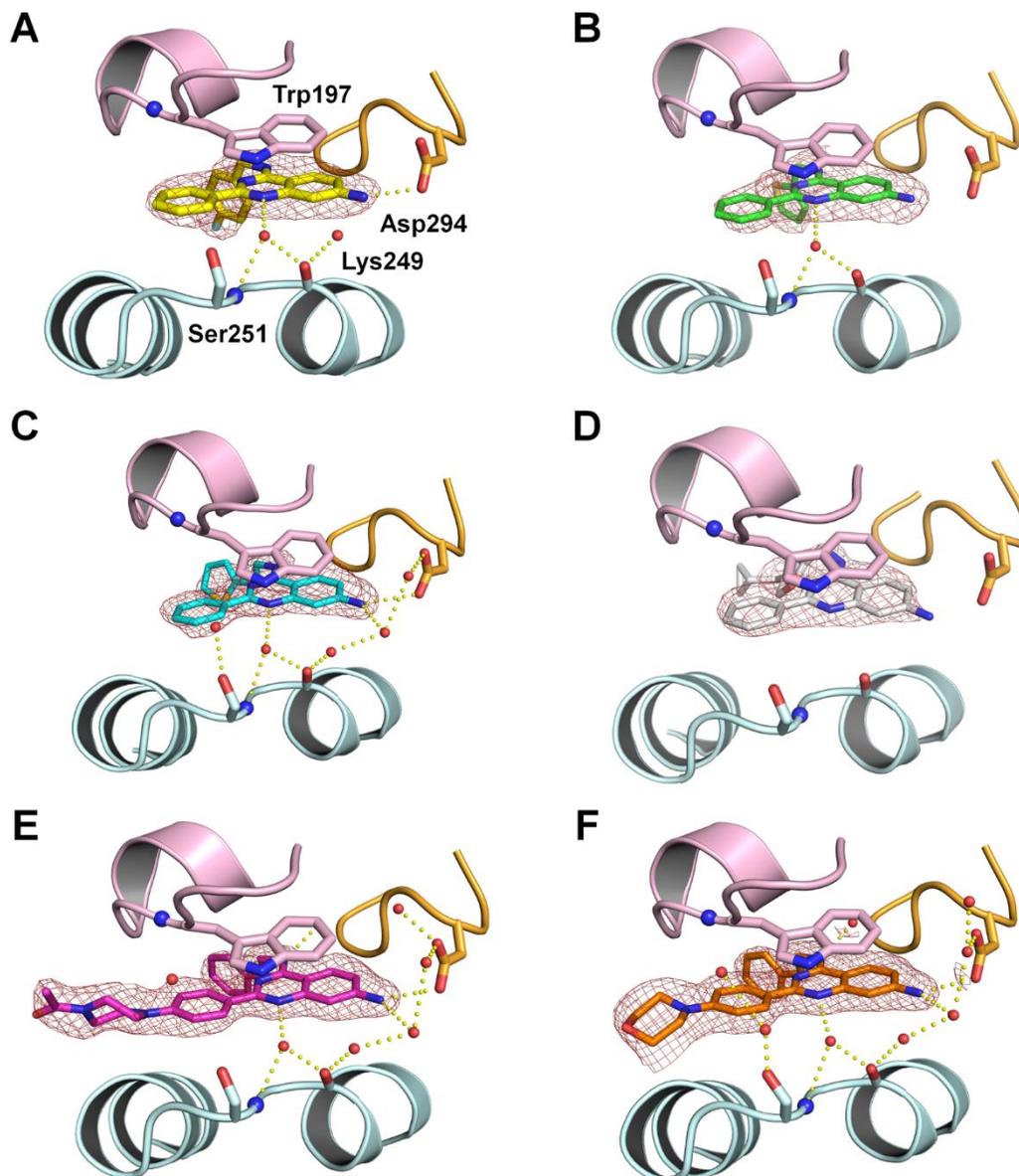


Abb. 26: Ko-Kristallstrukturen von LiPoLis im Komplex mit p38 α . Darstellungen von A) **3h** (2.4 Å; PDB: 5N63), B) **3d** (2.4 Å; PDB: 5N64), C) **3e** (2.0 Å; PDB: 5N65), D) **3l** (2.4 Å; PDB: 5N66), E) **3o** (1.9 Å; PDB: 5N67) und f) **3n** (1.85 Å; PDB: 5N68) in der LP der MAPK; 2mF_o-DF_c-Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte).

Von den LiPoLis, die am 2-Phenylring des Chinazolin-Kerns mit Löslichkeitsvermittelnden Gruppen versehen wurden, konnten **3n** und **3o**, die einen Morpholin- bzw. Acetylpiperazin-Rest an entsprechender Stelle trugen, erfolgreich ko-kristallisiert werden (Abb. 26E,F). In Gegenwart dieser Liganden konnten die vergleichsweise größten kubischen Kristalle und die Strukturen mit der höchsten Auflösung (1.9 Å, 1.85 Å) innerhalb der Serie generiert werden. Beide Komplexe entsprechen weiterhin dem Bindungsmodus, der bereits für die Parentalsubstanz und die 4-Aminoderivate beschrieben wurde. Die solvatisierenden Gruppen sind jeweils in Richtung des

umgebenden Solvens orientiert, wobei jedoch keine Kontakte zu Wasser-Molekülen beobachtet wurden. Damit konnte die im Rahmen des ursprünglichen Designs der LiPoLis getroffene Annahme bzgl. der Eignung des 2-Phenylrings zur Einführung von Substituenten in *para*-Position bestätigt werden. Die entsprechenden Reste können dabei die Dimension von flexiblen Ringsystemen annehmen, ohne bei Bindung in die LP unmittelbare, strukturelle Anpassungen innerhalb der Tasche hervorzurufen.

Im Vergleich der ko-kristallisierten Strukturen untereinander waren bemerkenswerterweise Änderungen in der Konformation zu erkennen (Abb. 27A). In Abhängigkeit von den gebundenen Liganden wurde ein unterschiedlicher Abstand zwischen den die LP umgebenden Sekundärstrukturelementen, den α -Helices 1L14 und 2L14 sowie der α EF/ α F-Schleife, festgestellt. Dies äußerte sich in einer teilweisen Öffnung der Tasche, die im Komplex mit **3e** am deutlichsten zu erkennen war (Abb. 27B). Diese Beobachtung stellt die ausgeprägte Flexibilität der LP heraus und unterstützt die Hypothese, dass komplexe, biologisch relevante Liganden, wie bspw. Substrate oder Interaktionspartner, diese Region adressieren könnten.

Zu den weiteren, erfolgreich im Komplex mit p38 α gelösten Strukturen zählt Acetamid-Derivat **3t**, auf dessen Basis der biotinylierte Ligand **3u** entworfen wurde und schließlich kristallisiert werden konnte (Abb. 28A,B). Allerdings erfolgte keine Kristallisation in Gegenwart von dem in 7-Position mit einem Biotin-PEG₄-Rest versehenen Chinazolin **7f**. Nach dem Ansetzen der Protein-Tropfen mit **3t,u** und ohne BOG wurde das Wachstum kleinerer Kristalle über einen breiten pH-Bereich (6.2 - 6.6) hinweg und bei verschiedenen Konzentrationen an Fällungsmittel (19 - 23 % PEG4000) beobachtet. Insgesamt betrachtet gelang unter Verwendung dieser LiPoLis die verlässlichste Generierung von reproduzierbaren, Liganden-gebundenen p38 α -Kristallen. Im Gegensatz dazu lief in Anwesenheit von anderen Liganden die Kristallisation unregelmäßiger und nur unter stringenteren, enger gefassten Bedingungen ab.

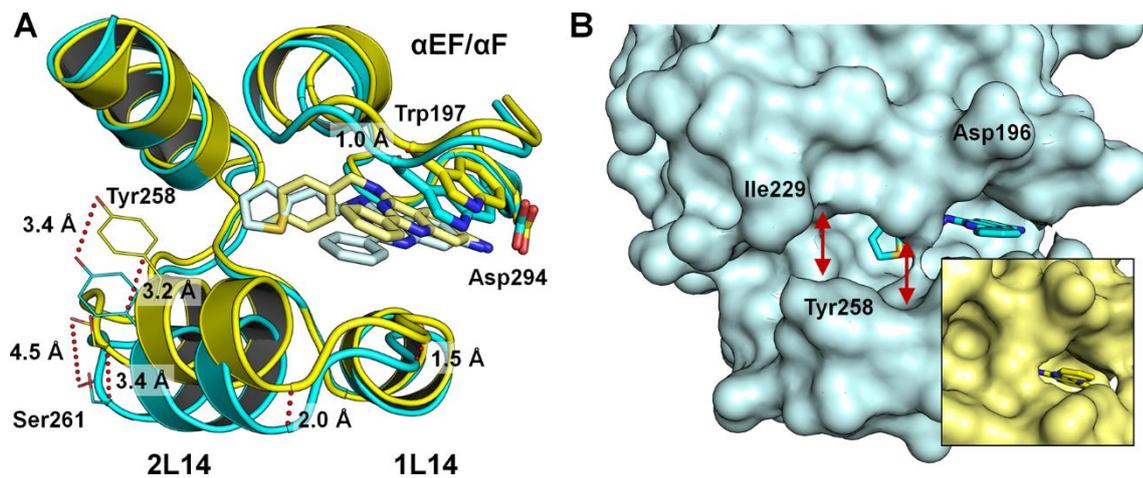


Abb. 27: Konformationsänderungen in der LP bei Adressierung durch LiPoLis. A) Überlagerung der Kristallstrukturen von **3e** (cyan) und **3h** (gelb) im Komplex mit p38 α ; relative Verschiebungen der α -Helix 1L14 und 2L14 sowie der α EF/ α F-Schleife (rot gestrichelte Linien); B) Öffnung der LP (rote Pfeile) in Gegenwart von **3e** (cyan) im Vergleich zur Struktur im Komplex mit **3h** (gelb).

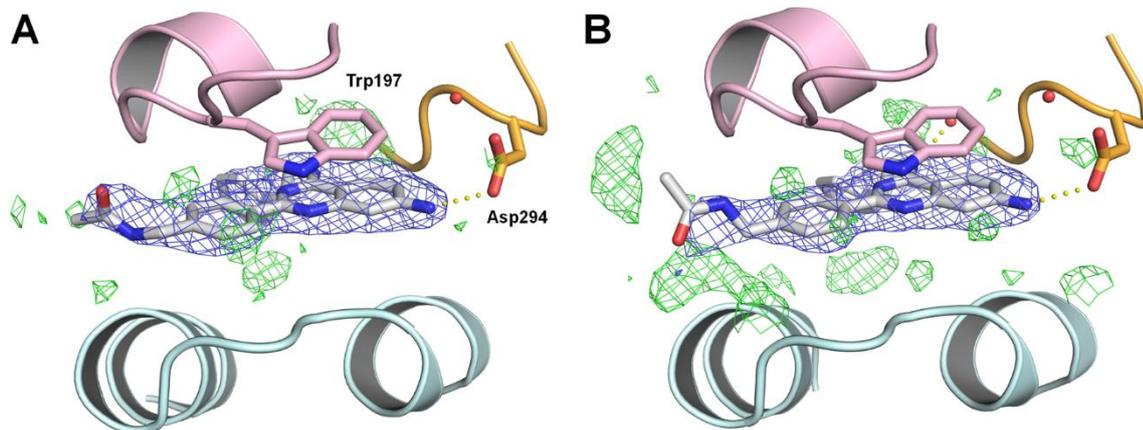


Abb. 28: Ko-Kristallstrukturen von LiPoLis im Komplex mit p38 α . Darstellungen von A) **3t** und B) **3u** in der LP der MAPK; Auflösungen reichen von 2.0 - 2.1 Å; mF_o-DF_c- (grün) und 2mF_o-DF_c-Elektronendichten (blau) wurden bei 2.5 σ bzw. 1.0 σ konturiert und bei einem *carve*-Parameter von 5.0 bzw. 1.6 um den selektierten Liganden dargestellt; Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte); (PDB: unveröffentlicht).

Der Bindungsmodus zeigt in beiden Fällen ebenfalls keine signifikanten Abweichungen zu den vorherig gelösten Strukturen. Ähnlich wie bei den Derivaten **3n,o** ist bei den LiPoLis **3t,u** der eingeführte Substituent in *para*-Position des 2-Phenylrings angebracht und nach Adressierung der LP in Richtung des Lösungsmittels orientiert. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen blieben auch nach Bindung der Liganden **3t,u** die charakteristischen Wechselwirkungen der Chinazolin-basierten LiPoLis innerhalb der Tasche erhalten. Die Anwesenheit der Substanzen resultierte weder in lokale noch Kinasedomäne-übergreifende konformative Anpassungen oder einem Einfluss auf die Symmetrie-Nachbarn im Kristall. Die Elektronendichte für den Biotin-PEG₄-Rest in **3u** war nicht aufgelöst, was auf die hohe Flexibilität des verknüpfenden

Linkers zurückzuführen ist (Abb. 28B). Entsprechend wurden zwar teilweise Bereiche positiver Differenzelektronendichte in der Peripherie der Bindungstasche angezeigt, die allerdings keine eindeutige Zuordnung der Orientierung des Substituenten erlaubten. Dennoch ist diese Struktur ein Indiz dafür, dass sogar sterisch anspruchsvolle Reste wie die große Biotin-PEG₄-Gruppe weiterhin eine Adressierung der LP ermöglichen.

Insgesamt konnten acht neue Ko-Kristallstrukturen der synthetisierten LiPoLis im Komplex mit p38 α erfolgreich gelöst und eine Bindung in die LP festgestellt werden. Auf diese Weise wurden sowohl das Design der entsprechenden Bibliothek basierend auf Parentalsubstanz **3a** als auch die Ergebnisse der biophysikalischen Charakterisierung validiert.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

3.5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der Struktur-basierten Entwicklung und Synthese von LiPoLis zur Adressierung der LP in der MAPK p38 α konnten insgesamt 49 Liganden mit 4-Amino-2-arylchinazolin-Grundgerüst über eine größtenteils allgemein anwendbare Reaktionssequenz hergestellt werden.

Zunächst erfolgte dabei die Analyse der Ko-Kristallstruktur von **3a** im Komplex mit der Kinase zur Identifikation potentieller Derivatisierungsstellen am Grundgerüst (Abb. 29A). Die anschließende Erzeugung der entworfenen Substanzen wurde durch Etablierung synthetischer Schlüsselschritte, insb. der Herstellung des Chinazolin-Kerns über Kondensation von Anthranilamiden mit diversen Benzaldehyd-Bausteinen sowie der milden HCCP-vermittelten Aktivierung der 4-Hydroxylgruppe zur Einführung chemisch diverser Amine (bzw. Benzamidine), realisiert (Abb. 29B). Mittels einer umfassenden instrumentellen Analytik wurde die Identität der synthetisierten Liganden sichergestellt.

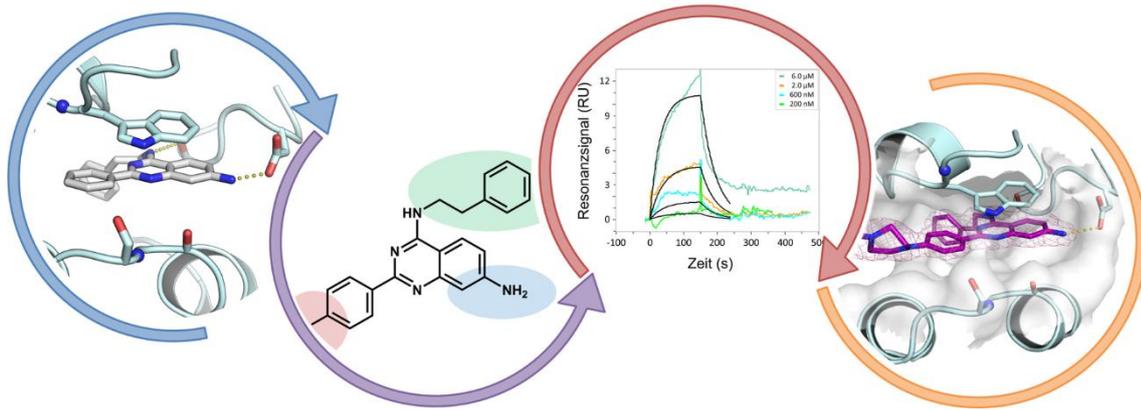


Abb. 29: Struktur-basierte Entwicklung, biophysikalische Charakterisierung und Kristallisation von 4-Amino-2-arylchinazolinen als Liganden der LP in p38 α . A) Struktur-basiertes Design von LiPoLis auf Basis der Ko-Kristallstruktur von **3a** im Komplex mit p38 α ; B) Synthese einer diversen Substanzbibliothek an LiPoLis; C) biophysikalische Charakterisierung von LiPoLis; D) strukturblogische Charakterisierung von LiPoLis.

Hinsichtlich der biophysikalischen Charakterisierung der LiPoLis über SPR wurde ein trisNTA-basierter Assay entwickelt, nachdem eine Nav-vermittelte Immobilisierung von zuvor biotinylierter Kinase sowie ein umgekehrtes System mit Biotin-versehenen LiPoLis keine belastbaren Ergebnisse lieferten bzw. experimentell aufwändiges Vorgehen bedeuteten. Hierfür erfolgte zunächst die Synthese des speziellen Chelators zur erfolgreichen Minimierung der Dissoziationseffekte von His₆-p38 α von entsprechend modifizierten Oberflächen. Weitere Vorteile dieses Systems stellen die Reversibilität der Bindung und die damit verbundene Regeneration und nachhaltige Nutzung der Sensoren sowie die Anwendung auf ein breites Spektrum entsprechend markierter Proteine dar. Der trisNTA-Assay lieferte reproduzierbare Daten für Literatur-beschriebene ATP-kompetitive p38 α -Inhibitoren und wurde für die Evaluierung der LiPoLis herangezogen (Abb. 29C). Die beobachteten Bindungsereignisse zeigten im Allgemeinen eine langsame Assoziation und eine rasche Dissoziation, woraus weitestgehend Affinitäten im mikromolaren Bereich resultierten, wobei die zur Bestimmung der kinetischen Parameter herangezogenen Fit-Modelle die experimentellen Daten nicht in allen Fällen ideal beschrieben. Orthogonale Testsysteme wurden verwendet, um die Ergebnisse aus den SPR-Experimenten zu validieren. Dafür wurden TSA, MST- und BLI-Assays herangezogen, die mit der vorherigen Charakterisierung übereinstimmend jeweils eine ebenfalls geringe Affinität der Liganden anzeigten.

Schließlich konnten das Struktur-basierte Design und die Ergebnisse der biophysikalischen Charakterisierung mit Hilfe von Ko-Kristallisations-Experimenten validiert werden. Insgesamt wurden acht neue Strukturen von LiPoLis im Komplex mit p38 α gelöst und die Beibehaltung des allgemeinen Bindungsmodus sowie der charakteristischen Wechselwirkungen der Chinazoline beobachtet. Dabei zeigten sich jedoch abgesehen von unterschiedlich ausgeprägter Öffnungen der Tasche in Abhängigkeit der eingesetzten Liganden (bspw. **3e** vs. **3h**) keine signifikanten Konformationsänderungen innerhalb der LP (Abb. 29D).

Aus den im Zuge der biophysikalischen Evaluierung erhaltenen Daten lassen sich untereinander vergleichend wiederkehrende Trends ableiten. Zum einen zeigten von den synthetisierten LiPoLis sämtliche Nitro-Derivate **6a-r**, 7- und 8-(Sulfon-)Amide **7a-e** sowie 7-Alkylamine **8a-c** keine Bindung in den jeweiligen Assays. Diese Position scheint daher maßgeblich für die Adressierung der LP zu sein, da das Vorhandensein eines primärenamins an dieser Stelle entscheidende Wechselwirkungen ermöglicht, deren Verlust vermutlich zu einer signifikanten Abnahme der Affinität gegenüber der Kinase führt. Darüber hinaus wiesen die in der Literatur als LiPoLi beschriebene Substanz **1** und die hergestellten Analoga **20a,b** keine Bindung in den verwendeten Testsystemen auf (Tab. 9). Eine Erklärung hierfür könnte eine zu geringe Affinität außerhalb des in den Assays verwendeten Konzentrations-Bereichs sein. Für die bisher genannten Strukturen konnte ebenfalls keine erfolgreiche Ko-Kristallisation erzielt werden.

Tab. 9: Vergleich der aus den SPR-, MST- und BLI-Assays erhaltenen Dissoziationskonstanten.

	K_D (M)		
	SPR	MST	BLI
1	n.b.	n.b.	n.b.
3a	$33.5 \cdot 10^{-6}$	$2.38 \cdot 10^{-6}$	$13.0 \cdot 10^{-6}$
3e	$12.1 \cdot 10^{-6}$	-	$23.0 \cdot 10^{-6}$
3l	$92.5 \cdot 10^{-6}$	-	$32.0 \cdot 10^{-6}$
3n	$238.0 \cdot 10^{-6}$	$> 10 \cdot 10^{-6}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
3u	$41.2 \cdot 10^{-6}$	-	-

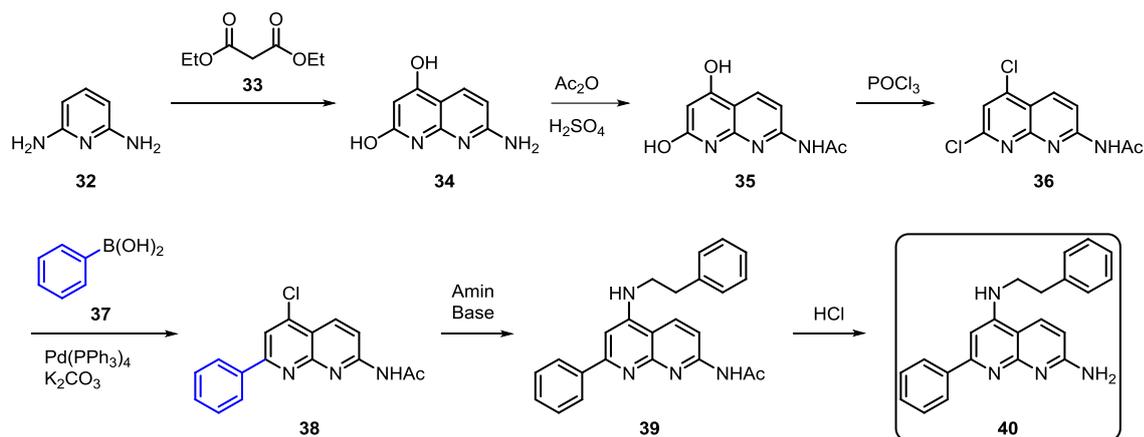
n.b.: keine Bindung (*no binding*); -: nicht gemessen

In Gegenwart eines 7-Amins am Chinazolin-Grundgerüst der synthetisierten LiPoLis konnte in einigen Fällen eine Bindung an p38 α detektiert werden. Diesbezügliche Messungen zeigten, dass mit Variation des hydrophoben Substituenten in 4-Position im Vergleich zur Parentalsubstanz **3a** eine Adressierung der Kinase weiterhin möglich war. In den verschiedenen Assays wurden innerhalb der Serie mit **3a** vergleichbare Affinitäten im mikromolaren Bereich beobachtet, wobei Größe (vgl. **3a-c**, **3k,l**), Bioisostere (**3d,e**) und (Doppel-)Fluorierung (**3f-i**; **3j** zeigte keine Bindung) des Restes verändert wurden (Tab. 9). Aus der Charakterisierung von **3a** und dem biotinyliertem Analog **3u** mittels SPR wurden ähnliche Werte für die jeweiligen Geschwindigkeits- und Dissoziationskonstanten erhalten. Daraus geht hervor, dass eine Biotinylierung der Liganden für den Einsatz in SPR-Assays eine geeignete, obgleich synthetisch aufwändige Möglichkeit zur Evaluierung der LiPoLis darstellt. Im TSA zeigte sich keine Stabilisierung der Kinasekonformation anhand einer Schmelzpunkterhöhung in Anwesenheit der Liganden, was allerdings nicht zwangsläufig eine Adressierung der LP ausschließt, da es sich um eine andere Tasche als die katalytisch relevante ATP-Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms handelt. Aus der Gegenüberstellung der nach trisNTA-vermittelten Immobilisierung von p38 α und der im Rahmen von BLI-Experimenten für die 4-Aminoderivate bestimmten Daten lassen sich vergleichbare Affinitäten beschreiben. Insbesondere bezüglich der Liganden mit am 2-Phenylring eingeführten solvatisierenden Gruppen (bspw. **3n**) wurde in beiden Systemen eine ca. 10 - 100-fache Verringerung des K_D -Wertes beobachtet. Dieser Trend spiegelt sich auch in den Ergebnissen der MST-Messungen wider, wobei eine übereinstimmende relative Größenordnung der Affinitäten im mikromolaren Bereich, jedoch ein ca. 10-facher Unterschied in den absoluten Werten, festgestellt wurde.

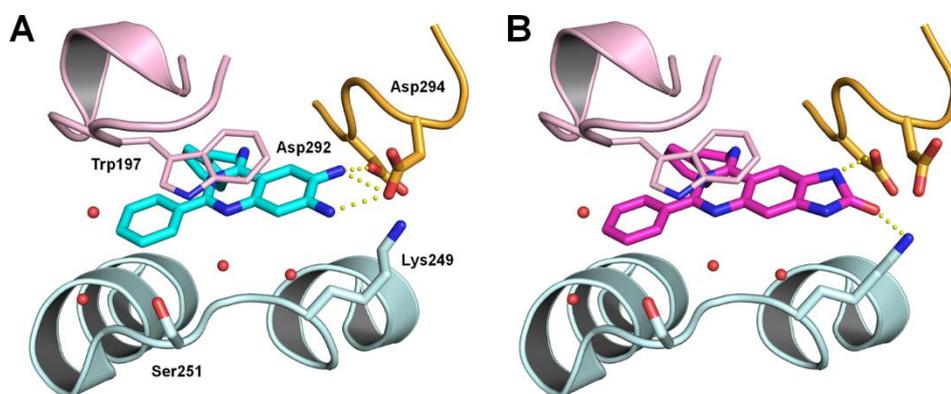
Das Sensorgramm zu **3l** zeigte zwar eine mutmaßliche Maskierung eines potentiellen Bindungssignals aufgrund von NSB, allerdings wurde eine entsprechende Ko-Kristallstruktur im Komplex mit p38 α gelöst, die eine ausschließliche Besetzung der LP durch den Liganden aufwies und ferner darauf hinweist, dass im Inneren der Tasche Freiraum für sterisch noch anspruchsvollere Substituenten gegeben ist. Von dem Phenylring in 2-Position konnte gezeigt werden, dass dieser sich für die Einführung von Löslichkeits-vermittelnden Gruppen (bspw. in **3n,o**) eignet, allerdings zu einer Verringerung der Affinität gegenüber der Kinase führt. Dennoch geht aus erfolgreichen Ko-Kristallisationen entsprechender Derivate hervor, dass die Dekoration des Grundgerüsts mit größeren Gruppen wie Morpholin- oder Acetylpiperazin-Substituenten an dieser Stelle weiterhin eine Adressierung der LP ermöglicht. Dies ließ sich ebenfalls für das Acetamid **3t** und das darauf aufbauende Biotin-Derivat **3u** beobachten. Die nicht vollständig aufgelöste Elektronendichte im Fall von **3u** deutet darauf hin, dass der Biotin-PEG₄-Linker nach Bindung in die Tasche sehr flexibel ist und entsprechend konformative Freiheit besitzt.

3.5.2 Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse das erfolgreiche Design von Derivaten 2-Arylchinazolin-basierter LiPoLis zur Adressierung der LP in p38 α und geben wertvolle Informationen, auf deren Basis weitere Syntheseyklen abgeleitet werden können. Beispielsweise könnte der Chinazolin-Kern durch (Iso-)Chinoline oder Naphthyridine ersetzt werden. Polare Heteroatome, die in den Innenraum der LP orientiert sind, würden auf diese Weise entfernt und stattdessen auf der Lösungsmittel-exponierten Seite des Grundgerüsts eingeführt werden, ohne dabei die maßgeblichen Wechselwirkungen der LiPoLis in der Tasche zu beeinflussen. Die Substanzen könnten ausgehend von einer Kondensation von Diaminopyridin **32** und Malonsäurediethylester **33** unter schwefelsauren Bedingungen hergestellt werden (Schema 15).^[199] Das resultierende 7-Aminonaphthyridin **34** könnte anschließend als Acetamid geschützt und weiterhin mittels POCl₃ zweifach chloriert werden. Das entsprechende Produkt **36** würde ein geeignetes Substrat für eine regioselektive Suzuki-Miyaura-Reaktion darstellen, die in Abhängigkeit der eingesetzten Boronsäuren eine Einführung diverser arylischer Reste ermöglicht. Schließlich würde die Substitution in 4-Position und Entschützung des primären 7-Amin erfolgen.

Schema 15: Vorschlag einer Syntheseroute zur Darstellung von Naphthyridin-basierten LiPoLis.

Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung würde die Ausweitung der Liganden an 6- und 7-Position des Grundgerüsts in Richtung der sich entsprechend in der Peripherie der LP befindlichen, mehrheitlich polaren Aminosäuren darstellen. Die Modifizierung mit Amiden und sterisch anspruchsvolleren Sulfonamiden sowie unpolaren Alkylaminen führte zwar bei den synthetisierten LiPoLis zu einem Affinitätsverlust, allerdings könnten weitere Wasserstoffbrücken-Donoren an dieser Stelle potentiell positive Wechselwirkungen zu dem Protein, insb. zu Asp292 und Asp294, ausbilden (Abb. 30A). Dies könnte bspw. durch Generierung eines 6,7-Diaminochinazolins (bspw. **46**) realisiert werden. In Kombination mit Wasserstoffbrücken-Akzeptoren, z.B. in Form des Imidazolidons **48**, könnte auf diese Weise u.a. Lys248 adressiert werden, was mit einer räumlichen Anpassung der umliegenden Aminosäure-Seitenketten einhergehen könnte, um bevorzugte Abstände und attraktive Wechselwirkungen beizubehalten (Abb. 30B).

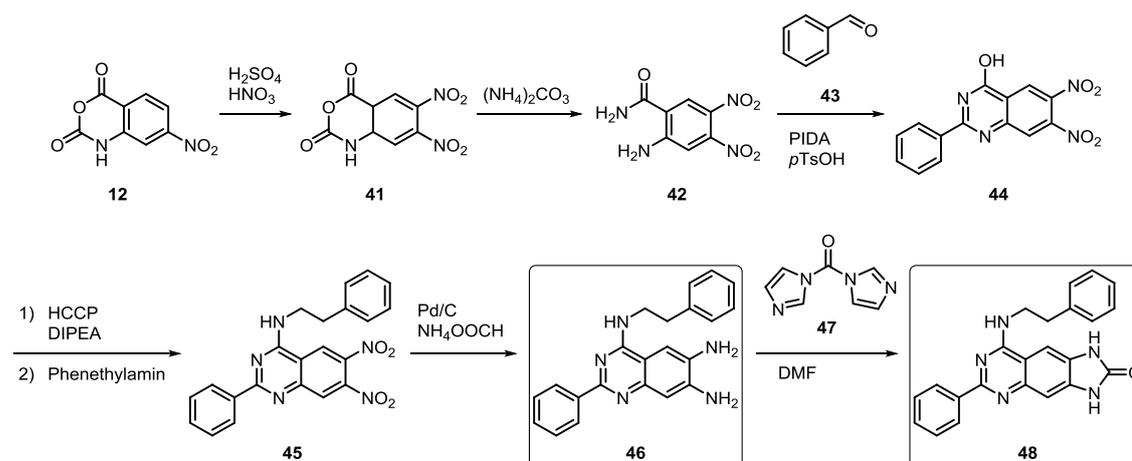
**Abb. 30:** Design 6,7-Diaminochinazolin-basierter LiPoLis. Modellierung von A) **46** (cyan) und B) **48** (magenta) in die LP von p38 α (basierend auf PDB: 4DLJ).

Chemisch wären solche LiPoLis bspw. zugänglich, indem ausgehend von Isatosäureanhydrid **12** eine Nitrierung und anschließende Generierung von Anthranilamid **42** erfolgt (Schema 16). Dieses könnte dann analog zur bisherigen Route zur Herstellung Chinazolin-basierter LiPoLis für den Aufbau des Grundgerüsts und Substitution in 4-Position als entsprechendes Substrat dienen. Nach simultaner Reduktion beider Nitrogruppen in 6- und 7-Position würde 6,7-Diaminochinazolin **46** erhalten werden, das als Vorstufe für die Umsetzung mit Harnstoff oder **47** dienen könnte, um das Imidazolidon-Derivat **48** zu erhalten.^[200]

Zusammen mit der postulierten Änderung des Chinazolin-Gerüsts könnten diese Modifizierungen mutmaßlich zu einer erhöhten Affinität führen und zusammen mit einer Variation des hydrophoben 4-Restes sowie Dekoration des 2-Phenylrings zu potenteren LiPoLis führen, die in Studien zur Aufklärung der biologischen Rolle der LP in p38 α genutzt werden könnten.

Aus den Ko-Kristallstrukturen von **3a** und dem entsprechenden Bioisoster **3e** ging hervor, dass mit einem bestimmten, gemeinsamen Substitutionsmuster neben der lipophilen Bindetasche gleichzeitig auch das aktive Zentrum adressiert wird (Abb. 31A). Ein Phenethyl- bzw. Thiophenethyl-Rest in 4-Position ermöglicht offenbar eine einzigartige Bindungspose, die für ATP-kompetitive Inhibitoren in dieser Form noch nicht beschrieben wurde (Abb. 31B).

Schema 16: Vorschlag einer Syntheseroute zur Darstellung von 6,7-Diaminochinazolinen und deren Derivatisierung.



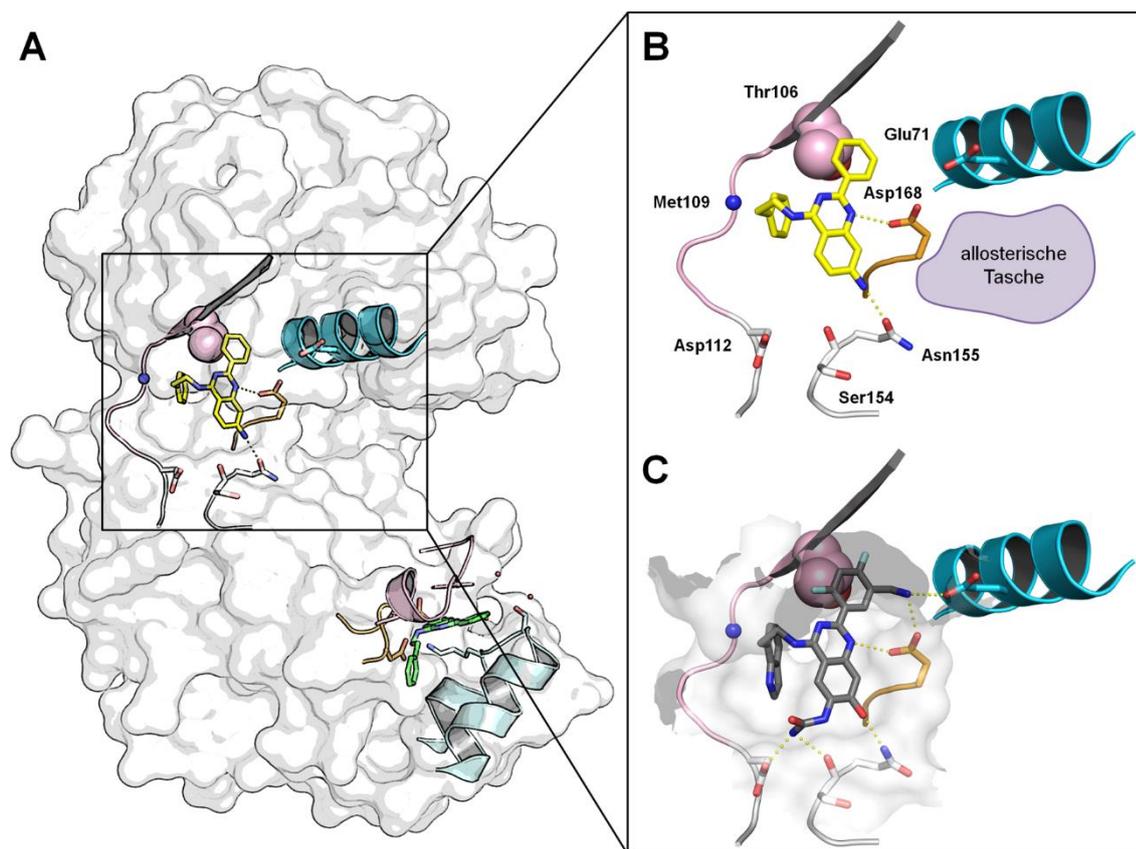


Abb. 31: Design Chinazolin-basierter, ATP-kompetitiver Kinaseinhibitoren. A) Übersichtsdarstellung der Kinasedomäne von p38 α mit zwei gebundenen Molekülen **3a** (gelb, grün) (PDB: 4DLJ); B) Ko-Kristallstruktur von **3a** (gelb) im Komplex mit p38 α mit dem Liganden im aktiven Zentrum; allosterische Tasche (violett); C) Modellierung von **61** (grau) in das aktive Zentrum von p38 α (basierend auf PDB: 4DLJ); WBBs (gelbe Punkte).

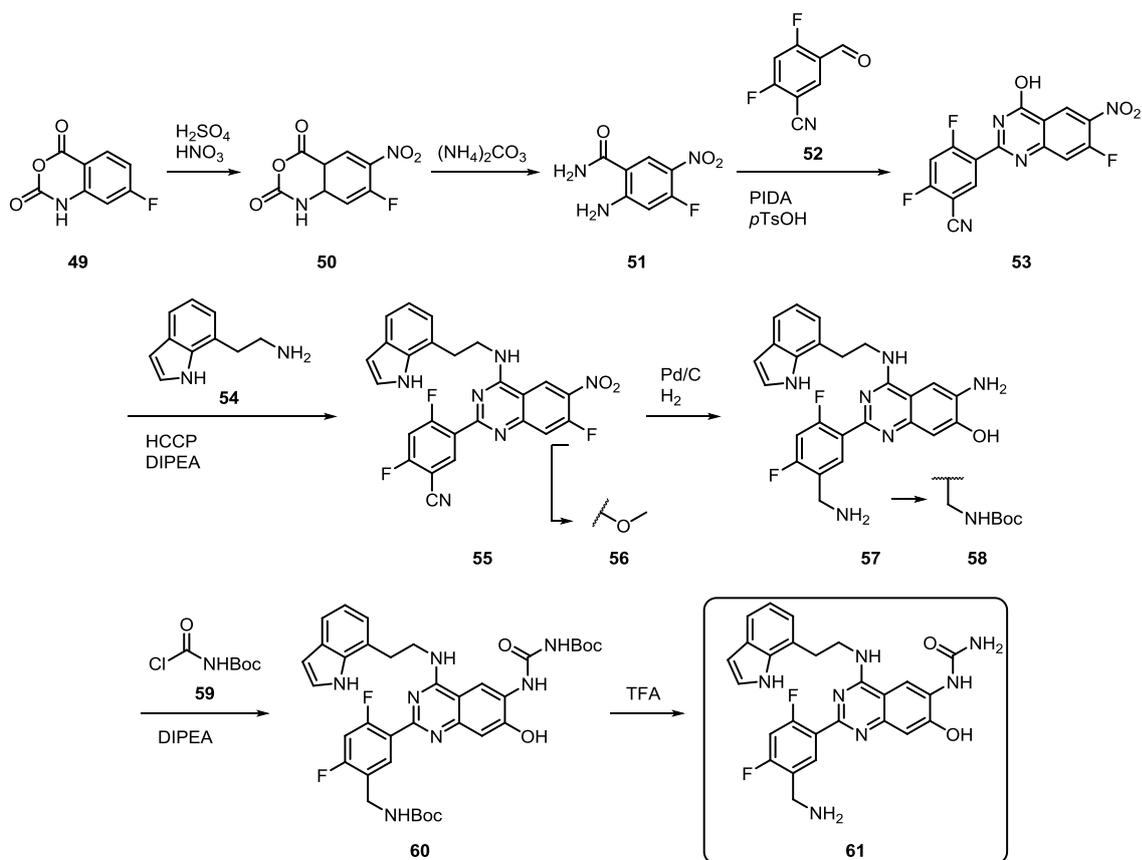
Dabei gehen die LiPoLis jeweils eine direkte Wechselwirkung zwischen Asp168 aus dem DFG-Motiv und dem Stickstoff in 1-Position des Chinazolin-Kerns ein. Der 2-Phenylring des Liganden besetzt, ähnlich wie z.B. die Difluorophenyl-Einheit von Skepinone-L im Komplex mit p38 α (PDB: 3QUE)^[74], die häufig von Kinaseinhibitoren zur Selektivitäts-Steigerung adressierte und hinter dem Türsteher Thr106 lokalisierte HRI.^[13,201] Die Besonderheit an diesem Bindungsmodus liegt allerdings in der Abwesenheit eines typischen Scharnier-bindenden Strukturmotivs und der vergleichsweise hohen Entfernung zu dieser Region. Stattdessen sorgt hier vermutlich eine Polar- π -Interaktion des aromatischen Systems mit dem Rückgrat-NH von Met109 für eine spezifische Ausrichtung des Liganden, die durch eine direkte WBB zwischen dem 7-Amin und Asn155 weiter stabilisiert wird.^[202] Das Phe169 aus dem DFG-Motiv ist in beiden Fällen (**3a,e**) nicht aufgelöst, allerdings lässt die zur α -Helix C gewandte Orientierung von Asp168 eine DFG-out-Konformation annehmen, die wahrscheinlich auf die Wechselwirkung mit dem Chinazolin-Grundgerüst zurückzuführen ist. Der beobachtete Zustand der Kinase wird typischerweise von Typ II- bzw. Typ III-Inhibitoren

stabilisiert. Die Strukturen von **3a,e** wiesen allerdings keine charakteristischen Merkmale, wie z.B. die Adressierung der allosterischen Tasche im aktiven Zentrum, auf. Die Identifikation solcher neuartigen Bindungsmodi ist hinsichtlich der Entwicklung selektiver Kinaseinhibitoren von maßgeblicher Bedeutung, da sie noch immer eine große Herausforderung in der medizinischen Chemie und der pharmazeutischen Wirkstoffforschung darstellt.

Für die Liganden wurde eine Affinität im mikromolaren Bereich bestimmt, die jedoch unter Berücksichtigung der vergleichbaren Werte aller charakterisierten LiPoLis untereinander mutmaßlich von einer Bindung in die LP herrührt. Zudem handelt es sich bei den Substanzen **3a,e** um nicht optimierte Strukturen, die somit einen interessanten Ausgangspunkt für die Optimierung als ATP-kompetitive p38 α -Inhibitoren darstellen. Beispielsweise könnte in Anlehnung an das hochpotente Skepinone-L und dessen Derivate der 2-Phenylring der Liganden mit Einfach- oder Doppelfluorierungsmustern sowie Methylierungen versehen werden (vgl. Kapitel 5.1), um potentiell an Affinität zu gewinnen.^[74,203-204] Darüber hinaus würde sich diese Position für die Einführung eines Wasserstoffbrücken-Donors eignen, der auf diese Weise in räumlicher Nähe zu Glu71 gebracht werden könnte, um eine direkte WBB mit dieser Seitenkette auszubilden (Abb. 31C). Synthetisch wären diese Modifizierungen jeweils über eine Kondensation von Anthranilamid **4b** mit entsprechenden Benzaldehyd-Bausteinen realisierbar. Die elektrostatische Potentialoberfläche in Aromaten wird bei Substitution des Ringsystems mit Elektronen-schiebenden Gruppen, wie bspw. Aminen, negativer, womit sich die Polar- π -Wechselwirkung mit dem Rückgrat-NH von Met109 potentiell verstärken lassen. Ähnliche Effekte wären bei dem Austausch des Restes mit einem Indol zu erwarten.^[205] Bei Bindung in das aktive Zentrum ist die 6-Position am Grundgerüst von **3a** Lösungsmittel-exponiert und bietet die Möglichkeit mit geeigneten Substituenten Kontakte zu Asp112 und Ser154 zu formen. Entsprechend dekorierte Chinazolin-Derivate sind bspw. in Form des EGFR-Inhibitors Gefitinib in der Literatur bekannt, aus deren Beispiel sich eine denkbare Syntheseroute zur Darstellung von **61** ableiten lässt (Schema 17).^[206] Dieses Molekül vereint bereits sämtliche angeführten Veränderungen an der Parentalsubstanz **3a** in einer Struktur, wobei im Rahmen entsprechender Studien eine schrittweise Einführung der Substituenten zum Aufstellen einer differenzierten SAR erfolgen sollte.

Ausgehend von der Nitrierung des Isoanhydrids **49** und der darauffolgenden Umsetzung zum Anthranilamid **51** kann ein Substrat für die Kondensation mit Benzaldehyd **52** erhalten werden, das bereits die postulierten Fluorierungen (oder Methylierungen) sowie eine Nitrilgruppe als Vorläufer zur Generierung eines primären Amins trägt. Nach HCCP-vermittelter Aktivierung der 4-Hydroxylgruppe würde eine Substitution mit Aminbausteinen, die aromatische Reste mit hoher negativer Potentialdichte tragen (z.B. **54**), stattfinden. Mit Hilfe von KO t Bu und anschließender Reaktion mit MeOH in Gegenwart von NaOH könnte die Einführung einer Methoxygruppe in 7-Position erfolgen und weiterhin über eine Reduktion sowohl die 6-Nitrogruppe als auch die Nitrilgruppe am 2-Arylring freigelegt werden, um **57** zu erhalten. Um daraufhin eine selektive Substitution in 6-Position mit bspw. Säurechloriden zu ermöglichen, könnte das Methylamin am 2-Arylring zunächst *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschützt werden. Abschließend würde die saure Abspaltung der Schutzgruppen stattfinden, um Zielsubstanz **61** zu generieren.

Schema 17: Vorschlag einer Syntheseroute zur Darstellung von **61** als ATP-kompetitiver p38 α -Inhibitor.



Die kristallographischen Untersuchungen zeigten mehrfach, dass eine Derivatisierung des 2-Phenylrings bzgl. einer Bindung in die LP toleriert ist, und liefern daher einen Ansatzpunkt für weiterreichende Modifikationen. Beispielsweise könnten mit Hilfe entsprechender Benzaldehyd- (ausgehend von **4b**) bzw. Carbonsäure-Bausteine (ausgehend von **3s**) Mannich-Basen als solvatisierende Gruppen oder komplexere Substituenten, die potentiell attraktive Interaktionen mit Aminosäure-Seitenketten in der Peripherie der Tasche ausbilden könnten, in das LiPoLi-Grundgerüst eingeführt werden. Auf Basis der Ko-Kristallstrukturen von **3o,n,t,u** im Komplex mit p38 α bietet die LP in der Theorie ausreichend Platz, um entsprechende Liganden aufnehmen zu können.

Diese Beobachtungen, insb. im Fall von **3u**, stellen außerdem die Grundlage für die Entwicklung weiterer funktionalisierter LiPoLis dar, wobei für entsprechende Anwendungen zuvor eine gewisse Affinität der Substanzen erzielt werden müsste. Neben einer Biotinylierung könnten ausgehend von **3s** Liganden bspw. mit Fluorophoren versehen werden, um in MST- oder Fluoreszenzpolarisations-Experimenten sowie mikroskopischen Studien genutzt werden zu können. Das bildgebende Signal könnte dazu dienen, um z.B. in Gegenwart der LiPoLis die Lokalisation von p38 α in Zellen zu verfolgen und auf diese Weise Einblicke in die biologische Rolle der untersuchten Tasche zu erlangen.

Die signifikante strukturelle Flexibilität (Öffnung/Schließung) der Tasche in Abhängigkeit der anwesenden Liganden bekräftigt die Arbeitshypothese, dass die LP Substratmoleküle unterschiedlicher Form und Größe binden könnte und Funktionen erfüllt, die über die katalytische Aktivität der Kinase hinausgehen, bspw. in Form von der Ausbildung von Multi-Enzym-Komplexen oder der Vermittlung von PPIs. Jedoch ist es im Rahmen der synthetischen Arbeiten bis jetzt nicht gelungen, als Sondenmoleküle geeignete LiPoLis zur Adressierung und Aufklärung der biologischen Funktion(en) der LP zu identifizieren. Die in den biophysikalischen Assays beobachtete Affinität stellte sich jeweils als sehr gering heraus, sodass andere Strategien für eine spezifische Bindung an die Kinase verfolgt wurden.

Eine Maximierung der Affinität sollte mit Hilfe eines chemisch-genetischen Ansatzes erzielt werden, indem Cystein-modifizierte p38 α -Mutanten durch kovalent bindende Liganden adressiert werden sollten.

4 Kovalente Adressierung der lipophilen Bindetasche in p38 α

Im Rahmen der Struktur-basierten Entwicklung von reversibel bindenden LiPoLi-Derivaten sollten ursprünglich Liganden generiert werden, die zur spezifischen Adressierung der LP in p38 α genutzt werden können. Allerdings zeigte sich in biophysikalischen Untersuchungen eine geringe Affinität der Substanzen, sodass alternative Strategien verfolgt wurden, um entsprechende Eigenschaften der Substanzen zu optimieren und den Einsatz als geeignete Sondenmoleküle in bspw. zellulären Systemen zu ermöglichen.

Ausgehend davon sollten auf Grundlage der zuvor gelösten Ko-Kristallstrukturen der reversiblen LiPoLis im Komplex mit der Kinase Liganden entwickelt werden, die an passenden Positionen mit elektrophilen Gruppen modifiziert werden können, um p38 α -Mutanten mit artifiziell eingeführten Cysteinen in der Peripherie der LP zu adressieren. Unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den funktionalisierten Substanzen und der Kinase sollten auf diese Weise irreversibel gebundene Protein-Liganden-Paare generiert und somit eine Maximierung der Verweildauer am Enzym erzielt werden. Entsprechende Addukte sollten mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen identifiziert und die durch LiPoLis markierten Cysteine in MS/MS-basierten Studien ermittelt werden. Eine abschließende Validierung dieses chemisch-genetischen Ansatzes sollte im Rahmen von Kristallisationsexperimenten erfolgen.

4.1 Struktur-basiertes Design von kovalenten LiPoLis und p38 α -Mutanten

Zur Umsetzung des geplanten chemisch-genetischen Ansatzes erfolgte zunächst die Analyse von Ko-Kristallstrukturen der Liganden im Komplex mit p38 α , von denen ausgehend Aminosäuren in der Umgebung der LP ausgewählt wurden, die durch Cysteine ersetzt werden sollten und sich in räumlicher Nähe zu möglichen Derivatisierungs-Stellen am Chinazolin-Kern der LiPoLis befanden (Abb. 31A). Ferner geschah die Struktur-

basierte Identifikation von vorzugsweise Lösungsmittel-exponierten Positionen am Grundgerüst der LiPoLis, die mit Elektrophilen in Form von Michael-Akzeptor-Systemen dekoriert werden sollten, um potentiell die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu den eingeführten Thiol-Seitenketten zu ermöglichen. Eine außerhalb der Tasche gerichtete Orientierung dieser Gruppen sollte neben einem geringeren Risiko sterischer Hinderungen ebenso die Adressierbarkeit umliegender nukleophiler Reste begünstigen.

Zum einen wurden die in Nähe des 7-Amins der Liganden lokalisierten Aminosäuren Lys249 und Asp294 für Mutationen zu Cysteinen in Erwägung gezogen (Abb. 32B). Die damit einhergehende Auflösung der mutmaßlich wichtigen WBB zwischen LiPoLi und Asp294 sowie der Interaktion der beiden Seitenketten miteinander stellt dabei hinsichtlich der Affinität zur Kinase und struktureller Ordnung der LP ein gewisses Risiko dar, da bspw. anhand der Derivate **7a-e** und **8a-c** gezeigt wurde, dass mit der Modifikation dieser Positionen am Grundgerüst ein Affinitätsverlust gegenüber p38 α einhergeht.

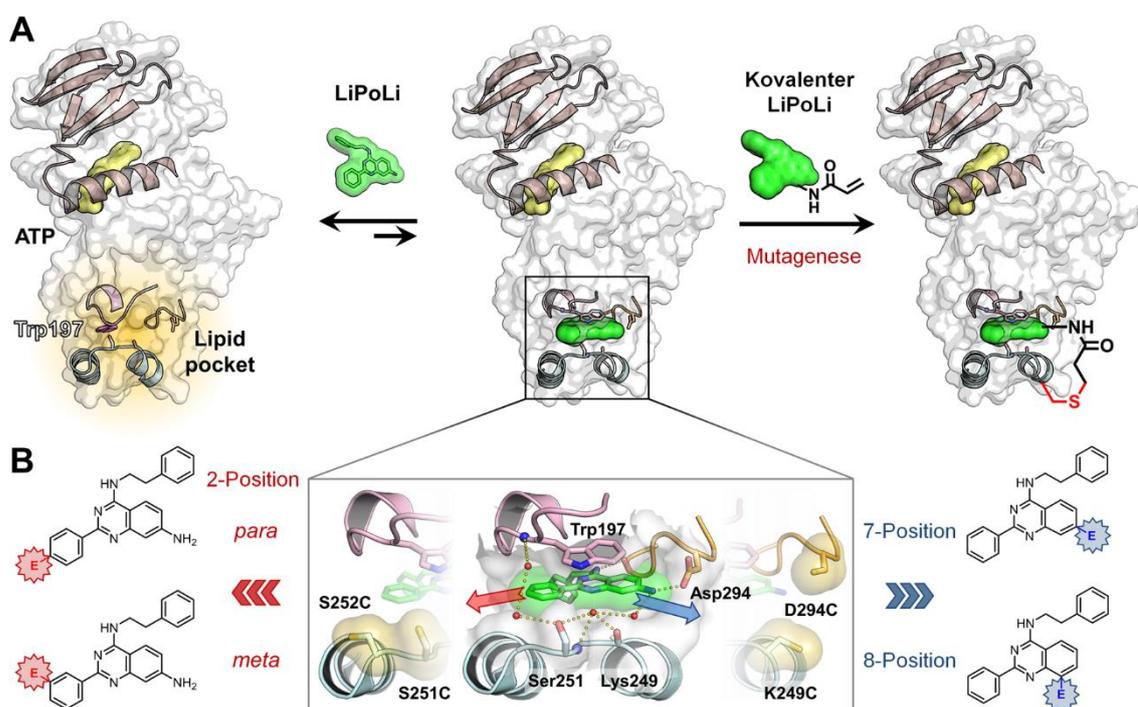


Abb. 32: Schematische Darstellung eines chemisch-genetischen Ansatzes zur kovalenten Adressierung der LP in p38 α . A) Kinasedomäne von p38 α mit in Entfernung zur ATP-Bindetasche (gebundenes ATP: gelb) lokalisierter hervorgehobener LP (orange); Rotation von Trp197 in Anwesenheit von LiPoLis resultiert in einer Öffnung der Tasche; durch Mutagenese in der Peripherie der LP eingeführte Cysteine sollten die Knüpfung einer kovalenten Bindung und die Maximierung der Verweildauer der Liganden an der Zielkinase erlauben (PDB: 1P38, 1ATP, 4DLJ); B) charakteristische Wechselwirkungen von innerhalb der LP gebundenen Chinazolin-basierten LiPoLis; für die Mutation zu Cysteinen ausgewählte Aminosäuren: gelbe Sphären; Lösungsmittel-exponierte Positionen an den Liganden zur Derivatisierung mit Elektrophilen: 2-Phenyl: roter Pfeil, 7-/8-Amin: blauer Pfeil; E: Elektrophil (PDB: 4DLJ).

Allerdings könnte einerseits das Ersetzen größerer Aminosäuren (Lys249, Asp294) durch vergleichsweise kleinere Cysteine zu einer Vergrößerung der Tasche im Bereich der dort bindenden Substituenten führen und somit möglicherweise eine Adressierung mit entsprechend derivatisierten LiPoLis erlauben. Darüber hinaus ist zwar die Affinitätsgetriebene Entstehung eines zunächst reversiblen Komplexes eine Grundvoraussetzung für die darauf folgende Reaktion mit dem Elektrophil, allerdings ist die Aufrechterhaltung der beobachteten Wechselwirkungen insofern untergeordnet, als dass nach Ausbilden der kovalenten Bindung keine Rückreaktion in Form von Dissoziation des Liganden mehr erfolgen kann und damit eine dauerhafte Besetzung der Tasche erreicht wird, für die eine minimale Affinität der LiPoLis bereits ausreichen sollte. Für die Mutation von Lys249 und Asp294 zu Cysteinen spricht weiterhin, dass diesbezügliche Aminosäuren (Cys) durch vergleichsweise einfach zu realisierende Modifikation der Liganden mittels teilweise bereits etablierter Synthesvorschriften (vgl. **7a-e**) zu erreichen sein könnten.

Zum anderen wurden Ser251 und Ser252 für den Ersatz durch Cysteine ausgewählt, die sich in Nähe des 2-Phenylrings am Chinazolin-Grundgerüst der LiPoLis befinden (Abb. 32B). Aus den vorherigen Studien ging bereits hervor, dass die Einführung größerer Substituenten in dieser Position weiterhin eine Bindung in LP zulässt (vgl. **7n,o**). Allerdings würde die Dekoration mit Elektrophilen die Identifikation geeigneter Reaktionsbedingungen erfordern, insb. im Hinblick auf die Verwendung passender Benzaldehyd-Bausteine und der Entwicklung umsetzbarer Syntheserouten zur Einführung entsprechender reaktiver Gruppen. Ein weiterer Vorteil dieser Aminosäuren liegt in der strukturellen Ähnlichkeit von Serinen zu Cysteinen, was potentiell hilfreich sein kann, um die Integrität des Proteins nach Einbringen der Mutationen zu wahren. Dennoch unterschieden sich die beiden Seitenketten maßgeblich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften, sodass bspw. das Proton des Thiol(at)s von Cystein im Vergleich zur Hydroxyl-Gruppe von Serin aufgrund der leichter polarisierbaren Bindung acider ist und somit ein reaktiveres Nukleophil darstellt, was für den geplanten chemisch-genetischen Ansatz von Relevanz ist.

Die kovalenten LiPoLis wurden entsprechend der geplanten Mutanten so designt, dass eine möglichst hohe Diversität der Substanzbibliothek hinsichtlich Größe der eingeführten Elektrophile und Abstand der reaktiven Position zum Chinazolin-Kern der Liganden (bzw. zu den adressierten Cystein-Seitenketten) erreicht wird. Diese Variabilität sollte durch die Synthese von unterschiedlichen Acylamiden und Alkylketonen umgesetzt werden (Abb. 33).

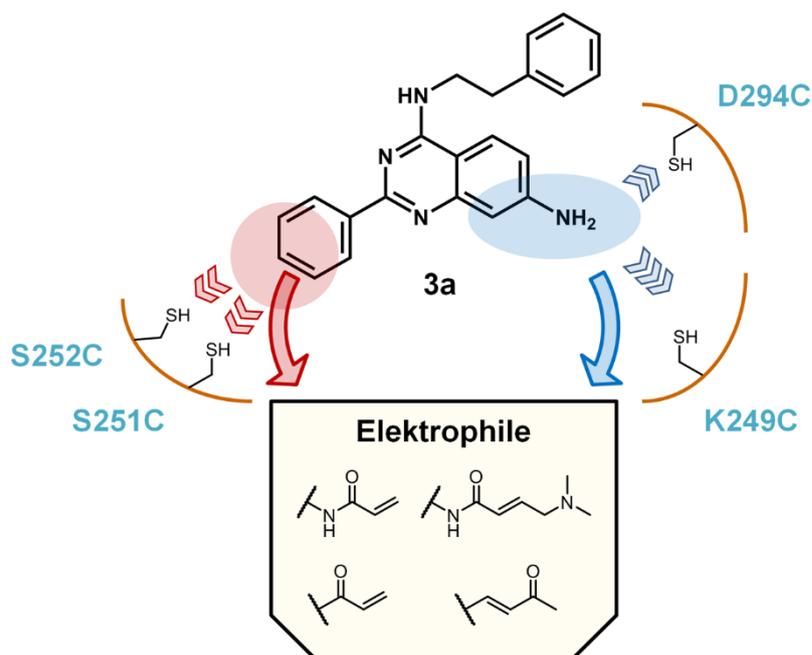


Abb. 33: Geplante Elektrophile zur Einführung in das Chinazolin-Grundgerüst.

Auf Grundlage verschiedener Ko-Kristallstrukturen von LiPoLis im Komplex mit p38 α und unter Einbeziehung der bisherigen Charakterisierung reversibler Binder der LP wurden vier Aminosäuren in der direkten Umgebung der Tasche für die Mutation zu Cysteinen ausgewählt und entsprechende Positionen am Chinazolin-Grundgerüst der Liganden zur Einführung von elektrophilen Michael-Akzeptor-Systemen identifiziert.

4.2 Generierung und Charakterisierung von p38 α -Mutanten

Im Rahmen ortsgerichteter Mutagenesen wurde die Umwandlung von Lys249, Ser251, Ser252 und Asp294 zu Cysteinen realisiert, sodass insgesamt vier verschiedene p38 α -Mutanten (K249C, S251C, S252C und D294C), die jeweils eines der ausgewählten Cysteine trugen, generiert wurden⁵ (Abb. 32B, Tab. 10). Nach Expression und Reinigung der Proteine wurden die Kinasen zunächst in Gegenwart von der physiologisch vorgeschalteten MAPKK MKK6 phosphoryliert und damit in einen katalytisch aktiven Zustand überführt. Der Erfolg der Phosphorylierung wurde durch MS-Messungen kontrolliert, wobei für alle vier Mutanten und p38 α WT jeweils eine doppelte Modifikation mit Phosphat detektiert wurde (Tab. 10).

⁵ Die Generierung der Protein-Mutanten, einschließlich der Mutagenese, Expression und Reinigung wurde von Jörn Weisner und Andreas Arndt durchgeführt.

Tab. 10: Generierte p38 α -Mutanten und deren experimentell bestimmten Molekulargewichte vor und nach Aktivierung in Anwesenheit von MKK6 im Vergleich mit dem WT. Theoretische Massenzunahme Δ MW bei Doppel-Phosphorylierung entspricht 160 Da (dazugehörige Spektren siehe Anhang 9.2).

p38 α -Variante	MW (Da)		
	vor Aktivierung	nach Aktivierung	Δ MW
WT	41449	41608	159
K249C	41429	41587	158
S251C	41469	41627	158
S252C	41468	41628	159
D294C	41439	41600	161

Nachfolgend wurde im Zuge von Kinasetitrationen die enzymatische Funktionalität der Proteine sichergestellt, indem mittels Aktivitäts-basierten HTRF[®]-Assays die konzentrationsabhängige Phosphorylierung eines Substratpeptids über ein Abvermitteltes Fluoreszenz-Signal nachgewiesen wurde (Abb. 34). Zudem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die nach der Aktivierung der Kinasen in den Stammlösungen noch enthaltene MKK6 keinen Einfluss auf den Substratumsatz hatte. Zur Bestätigung der katalytischen Integrität der Proteine wurden anschließend mit Hilfe eines Aktivitäts-basierten Assays für alle Enzym-Varianten die kinetischen Parameter ATP- und Substrat- K_m bestimmt.⁶ Für die vier Mutanten wurden hierbei in Bezug auf p38 α WT jeweils vergleichbare Werte beobachtet, sodass eine signifikante Beeinflussung der katalytischen Eigenschaften der Kinasen durch die eingeführten Mutationen ausgeschlossen werden kann (Tab. 11).

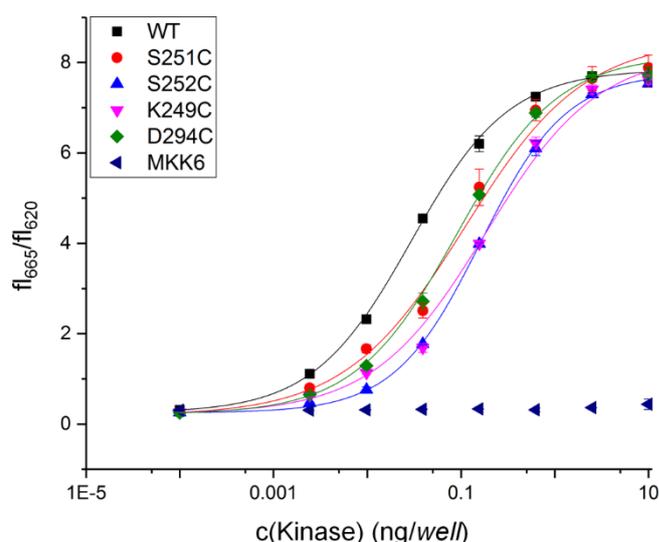


Abb. 34: Kinasetitrationen mit p38 α WT und Mutanten mittels Aktivitäts-basiertem Assay.

⁶ Bestimmung von ATP- und Substrat- K_m wurde von Jörn Weisner durchgeführt.

Tab. 11: Experimentell bestimmte EC_{80} , ATP- und Substrat- K_m für p38 α WT und die vier Cystein-Mutanten. Die gemittelten Werte und Standardabweichungen der Parameter wurden in drei unabhängigen Einzelmessungen bestimmt.

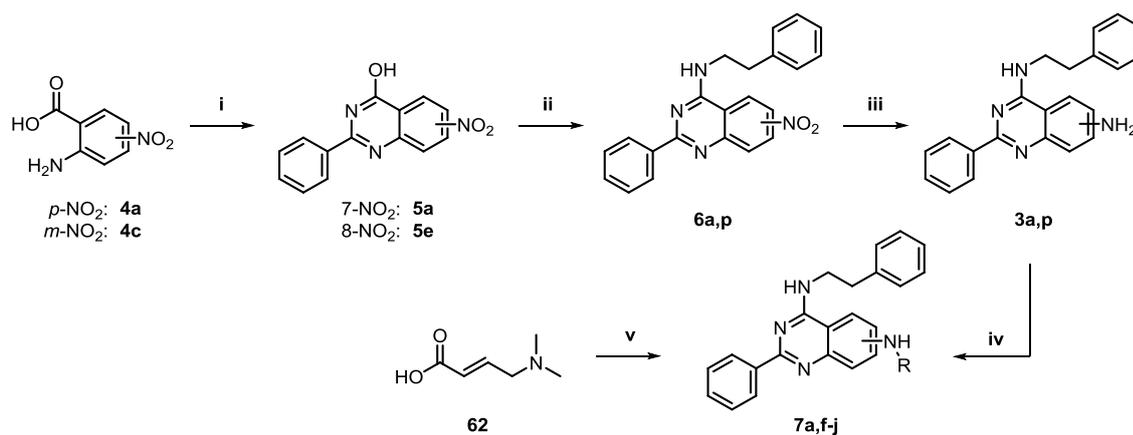
p38 α -Variante	EC_{80} (ng/well)	ATP- K_m (μ M)	Substrat- K_m (nM)
WT	0.16 \pm 0.01	11.0 \pm 2.1	748.5 \pm 60.6
K249C	0.84 \pm 0.53	9,3 \pm 1.7	725.4 \pm 55.2
S251C	0.70 \pm 0.09	7.9 \pm 2.5	1412.2 \pm 98.7
S252C	1.24 \pm 0.35	10.7 \pm 2.2	848.4 \pm 180.5
D294C	0.50 \pm 0.05	10.2 \pm 1.8	1207.2 \pm 201.2

4.3 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek an kovalenten LiPoLis

Die Synthese der entworfenen Elektrophil-tragenden LiPoLis wurde über verschiedene Syntheserouten realisiert. Zur Einführung von Amid-verknüpften Gruppen in 7- und 8-Position des Chinazolin-Kerns mit entsprechenden Säurechloriden konnte größtenteils die zuvor zur Herstellung reversibler Liganden verwendete Reaktionssequenz übernommen werden (Schema 4). Die Grundgerüste **5a,p** wurden hierbei im Rahmen der Mikrowellen-gestützten Umsetzung von 4- bzw. 3-Nitroanthranilsäuren in Anwesenheit von Benzoesäureanhydrid und Formamid aufgebaut und unter den bereits beschriebenen Bedingungen in 4-Position mit Phenethylamin substituiert und zu 7- bzw. 8-Aminochinazolinen reduziert (Schema 18). Abschließend erfolgte eine nukleophile Substitution mit verschiedenen Säurechloriden, die teilweise kommerziell bezogen oder durch vorherige Chlorierung des Crutonsäure-Derivats **62** mit Oxalylchlorid generiert wurden, um die Zielsubstanzen **7a,f,j** zu erhalten.⁷

⁷ Die Synthese von **7f-j** war Bestandteil der Bachelorarbeit von Lena Quambusch.

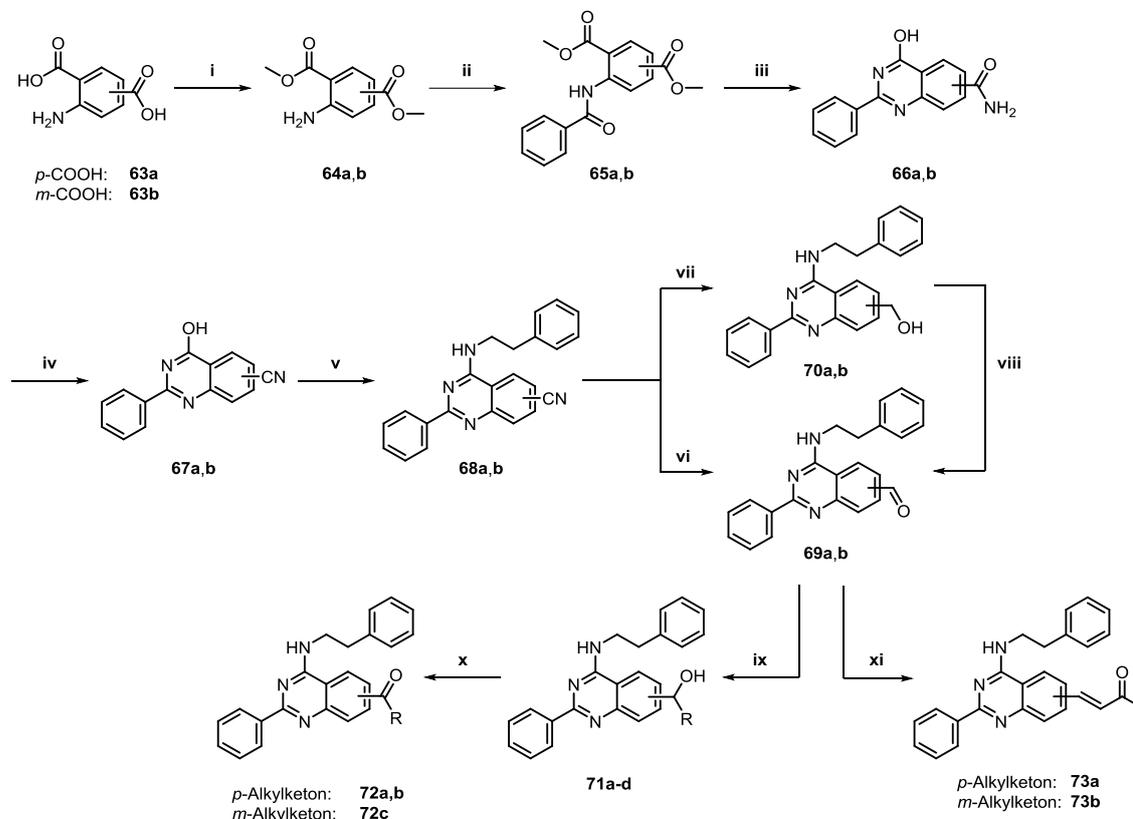
Schema 18:^a Allgemeine Reaktionssequenz zur Synthese von 2-Phenylchinazolinen mit Amid-verknüpften Elektrophilen in 7-/8-Position. Für Identität der Reste R siehe Tab. 12.



^a Reagenzien und Bedingungen: i) Ph₂O, Formamid, μ w: 200 °C, 5 min (31-37 %); ii) 1: HCCP, DIPEA, MeCN, rt, 1 h, 2: Phenethylamin, rt, 18 h (81-86 %); iii) 10 % Pd/C, NH₄OAc, EtOH, 80 °C, 1-3 h (84-91 %); iv) Carbonsäurechlorid (R), DIPEA, DCM, 0 °C zu rt (44-83 %); v) 1: Oxalylchlorid, DMF, THF, 0 °C, 2 h, 2: **3a,p**, NMP, 0 °C nach rt, 26 h (40-59 %).

Neben den Acylamiden **7a,f-j** gingen aus dem Struktur-basierten Design der kovalenten LiPoLis auch als Alkylketone in 7- und 8-Position der Chinazoline eingeführte Elektrophile hervor. Zur Darstellung dieser Liganden wurde eine neue Syntheseroute entwickelt, wobei zunächst ausgehend von der doppelten Veresterung von Aminoterephthalsäuren **63a,b** Substrate für die Substitution mit Benzoesäureanhydrid und anschließender Kondensation mit Ammoniak zu den jeweiligen Grundgerüsten hergestellt wurden (Schema 19). Im Rahmen dieser Reaktionssequenz wurden die Methylester **65a,b** in 7- bzw. 8-Position zu entsprechenden Carboxamiden **66a,b** umgesetzt. Diese stellten geeignete Vorläufer für die Dehydratation mit Trifluoressigsäure (TFA)-Anhydrid zu den Nitrilen **67a,b** dar^[207], die nach HCCP-vermittelter Substitution mit Phenethylamin in 4-Position zu **68a,b** ursprünglich als Substrate für Grignard-Reaktionen dienen sollten. Allerdings konnte auch unter Verwendung von entsprechenden Magnesiumbromiden in bis zu zwanzigfachem Überschuss oder Erhöhung der Temperatur (von 0 °C auf 50 °C) und Verlängerung der Reaktionszeit (von 3 h auf 48 h) sowie Kombination dieser Reaktionsparameter keine direkte Umsetzung zu den gewünschten Zielsubstanzen **72a-c** beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden die Nitrile **68a,b** alternativ mit Raney-Nickel (RaNi) in Anwesenheit von Methansäure zu den Aldehyden **69a,b** reduziert, wobei zu einem signifikanten Teil die Weiterreaktion zu den korrespondierenden Alkoholen **70a,b** stattfand, die allerdings in einem zusätzlichen Schritt oxidiert werden konnten, um dennoch **69a,b** zu erhalten.

Schema 19:^a Allgemeine Reaktionssequenz zur Darstellung von 2-Phenylchinazolinen mit Alkylketon-verknüpften Elektrophilen in 7-/8-Position. Für Identität der Reste R siehe Tab. 12.



^a Reagenzien und Bedingungen: i) H₂SO₄, MeOH, 18 h, 90 °C (99 %); ii) Benzoesäureanhydrid, 1 h, 150 °C, μ w (68 %); iii) NH_{3(aq)}, 1 h, 120 °C, im Überdruckgefäß (81-86 %); iv) TFA-Anhydrid, Py, DCM, 30 min, 0 °C (64-82 %); v) 1: HCCP, DIPEA, MeCN, 1 h, rt, 2: Phenethylamin, 19 h, rt (79-87 %); vi) RaNi, HCOOH, H₂O, 21 h, 70 °C (24-35 %); vii) RaNi, HCOOH, H₂O, 21 h, 70 °C (71 %); viii) DMP, DCM, 1 h, rt (82 %); ix) RMgBr, THF, 1 h, rt (57-68 %); x) DMP, DCM, 1 h, rt (73-90 %); xi) Aceton, NaOH, 3 h, rt (86-88 %).

Diese Aldehyde konnten vorteilhafterweise gleichzeitig sowohl in Grignard-Reaktionen, als auch in Claisen-Schmidt-Kondensationen mit Aceton^[208] erfolgreich genutzt werden. Hieraus gingen zum einen die Alkohol-Intermediate **71a-d** hervor, die zu den finalen LiPoLis **72a-c** oxidiert wurden⁸, und zum anderen die Alkylketone **73a,b**.

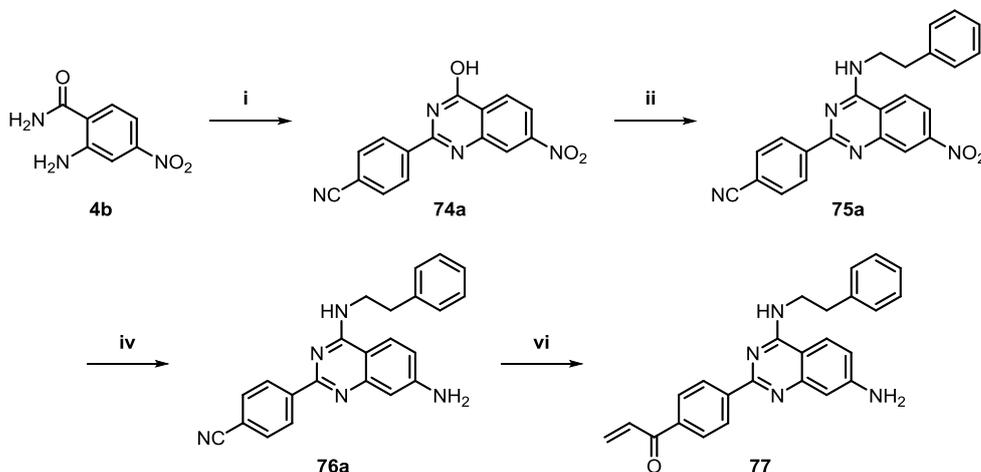
Für die Herstellung der am 2-Phenylring modifizierten LiPoLis waren für jede Zielsubstanz jeweils eine individuelle Route und Startmaterialien, insb. bzgl. der eingesetzten Benzaldehyde, erforderlich. Die entsprechenden Aldehyd-Bausteine trugen verschiedene Funktionen, die zur Einführung der unterschiedlichen Elektrophile genutzt werden sollten. Die Kondensation mit Anthranilamid **4b** zu den Grundgerüsten **74a-c**

⁸ Das weiterhin als Zielsubstanz geplante 8-Propenon-Analog zu **72b** wurde ebenfalls synthetisiert und die erfolgreiche Darstellung über MS bestätigt, zeigte jedoch nach Isolation eine rasche Zersetzung in organischen Lösungsmitteln, sodass weder eine Analytik über NMR noch das Ansetzen einer Stammlösung zur späteren Evaluierung vorgenommen werden konnte.

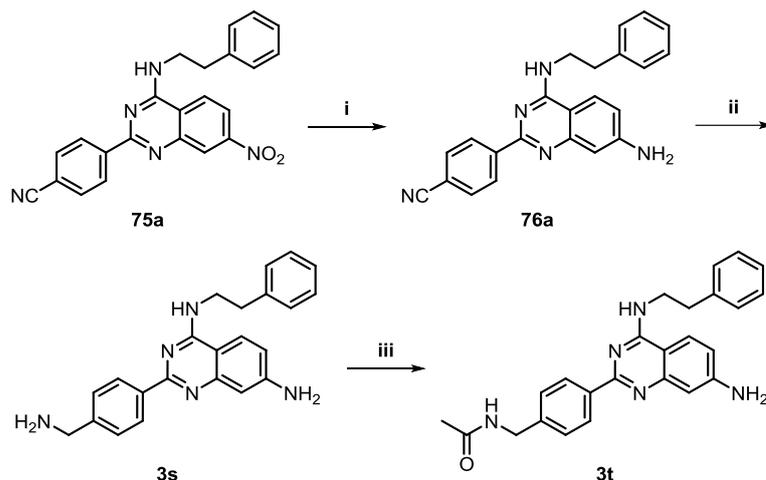
fand dabei stets unter Verwendung von katalytischer *p*TsOH und PIDA zur Oxidation des Dihydro-Intermediats statt. Substitution in 4-Position und Reduktion der Nitro-Zwischenstufen erfolgten ebenfalls nach den bereits beschriebenen Vorschriften (Schema 4).

So wurde in Chinazolin **74a** eine Nitrilgruppe eingebracht, die im späteren Verlauf der Synthese das Substrat für eine Grignard-Reaktion darstellte, aus der die Zielsubstanz **77** direkt hervorging, die einen Michael-Akzeptor in Form eines Alkylketon in *para*-Position des 2-Arylrings trägt (Schema 20). Im Rahmen dieser Reaktionssequenz wurde außerdem der Vorläufer **75a** für die Generierung von Methylamin **3s** und dem daraus folgendem Acetamid **3t** erhalten. Der Versuch einer simultanen Reduktion der 7-Nitrogruppe und dem Nitril am 2-Phenylring mit 10 % Pd/C und Ammoniumformiat führte lediglich zur Bildung des einfachen 7-Amins **76a**, das allerdings auf diese Weise eine ausreichende Löslichkeit aufwies, um in einer Reaktion im Flussreaktor mit Wasserstoff eingesetzt zu werden, aus der schließlich **3s** resultierte (Schema 21). Abschließend fand in Gegenwart von Essigsäureanhydrid die Acetylierung zu **3t** statt.

Schema 20:^a Allgemeine Reaktionssequenz zur Darstellung von Alkylketon-dekorierten 7-Amino-2-arylchinazolinen.



^a Reagenzien und Bedingungen: i) 1: 4-Cyanobenzaldehyd, *p*TsOH, THF, 30 min, rt, 2: PIDA, 2 h, rt (57 %); ii) 1: HCCP, DIPEA, MeCN, 1 h, rt, 2: Phenethylamin, 19 h, rt (83 %); iii) Fe, NH₄Cl, MeOH:H₂O (4:1), 3 h, 80 °C (80 %); iv) Vinylmagnesiumbromid, THF, 3 h, -70 °C (20 %).

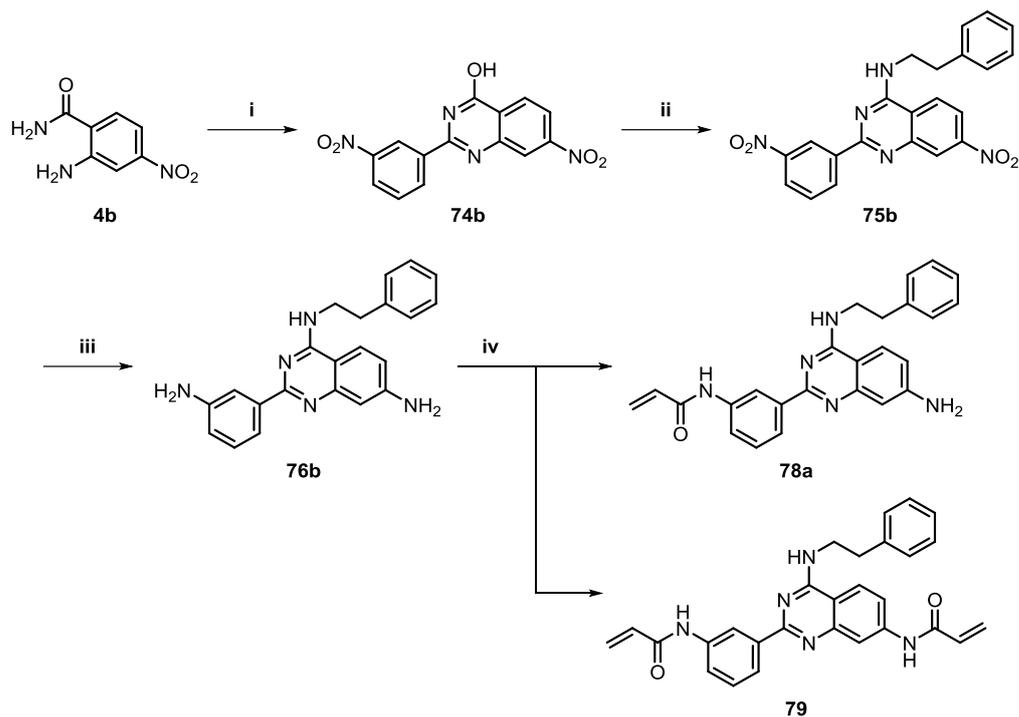
Schema 21: Darstellung von 2-Arylchinazoline **3s** und **3t**.

^a Reagenzien und Bedingungen: i) Pd/C, NH₄HCOO, MeOH, 3 h, 80 °C (89 %); ii) 10 % Pd/C, MeOH/EtOAc (1:1), HCl, 55 bar H₂, 1 mL/min, 70 °C (68 %); iii) Ac₂O, TEA, THF, 2 h, rt (20 %).

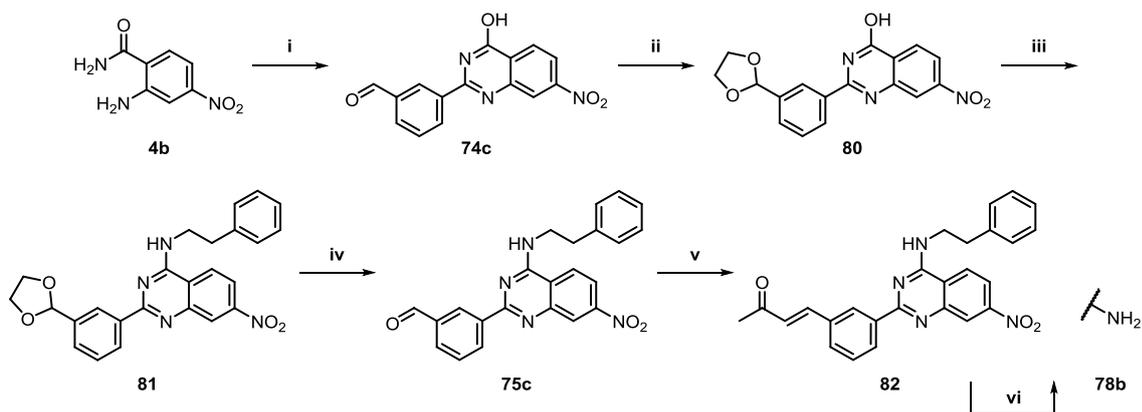
Unter Verwendung von 3-Nitrobenzaldehyd wurde Chinazolin **74b** hergestellt, das im Rahmen der weiteren Syntheseroute zum Diamin **76b** umgesetzt wurde. Die abschließende nukleophile Substitution mit Acryloylchlorid erfolgte hauptsächlich am Amin des 2-Phenylrings, während als Nebenprodukt zusätzlich die Bildung des doppelt modifizierten Substrats **79** beobachtet wurde, und lieferte somit den finalen Liganden **78a** (Schema 22).

Mit Hilfe von Isophthalaldehyd wurde das Grundgerüst **74c** mit einer Aldehydgruppe in *meta*-Position des 2-Phenylrings synthetisiert. Für den weiteren Verlauf der Sequenz wurde eine Schützung dieser Funktion als Acetal mit Ethan-1,2-diol durchgeführt, das nach Substitution der 4-Position mit Phenethylamin sauer wieder gespalten wurde, um das Aldehyd für die darauf folgende Claisen-Schmidt-Kondensation zu **82** freizulegen. Abschließende Reduktion unter milden Bedingungen mit Eisen und NH₄Cl lieferte Zielsubstanz **78b** (Schema 23).⁹

⁹ Die Synthese von **77** und **78a,b** war Bestandteil der Master-Arbeit von Julia Hardick.

Schema 22:^a Allgemeine Reaktionssequenz zur Darstellung von Acylamid-dekorierten 7-Amino-2-arylchinazolinen.

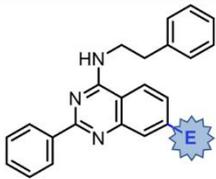
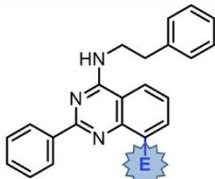
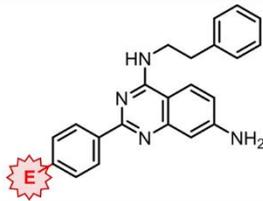
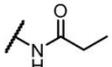
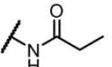
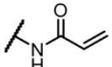
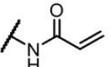
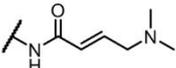
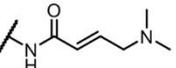
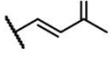
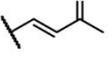
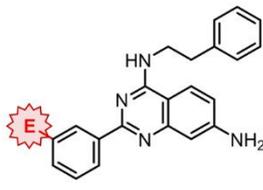
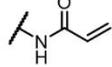
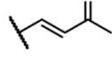
^a Reagenzien und Bedingungen: i) 1: 3-Nitrobenzaldehyd, *p*TsOH, THF, 30 min, rt, 2: PIDA, 2 h, rt (51 %); ii) 1: HCCP, DIPEA, MeCN, 1 h, rt, 2: Phenethylamin, 19 h, rt (87 %); iii) 10 % Pd/C, NH₄HCOO, EtOH, 5 h, 90 °C (93 %); iv) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 1 h, rt (49 %).

Schema 23:^a Allgemeine Reaktionssequenz zur Darstellung von Alkylketon-dekorierten 7-Amino-2-arylchinazolinen.

^a Reagenzien und Bedingungen: i) 1: Isophthalaldehyd, *p*TsOH, THF, 30 min, rt, 2: PIDA, 2 h, rt (88 %); ii) Ethan-1,2-diol, *p*TsOH, PhMe, 20 h, 120 °C, DS (75 %); iii) 1: HCCP, DIPEA, MeCN, 1 h, rt, 2: Phenethylamin, 19 h, rt (54 %); iv) HCl, MeOH, 3 h, 90 °C (75 %); v) Aceton, NaOH, 3 h, rt (65 %); vi) Fe, NH₄Cl, MeOH:H₂O (4:1), 3 h, 80 °C (55 %).

Zusammenfassend wurde eine Bibliothek aus potentiell kovalenten LiPoLis und reversiblen Gegenstücken synthetisiert, die insgesamt 15 Substanzen umfasst, um für die Adressierung der vier zuvor generierten p38 α -Mutanten eingesetzt werden zu können (Tab. 12). Die reaktiven Gruppen wurden dabei in 7- oder 8-Position sowie am 2-Phenylring der Liganden angebracht und unterscheiden sich hinsichtlich der Größe des eingeführten Michael-Akzeptor-Systems und Abstand der elektrophilen Position zum Chinazolin-Kern. Mit den nötigen Komponenten zur Verfügung sollte nachfolgend der Nachweis des verfolgten chemisch-genetischen Ansatzes über die Identifikation zueinander passender Protein-Liganden-Paare mittels MS realisiert werden.

Tab. 12: Chemische Strukturen der synthetisierten LiPoLis und der reversiblen Gegenstücke; E: Elektrophil (oder entsprechend reversibler Substituent).

					
LiPoLi	E	LiPoLi	E	LiPoLi	E
7a		7h		77	
7f		7i			
7g		7j			
72a		72c			
72b		72d	-		
73a		73b			
					
				LiPoLi	E
				78a	
				78b	

4.4 Massenspektrometrische Identifikation von Protein-Ligand-Addukten

Um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß die hergestellten LiPoLis die p38 α -Mutanten irreversibel modifizieren können, wurden massenspektrometrische Experimente zur Detektion kovalenter Addukte durchgeführt. Zum einen wurden sämtliche Liganden in Gegenwart der fünf Enzym-Varianten inkl. WT inkubiert und anschließend hinsichtlich einer Massenzunahme im Vergleich zum Apoprotein durchmustert und zum anderen wurde mit den auf diese Weise gefundenen Komplexen im Rahmen von MS/MS-Studien die genaue Position der gefundenen Markierung validiert.

4.4.1 Massenspektrometrie

Die Identifikation aufeinander abgestimmter Protein-Liganden-Paare wurde nach 1 h Inkubationszeit der LiPoLis mit den fünf verschiedenen Kinasen mittels MS durchgeführt. Die daraufhin erhaltenen Spektren wurden mit Messungen der Apoproteine in Anwesenheit von DMSO als Negativkontrolle (keine Modifikation) verglichen und ggf. resultierende Massendifferenzen berechnet (Abb. 35; Originalspektren siehe Anhang 9.3).¹⁰

In Experimenten mit p38 α WT, dem natürlicherweise ein Cystein in der Peripherie der LP fehlt, zeigten sich keine kovalenten Addukte aufgrund einer Modifizierung durch die Liganden. Diese Beobachtung lässt somit den indirekten Rückschluss zu, dass jegliche detektierte Massenzunahmen in Messungen mit den Mutanten durch die Reaktion von kovalent bindenden LiPoLis und den artifiziell eingeführten Cysteinen verursacht sein sollten. Darüber hinaus wurde in weiteren Experimenten in Anwesenheit der als reversible Gegenstücke synthetisierten Liganden **72a,c**, die keine reaktive Gruppe in Form eines Elektrophils besitzen, ebenfalls keine Modifizierung der Kinasen festgestellt.

¹⁰ Die massenspektrometrischen Experimente wurden zusammen mit Julia Hardick und Jörn Weisner sowie Petra Janning (MS/MS) durchgeführt.

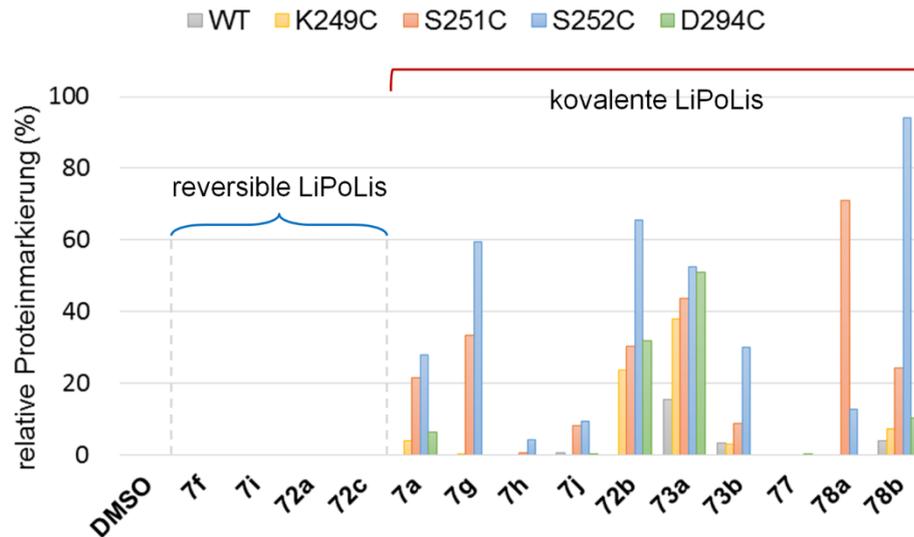


Abb. 35: Relative singuläre Proteinmarkierung der p38 α -Varianten in Gegenwart von dreifach stöchiometrischem Überschuss an kovalenten LiPoLis bzw. der reversiblen Gegenstücke.

Wurden die vier p38 α -Mutanten hingegen mit den kovalenten LiPoLis inkubiert, konnte in manchen Fällen eine Massenzunahme im Vergleich zum Apoprotein beobachtet werden, die jeweils einfachen Addukten der Kinasen im Komplex mit entsprechenden Liganden zugeordnet werden konnte. Aus diesen Ergebnissen ließen sich bzgl. Reaktivität der Elektrophil-tragenden Substanzen bzw. der adressierten Cysteine regelmäßige Muster in der Protein-Markierung ableiten. Nach Inkubation mit den irreversibel bindenden Liganden zeigte sich stets eine signifikante Modifizierung von p38 α S252C im Vergleich zu den übrigen Mutanten. Abhängig von der Position im Protein können Aminosäure-Seitenketten eine veränderte Nukleophilie besitzen. Beispielsweise verringert die Lage am N-terminalen Ende einer α -Helix den pK_a der Thiole von Cystein-Resten und beeinflusst somit die Wechselwirkung mit Elektrophilen, da die entsprechenden Seitenketten eine erhöhte Reaktivität besitzen.^[209] Weiterhin könnte das vorliegende Rotamer von Cys252 eine begünstigende Orientierung aufweisen, sodass es leichter zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den folglich leichter zugänglichen Aminosäuren und sich der LP nähernden, Michael-Akzeptoren-tragenden LiPoLis kommen kann.

Auf der anderen Seite könnte auch die Reaktivität der Elektrophile beeinflusst werden, welche von der Wahl der reaktiven Gruppe sowie der Art des dekorierten Grundgerüsts, der chemischen Verknüpfung und der Position in der sie angebracht wird, abhängig ist.^[210-211] Dies könnten mögliche Erklärungen für die ausgeprägte Bildung kovalenter Addukte in Gegenwart der 7-Alkylketone **72b** und **73a** im Vergleich zu den anderen LiPoLis sein.

Ein klar definiertes Profil bzgl. einer Modifikation der p38 α -Mutanten konnte nach Inkubation mit den 2-Aryl-modifizierten kovalenten LiPoLis **77** und **78a,b** beobachtet werden. Während das bzgl. des 2-Phenylrings *para*-substituierte **77** mit keiner der Kinasen zu reagieren schien, wurde für die *meta*-derivatisierten **78a,b** die signifikante Markierung jeweils einer bestimmten Mutante festgestellt, woraus sich mutmaßlich die Relevanz der gewählten Position am Lösungsmittel-exponierten Arylrest zur Einführung der reaktiven Gruppen ableiten lässt. Der Ligand **78a** bildete kovalente Addukte mit p38 α S251C und **78b** mit p38 α S252C und sparten gleichzeitig den WT sowie die beiden anderen Proteine (K249C, D294C) aus.

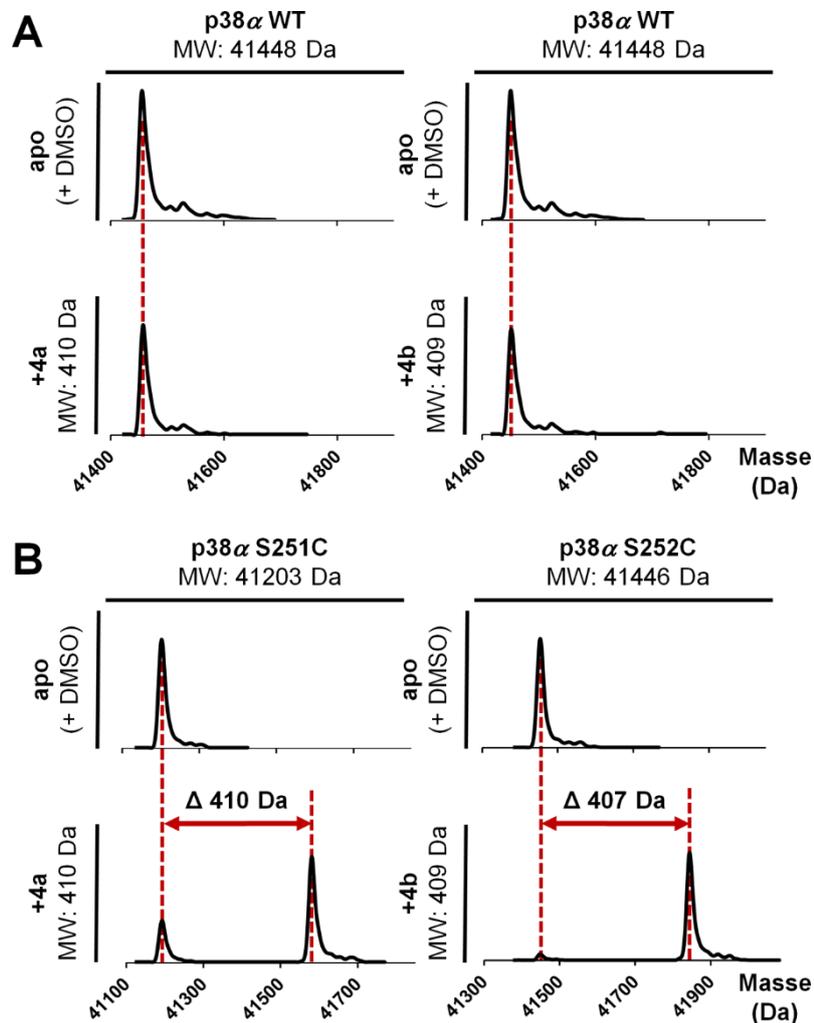


Abb. 36: Massenspektrometrische Identifikation von Protein-Ligand-Addukten. A) Massenspektren von p38 α WT in Abwesenheit (DMSO-Kontrolle) und Gegenwart von **78a** bzw. **78b**. B) Massenspektren von p38 α S251C bzw. S252C in Gegenwart von **78a** bzw. **78b**.

Die resultierende Massenzunahme konnte im Vergleich mit dem Spektrum des Apoproteins jeweils den entsprechenden Substanzen zugeordnet werden (Abb. 36). Diese Beobachtungen stehen folglich mit den initialen Überlegungen zum Design der kovalenten LiPoLis auf Grundlage der entworfenen Mutanten überein und bestätigen damit die Arbeitshypothese des postulierten chemisch-genetischen Ansatzes.

4.4.2 Tandem-Massenspektrometrie

In der Durchmusterung der Substanzbibliothek der Elektrophil-dekorierten LiPoLis konnte zwar die kovalente Adressierung von bestimmten p38 α -Mutanten nachgewiesen werden, jedoch keine direkte Aussage über die tatsächliche Position der Modifizierung durch die Liganden getroffen werden. Um die identifizierten Protein-Ligand-Addukte diesbezüglich genauer zu untersuchen, wurden MS/MS-Messungen durchgeführt, die eine eingehendere Charakterisierung bzgl. der tatsächlichen Markierungsposition ermöglichen.

Die nach Inkubation von p38 α S251C bzw. S252C mit den kovalenten LiPoLis **78a** bzw. **78b** erhaltenen Proben der Protein-Liganden-Komplexe wurden hierfür mit Hilfe von tryptischen Verdaus analysiert. In den Versuchen wurde eine unvollständige Sequenzabdeckung der Ansätze beobachtet, sodass nicht in allen Fällen die relevanten Abschnitte, welche die eingeführten Cysteine tragen, identifiziert werden konnten, was bspw. durch ungünstiges Flugverhalten der generierten (und ggf. modifizierten) Peptidfragmente erklärt werden könnte. Aus diesem Grund konnte S252C als Markierungs-Position für LiPoLi **78b** im Rahmen der Tandem-MS-Experimente nicht bestätigt werden. Allerdings wurde das mit dem Liganden **78a** reagierende Peptidfragment von p38 α S251C (ICSESAR) erfolgreich nachgewiesen und zeigte eine Massenzunahme, die dem Molekulargewicht der entsprechenden Substanz zugeordnet werden konnte (Abb. 37). Folglich wies das dieser Probe zugrunde liegende Spektrum das markierte y₆-Fragment¹¹ auf, das in Kombination mit den ebenfalls markierten b₂- und b₃-Fragmenten¹² sowie dem nicht modifizierten y₅-Fragment¹³, dem das adressierte Cystein fehlt, eine zweifelsfreie Validierung der Reaktion von **78a** mit Cys252 zuließ.

¹¹ CSESAR, MW: 652.3 Da; berechnet für [y₆+**78a**]⁺: 1062.3 Da, gefunden: 1061.5 Da

¹² IC, MW: 217.3 Da; berechnet für [b₂+**78a**]⁺: 627.3 Da, gefunden: 626.3 Da;

ICS, MW: 304.3 Da; berechnet für [b₃+**78a**]⁺: 714.3 Da, gefunden: 713.3 Da

¹³ SESAR, MW: 549.3 Da

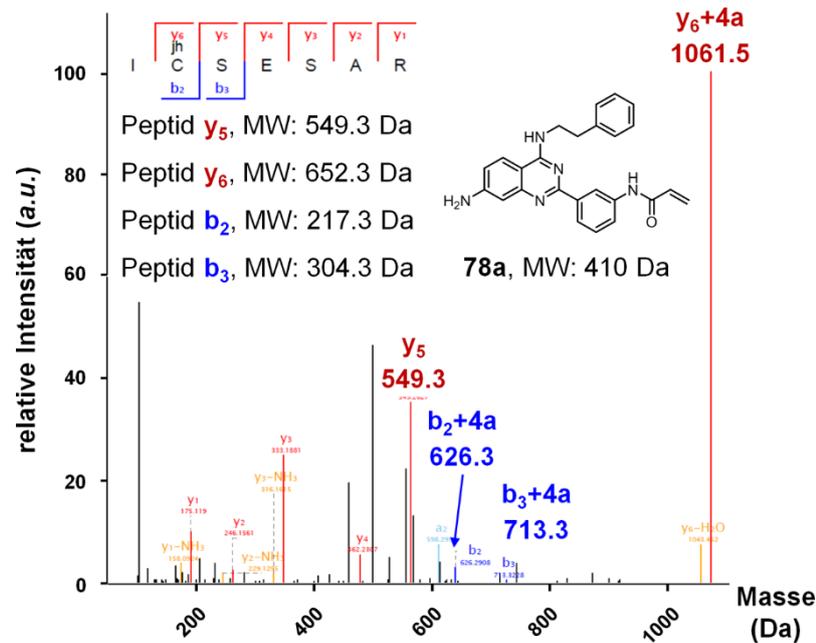


Abb. 37: MS/MS-Spektrum von p38 α S251C nach Inkubation mit **78a**, tryptischem Verdau und Analyse der erhaltenen Peptidfragmente.

Diese Ergebnisse bekräftigen das Konzept des chemisch-genetischen Ansatzes noch weiter und bestätigen somit die Arbeitshypothese, indem die erfolgreich nachgewiesene, spezifische Reaktion bestimmter kovalenter LiPoLis mit entsprechenden Cysteintragender p38 α -Mutanten dem Struktur-basierten Design folgte. Im Rahmen der weiterführenden Evaluierung sollte mit Hilfe von Kristallisationsexperimenten die Ausbildung einer kovalenten Bindung weiterhin verifiziert werden und eine Analyse des Bindungsmodus sowie der zugrundeliegenden Wechselwirkungen der Liganden mit der Kinase durchgeführt werden.

4.5 Strukturbiologische Charakterisierung

Ko-Kristallisationsansätze wurden unabhängig von den bisherigen Resultaten der massenspektrometrischen Charakterisierung und Identifikation von Protein-Ligand-Paaren mit sämtlichen LiPoLis der synthetisierten Substanzbibliothek sowie allen fünf p38 α -Varianten inkl. WT vorgenommen. Die gewählten Bedingungen entlehnten aus den Versuchen mit den reversiblen Bindern, wobei insb. Tropfen in Abwesenheit von BOG als potentieller Kompetitor der LiPoLis angesetzt wurden (vgl. Kapitel 3.4).

Hierbei wurde in Gegenwart von in 7- und 8-Position derivatisierten Liganden hauptsächlich die Bildung von Präzipitaten beobachtet. Für die am 2-Phenylring substituierten LiPoLis ergaben zwei Protein-Ligand-Kombinationen reproduzierbare Kristalle, die bereits innerhalb weniger Minuten nach Zugabe von Reservoir-Lösung sichtbar waren. Im Einklang mit den Ergebnissen der MS-Messungen handelte es sich dabei um Ansätze mit p38 α S251C in Anwesenheit von **78a** und p38 α S252C nach Inkubation mit **78b**, während in Gegenwart des in *para*-Position am 2-Arylsystem derivatisierten Liganden **77** kein Kristallwachstum festgestellt wurde.¹⁴ Die beiden entsprechenden Komplex-Strukturen konnten daraufhin erfolgreich gelöst werden (Abb. 38A,B).

Im Allgemeinen wurde in Übereinstimmung mit der anfänglichen Planung der kovalenten LiPoLis die Beibehaltung der bereits zuvor beobachteten, charakteristischen Wechselwirkungen der reversiblen Chinazolin-basierten Liganden innerhalb der LP festgestellt. Diese schließen die als essentiell betrachtete π - π -Stapelinteraktion des Grundgerüsts mit der Seitenkette von Trp197, die direkte WBB zwischen dem 7-Amin und Asp294 sowie die Bindung des hydrophoben Phenethylrests tief ins Innere der Tasche ein. Darüber hinaus wiesen die am 2-Phenylring angebrachten Elektrophile jeweils eine Orientierung in Richtung des Solvens und somit der eingeführten Cysteine auf.

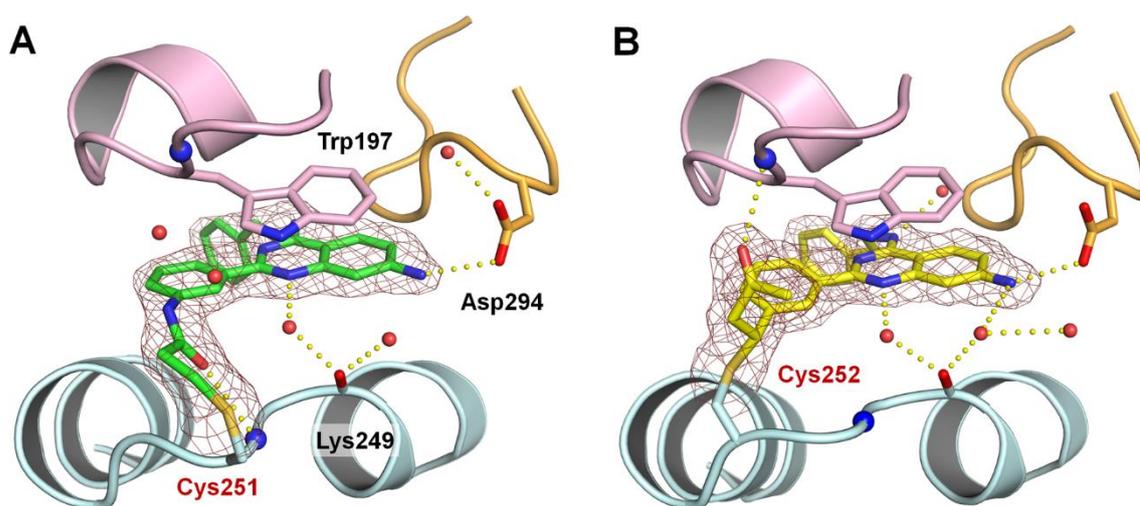


Abb. 38: Ko-Kristallstrukturen von kovalenten LiPoLis im Komplex mit p38 α -Mutanten. Darstellungen von A) p38 α S251C im Komplex mit **78a** (grün; 2.0 Å; PDB: 5O8U); B) p38 α S252C im Komplex mit **78b** (gelb; 2.0 Å; PDB: 5O8V); 2mF_o-DF_c-Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte).

¹⁴ Das Ansetzen der Kristallisationsplatten erfolgte im Rahmen der Master-Arbeit von Julia Hardick.

Maßgeblich wurde für **78a** die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu Cys251 anhand der deutlich definierten Elektronendichte zwischen Michael-Akzeptor-System des LiPoLis und der nukleophilen Seitenkette in der Kinase beobachtet (Abb. 38A). Der Carbonyl-Sauerstoff des Acrylamids bildet dabei eine zusätzliche WBB zum Rückgrat-NH von Cys251 aus und stabilisiert somit möglicherweise die Ausrichtung des Elektrophils in Richtung des adressierten Thiol(at)s. Ebenso zeigte **78b** im Komplex mit p38 α S252C eine klar aufgelöste Elektronendichte zwischen dem artifiziellen Cystein und dem am 2-Phenylring eingeführten reaktivem Alkylketon (Abb. 38B). Die Carbonylgruppe des Elektrophils geht zusätzlich eine direkte Wechselwirkung mit dem Rückgrat-NH von Trp197 ein, sodass die endständige Methylgruppe des Liganden zum Lösungsmittel orientiert ist.

Neben der MS-gestützten Identifikation von **78a** und p38 α S251C, bzw. **78b** und p38 α S251C, als aufeinander abgestimmte Protein-Ligand-Paare führten in den strukturellen Experimenten insb. ausschließlich diese beiden Komplexe zu einer Bildung von Kristallen und konnten entsprechend erfolgreich gelöst werden. Auf diese Weise wurde die bemerkenswerte Selektivität der kovalenten LiPoLis **78a,b** gegenüber p38 α S251C bzw. S252C weiterhin bekräftigt und könnte den Ausgangspunkt für weiterführende Studien darstellen. Eine Weiterentwicklung und Derivatisierung der Substanzen auf Grundlage der neuen Kristallstrukturen oder der direkte Einsatz als Sondenmoleküle, bspw. hinsichtlich pharmakologischer Perturbationsexperimente in zellulären Systemen, könnte demnach zur Aufklärung der biologischen Funktion der LP beitragen.

4.6 Aktivitäts-basierte Messungen

Mit den kovalenten Liganden und den entsprechenden p38 α -Mutanten wurden Aktivitäts-basierte HTRF[®]-Messungen durchgeführt, um einen potentiellen Effekt der LiPoLis auf den katalytischen Phosphattransfer innerhalb dieses artifiziellen Systems zu untersuchen (Tab. 13). Hierbei wurde beobachtet, dass die etablierten ATP-kompetitiven Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L alle Protein-Varianten gleichermaßen inhibierten (45 – 91 nM bzw. 2.7 – 3.9 nM).

Tab. 13: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der ATP-kompetitiven Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L sowie den LiPoLis **3a** (reversibel), **78a** und **78b** (kovalent), auf fünf p38 α -Varianten inkl. WT. Die gemittelten Werte und Standardabweichungen der Parameter wurden in drei unabhängigen Einzelmessungen bestimmt.

p38 α -Variante	IC ₅₀ (nM)							
	SB203580		Skepinone-L		3a	78a	78b	
WT	45.4	± 17.7	2.7	± 0.6	n.i.	n.i.	n.i.	
K249C	53.3	± 25.1	3.6	± 1.3	n.i.	n.i.	n.i.	
S251C	70.9	± 37.3	3.2	± 0.9	n.i.	n.i.	n.i.	
S252C	74.8	± 32.4	3.9	± 1.1	n.i.	n.i.	3540	± 1091
D294C	91.0	± 36.0	2.9	± 0.8	n.i.	n.i.	n.i.	

n.i.: keine Inhibition (*no inhibition*)

Der reversible bindende LiPoLi **3a** zeigte hingegen keine Hemmung der fünf getesteten Kinasen, was in Übereinstimmung mit der vorherigen Charakterisierung dieser Substanz steht (Kapitel 3.3). Ebenso konnte für **78a** keine Inhibition der Enzyme festgestellt werden. Allerdings wurde für **78b** gegenüber p38 α S252C ein IC₅₀ von ca. 3.5 μ M bestimmt, einem Protein-Ligand-Paar, das zuvor bereits eine spezifische Bindung zueinander zeigte (Kapitel 4.4).

Diese Inhibition ist unwahrscheinlich auf eine Besetzung des aktiven Zentrums zurückzuführen, wie es für andere LiPoLis beschrieben wurde^[94,98], da die Dekoration des 2-Phenylrings mit den hier eingesetzten Elektrophilen zu einem sterischen Zusammenstoß innerhalb der entsprechenden Bindetasche führen würde. Der experimentelle Befund unterstützt jedoch zuvor postulierte Hypothesen zu einer Feinregulierung von p38 α durch LiPoLis und substanziiert darüber hinaus den Erfolg des chemisch-genetischen Ansatzes hinsichtlich des identifizierten Protein-Ligand-Addukts.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

4.7.1 Zusammenfassung

In Vorarbeiten wurde eine umfassende Substanzbibliothek reversibler LiPoLis zur Adressierung der LP in p38 α synthetisiert und mittels SPR, orthogonalen biophysikalischen Methoden sowie anhand einer Reihe von verschiedenen Ko-Kristallstrukturen charakterisiert. Ausgehend von der beobachteten, geringen Affinität der Liganden gegenüber der Kinase wurde folglich ein chemisch-genetischer Ansatz zur Optimierung der 2-Arylchinazoline verfolgt. Hierbei sollte durch zweckmäßige Modifikation der LiPoLis und des Zielproteins eine maximale Verweildauer am Enzym durch Knüpfung einer kovalenten Bindung erzielt und somit ein Einsatz der hervorgehenden Liganden als geeignete Sondenmoleküle für Studien zur Untersuchung der biologischen Rolle der LP ermöglicht werden.

Zunächst wurden auf Grundlage der Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen mit reversibel bindenden LiPoLis das Design von Elektrophil-modifizierten LiPoLis und Cystein-tragenden Mutanten der Kinase vorgenommen. Dabei konnte von der Kenntnis von Substitutionsmustern, die weiterhin eine Bindung in die lipophile Tasche in p38 α erlauben, den bereits etablierten Synthesevorschriften zur Herstellung Chinazolin-basierter Liganden sowie insb. von diversen gelösten Ko-Kristallstrukturen profitiert werden. Entsprechend wurden Aminosäuren in der Peripherie der LP ausgewählt (Lys249, Ser251, Ser252, Asp294), die mittels ortsgerichteter Mutagenese durch Cysteine ersetzt wurden. Nach Expression und Reinigung der resultierenden Proteine wurden die Kinasen in Anwesenheit von MKK6 doppelt phosphoryliert und somit aktiviert, sodass in einem Aktivitäts-basierten Assay die katalytische Integrität der Enzyme sichergestellt sowie eine Beeinträchtigung der katalytischen Funktion durch die eingebrachten Mutationen ausgeschlossen werden konnten. Hinsichtlich der Positionen der ausgewählten Seitenketten wurde folglich eine Substanzbibliothek an Liganden entworfen, die strukturell unterschiedliche Michael-Akzeptor-Systeme trugen, um potentiell eine kovalente Adressierung der LP und die damit einhergehende Ausbildung einer irreversiblen chemischen Bindung zu den p38 α -Varianten zu ermöglichen (Abb. 39).

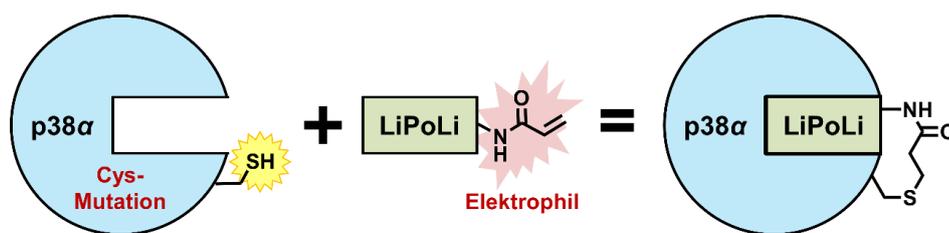


Abb. 39: Schematische Darstellung des chemisch genetischen Ansatzes zur kovalenten Adressierung der LP in Cystein-tragenden Mutanten von p38 α mit Elektrophil-modifizierten LiPoLis.

Im Rahmen von massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgte die Identifizierung von Protein-Ligand-Addukten anhand der Massenzunahme der Proteine in Anwesenheit der synthetisierten Liganden im Vergleich zum Spektrum des jeweiligen Apoproteins. Kontrollexperimente zeigten dabei keine Modifikation von p38 α WT oder in Gegenwart von LiPoLis ohne Elektrophil, während für **78a,b** eine selektive Markierung von p38 α S251C bzw. S252C beobachtet werden konnte. Eine Validierung der artifiziell in der Umgebung der Tasche eingeführten Cysteine als tatsächliche, mit den Liganden reagierte Markierungsposition erfolgte mittels Tandem-MS nach proteolytischen Verdau der entsprechenden Proben. Hierbei konnte für p38 α S251C nach Inkubation mit **78a** das diesbezügliche Peptidfragment detektiert werden, das exklusiv die Modifikation mit dem kovalenten LiPoLi aufwies. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem initialen Design aufeinander abgestimmter Protein-Liganden-Paare, die in Form von p38 α S251C bzw. S252C und **78a** bzw. **78b** identifiziert wurden. Letztlich konnten diese beiden Komplexe erfolgreich ko-kristallisiert werden, wobei die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen den Michael-Akzeptoren der LiPoLis und Cys251 bzw. Cys252 zweifelsfrei anhand der jeweils eindeutig definierten Elektronendichten nachgewiesen wurde.

In ihrer Gesamtheit bestätigen diese Ergebnisse die anfänglich aufgestellte Arbeitshypothese, indem durch einen chemisch-genetischen Ansatzes die Generierung, Identifikation und Validierung spezifischer Paare Elektrophil-tragender Liganden und Cys-Mutanten von p38 α gelang und Selektivität einzelner kovalenter LiPoLis (**78a,b**) für bestimmte Kinase-Varianten gegenüber den übrigen generierten Proteinen inkl. WT erzielt wurde. Mit Hilfe der gewählten Strategie wurden Chinazolin-basierte Liganden entwickelt, die erstmals die irreversible Adressierung der LP in funktionell integren p38 α -Mutanten ermöglichen und auf diese Weise eine signifikante Erhöhung der ursprünglich schwachen Affinität reversibler LiPoLis aufgrund einer maximierten Verweilzeit in der Tasche bewirken.

4.7.2 Ausblick

Die hergestellten kovalenten Liganden könnten in zukünftigen Experimenten als potentielle Sondenmoleküle zur chemischen Perturbation der jeweils adressierten Mutanten genutzt werden, um einen Beitrag zur Aufklärung der bislang nicht vollständig verstandenen biologischen Funktion der LP zu liefern. Als eine Möglichkeit wird in der Literatur die Rolle der Tasche (und ihrer Liganden) in der Feinregulierung des Aktivierungszustandes der Kinase diskutiert.^[86,94,99] Im Gegensatz zu den reversiblen Chinazolin-basierten LiPoLis (bspw. **3a**) in Anwesenheit des WT, wurde mit dem kovalent bindenden Analogon **78b** eine Inhibition von p38 α S252C im HTRF[®]-Assay festgestellt ($IC_{50} = 3.5 \pm 1.1 \mu\text{M}$; Tab. 13).¹⁵ Weiterhin könnten Einflüsse der LiPoLis auf die Kinaseaktivität hinsichtlich synergistischer Effekte bei gleichzeitiger Adressierung von p38 α mit ATP-kompetitiven Inhibitoren und kovalenten Liganden der LP mittels HTRF untersucht werden. Beispielsweise könnte die Besetzung der Tasche in Nähe des MAPK-*inserts* die hemmende Wirkung bekannter p38 α -Inhibitoren verstärken bzw. vermindern. Als Beispiel für einen solchen Ansatz konnte anhand der klinisch relevanten Abelson-Kinase in Gegenwart des allosterischen Hemmstoffs GNF-2 gezeigt werden, dass in Kombination mit dem ins aktive Zentrum bindenden Inhibitor Nilotinib eine signifikant potentere Inhibition im Vergleich zu Messungen mit den jeweils einzelnen Substanzen erzielt wurde.^[33,212]

Die beobachtete Inhibition von p38 α S252C durch **78b** könnte darauf hinweisen, dass die LP tatsächlich mit der Kinaseaktivität in Zusammenhang stehen könnte (Tab. 13). Kovalente Liganden könnten demnach hilfreiche molekulare Werkzeuge darstellen, um entsprechende zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären.

Insbesondere wurde in vorherigen Studien zu dieser Fragestellung die Stabilisierung und Feinjustierung der Aktivierungsschleife^[86], bspw. über eine Interaktion mit dem konservierten APE-Motiv am C-terminalen Ende dieses Struktur-Motivs^[97], als mutmaßliche Funktionsweise von LiPoLis in Erwägung gezogen (Abb. 40A,B). Um diese Hypothesen eingehender zu untersuchen, könnte eine Beobachtung von diesbezüglichen Konformationsänderungen in An- und Abwesenheit der synthetisierten kovalenten Liganden der LP verfolgt werden, wobei dies für die natürlicherweise sehr flexible Aktivierungsschleife eine Herausforderung darstellt und z.B. eine Analyse über Kristallisationsexperimente erschwert bzw. ausschließt. Stattdessen könnten Reporter-

¹⁵ Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde von Jörn Weisner durchgeführt.

Funktionen in das Protein eingebracht werden, die eine Detektion struktureller und konformativer Modulationen, bspw. in Form von Abstandsmessungen, erlauben. Hierfür könnten prinzipiell Umgebungs-sensitive Fluorophore verwendet werden, wie sie bereits in verschiedenen Proteinen genutzt wurden, um ATP-kompetitive und allosterische Inhibitoren in Screening-Assays zu identifizieren.^[36,213-214] Mit Hilfe von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierten Ansätzen könnte darüber hinaus die räumliche Annäherung zweier fluoreszierender Markierungen detektiert werden.^[215] Alternativ dazu könnten Elektronenspin-Resonanz (EPR)-Messungen durchgeführt werden, wie sie kürzlich in p38 α angewandt wurden.^[216-217] Dabei konnte gezeigt werden, dass mittels in der Aktivierungsschleife eingeführten Spin-Markierungen in Anwesenheit entsprechender Inhibitoren die Stabilisierung von DFG-*in* und -*out*-Zustand der Kinase unterschieden werden kann. Die für diese Strategien notwendigen Modifikationen von Proteinen können unter Umständen von Nachteil sein, da die strukturelle oder katalytische Integrität der Enzyme oder die Bindung von Liganden potentiell beeinflusst werden können, wobei sich die hier relevante Bindestelle (LP) allerdings räumlich entfernt von der Aktivierungsschleife befinden würde. Ein Vorteil von Spin-Markierungen gegenüber Fluorophoren liegt in der Verwendung kleinerer Reportermoleküle, durch die weiterhin einer Überschneidung mit der Eigenfluoreszenz von Proteinen oder niedermolekularen Substanzen sowie einem Fotobleaching oder Quenching unter bestimmten experimentellen Bedingungen vorgebeugt wird (Abb. 40C).

Des Weiteren könnte im Rahmen einer Struktur-basierten, chemischen Derivatisierung der kovalenten LiPoLis eine gezielte Interaktion mit dem APE-Motiv oder der direkten Umgebung induziert und der Einfluss auf die Kinaseaktivität untersucht werden. Beispielsweise könnte durch Einführung von Wasserstoffbrücken-Donoren eine Adressierung von Glu192 verfolgt werden, indem entsprechende Diamin-Bausteine (**85**, **90**) in 4-Position des Chinazolin-Grundgerüsts eingeführt werden (Abb. 41). Abhängig von der Größe bzw. Länge der gewählten Substituenten könnte mutmaßlich eine stabilisierende Wechselwirkung oder unter Umständen eine Verdrängung der Seitenkette und damit verbundene Umordnung des APE-Motivs resultieren.

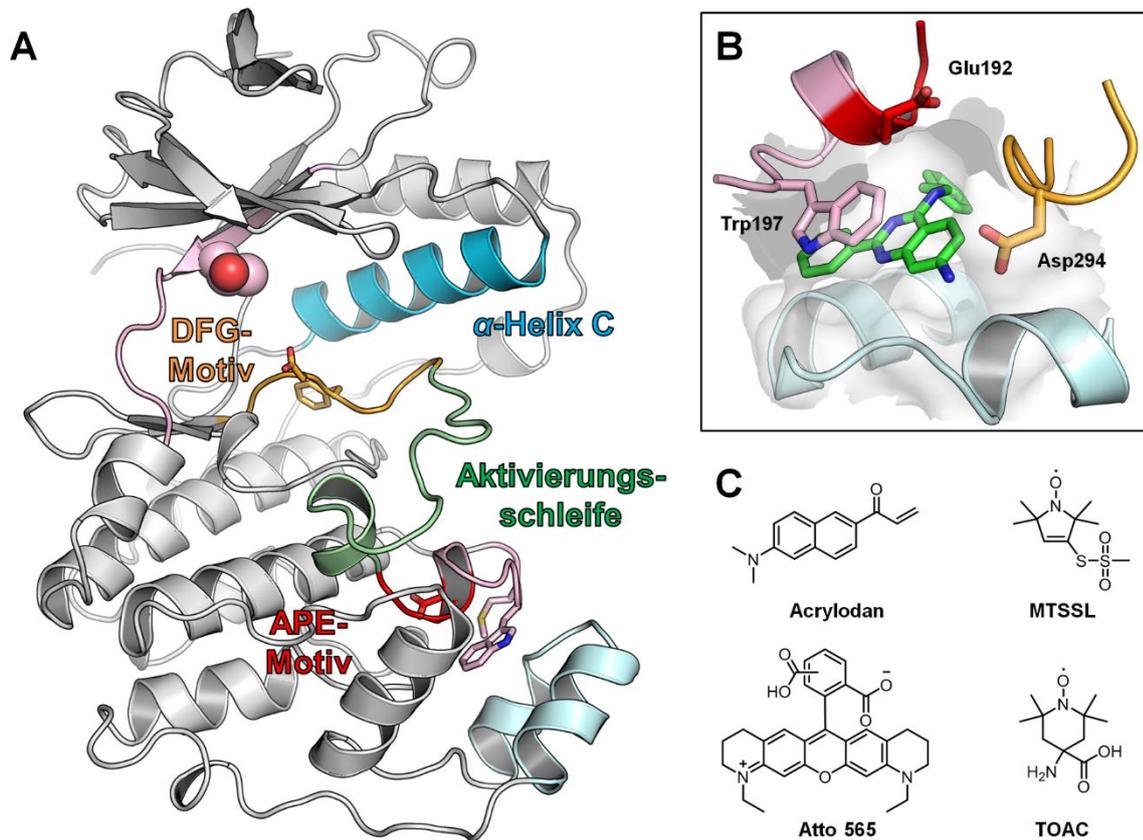


Abb. 40: Strukturelle Grundlage einer möglichen Feinregulation der Kinaseaktivität durch LiPoLis. A) Übersichtsdarstellung der Kinasedomäne von p38 α mit DFG-Motiv (orange) am N-terminalen und APE-Motiv (rot) am C-terminalen Ende der Aktivierungsschleife (grün) (PDB: 1P38); B) Lokalisation und Orientierung des APE-Motivs in Gegenwart von in die LP gebundenem LiPoLi **3a** (grün) (PDB: 4DLJ); C) chemische Strukturen der Fluorophore Acrylodan und Atto 565 sowie der als Spin-Markierungs-Reagenzien genutzten Nitroxide 1- λ^1 -Oxidanyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-(methylsulfonylsulfanyl)methylpyrrol (MTSSL) und 2,2,6,6-tetramethyl-N-oxyl-4-amino-4-carboxylsäure (TOAC).

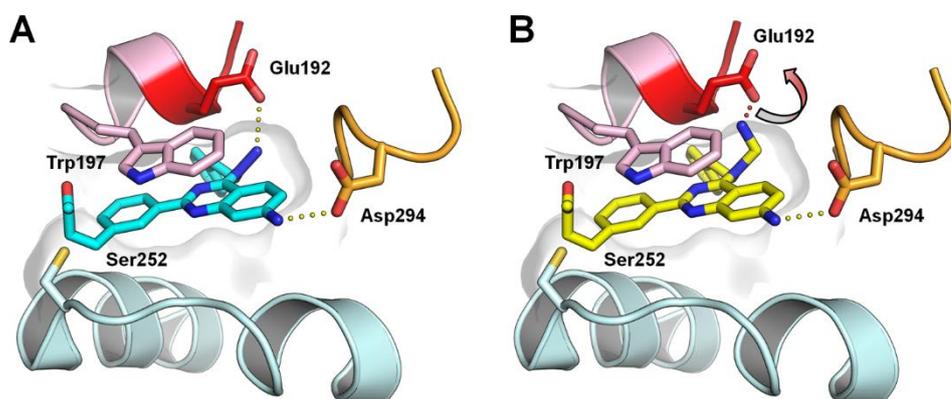
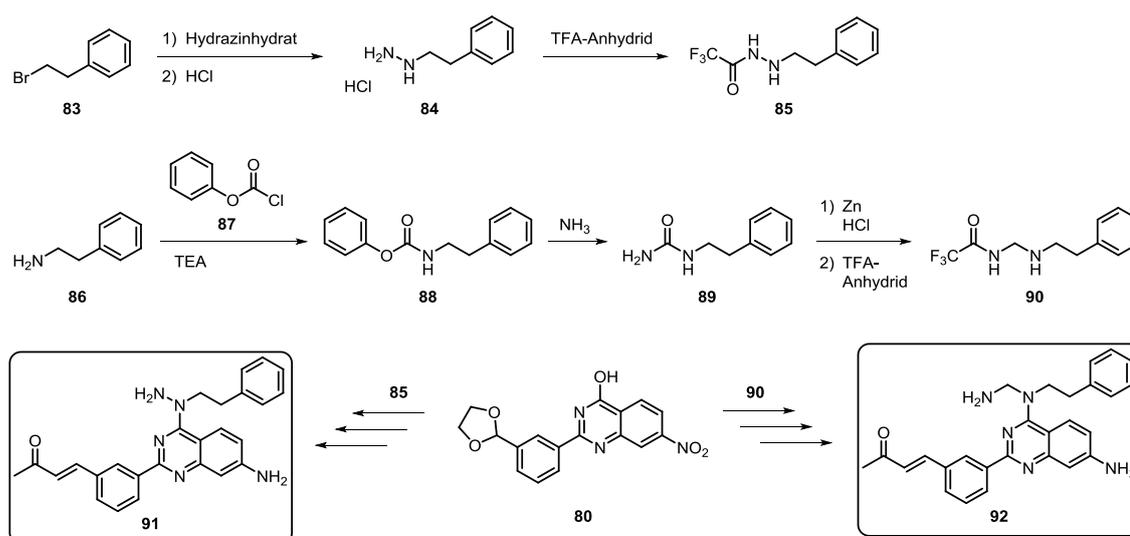


Abb. 41: Design kovalenter LiPoLis zur Interaktion mit dem APE-Motiv. Modellierung von A) **91** (cyan) und B) **92** (gelb) in die LP von p38 α ; WBBs (gelbe Punkte) (basierend auf PDB: 4DLJ).

Synthetisch wären die beispielhaften Amine (**85**, **90**) einerseits über Umsetzung von 2-Phenethylbromid **83** mit Hydrazinhydrat, anschließender Bildung des Hydrochlorids **84** und finaler TFA-Anhydrid-Schätzung zugänglich. Zum anderen könnte ausgehend von Phenethylamin und Chlorformiat **87** ein Vorläufer des Harnstoffderivats **89** generiert werden. Reduktion und Einführung der TFA-Anhydrid-Schutzgruppe sollte die Zielsubstanz **90** ergeben (Schema 24). Die Amine können dann unter den bereits beschriebenen Verbindungen in 4-Position des Intermediats **80** eingebracht werden. Die restliche Reaktionssequenz würde schließlich für beide Derivate über Freilegung des als Acetal maskierten Aldehyds, Erzeugung des elektrophilen Alkylketons im Rahmen einer Claisen-Schmidt-Kondensation und abschließender simultaner Reduktion der 7-Nitrogruppe und Entschätzung der acetylierten Amine unter milden reduktiven Bedingungen verlaufen, um die kovalenten LiPoLis **91** und **92** zu erhalten.

Ferner könnte durch eingehendere Derivatisierung möglicherweise die inhibitorische Potenz der irreversibel bindenden Liganden **78a,b** verbessert werden. Beispielsweise könnte eine Kombination dieser LiPoLis mit strukturellen Elementen der zuvor identifizierten reversiblen Binder, insb. bzgl. der verschiedenen Substituenten in 4-Position, erfolgen. Im Gegensatz zu den ursprünglichen Liganden sollte aufgrund der gesteigerten Verweildauer am Enzym der kovalenten Analoga das Aufstellen von SARs und eine daraus abgeleitete iterative Optimierung der LiPoLis ermöglicht werden.

Schema 24: Vorschlag einer Syntheseroute zur Darstellung von **91** und **92** als kovalente LiPoLis zur Interaktion mit dem APE-Motiv.



In den MS-basierten Experimenten wurde beobachtet, dass eine Einführung von Elektrophilen in *meta*-Position am 2-Phenylring zur Adressierung von Cys251 bzw. Cys252 geeignet ist, während in Gegenwart vom entsprechenden *para*-substituierten **77** keine Bildung von Addukten mit den generierten Mutanten festgestellt wurde. Ausgehend von der Ko-Kristallstruktur von Acetamid **3t** im Komplex mit p38 α könnten unter Verwendung des Methylamins **3s** Elektrophile in Form entsprechender Säuren oder Säurechloriden in *para*-Position am 2-Phenylring des Chinazolins eingeführt werden (Abb. 42A). Die reaktive Stelle des Michael-Akzeptors in **93** wäre im Vergleich zu den bisherigen kovalenten LiPoLis in einem größerem Abstand zum Grundgerüst lokalisiert und ermöglicht daher eine potentielle Adressierung von entsprechenden Mutanten der Zielkinase, wie z.B. p38 α S254C oder p38 α N196C (Abb. 42B,C). Hinsichtlich der bereits identifizierten Paare könnten vergleichende Charakterisierungen bzgl. der Reaktivität der eingeführten Elektrophile gegenüber der generierten p38 α -Varianten bzw. der Inhibition dieser Proteine erfolgen. Dabei könnten sich folglich prävalente Eigenschaften für einen zukünftigen Einsatz in zellulären Studien oder als allosterische Inhibitoren ergeben.

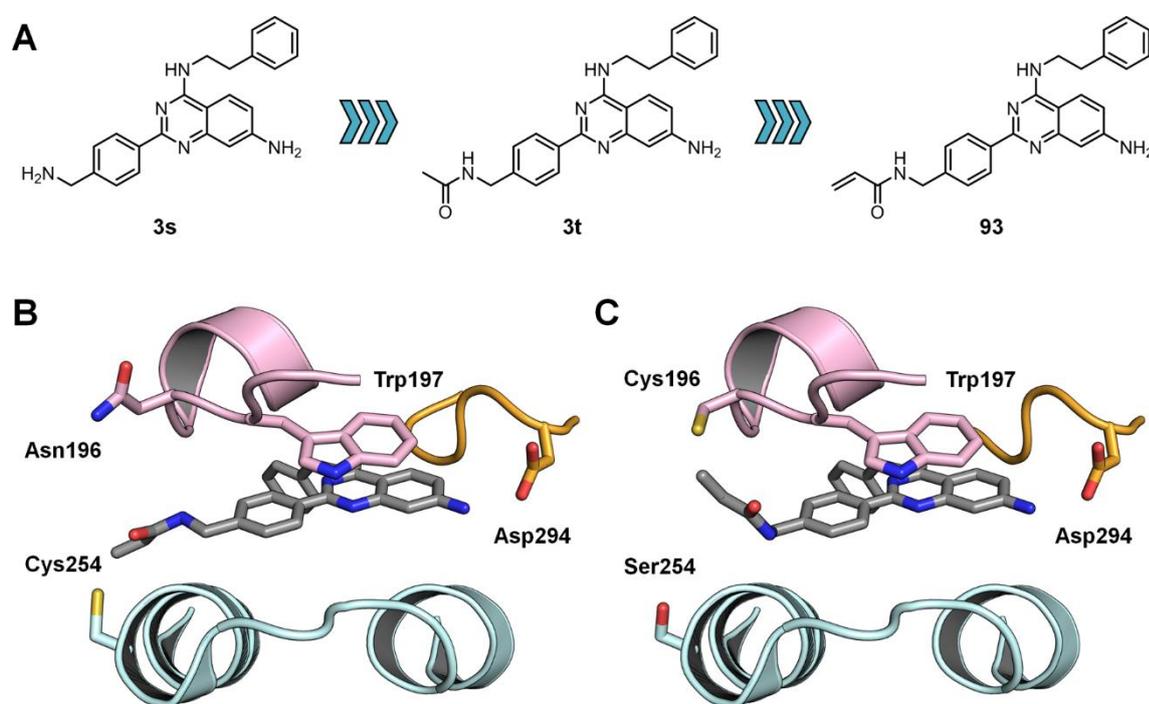


Abb. 42: Design kovalenter LiPoLis zur Adressierung von p38 α S254C, bzw. N196C. A) Schematische Ableitung des kovalenten LiPoLis **93** aus den strukturellen Vorläufern **3s,t**; B) Modellierung von **93** (grau) in die LP von p38 α mit zu S254C ausgerichtetem Elektrophil; C) Modellierung von **93** (grau) in die LP von p38 α mit zu N196C ausgerichtetem Elektrophil (basierend auf PDB: 4DLJ).

Im Hinblick auf eine möglichst diverse Reihe an spezifischen, elektrophilen Sondenmolekülen könnte die Adressierung alternativer Aminosäuren neben Cysteinen verfolgt werden, die darüber hinaus natürlicherweise in der Kinase vorkommen und keine Mutagenese erfordern. Zu entsprechenden reaktiven Gruppen zählen zum einen Sulfonsäurefluoride, die insb. mit nukleophilen Seitenketten von Serinen (sowie Threonin und Tyrosin) und Lysinen selektiv reagieren können, wie bspw. anhand von Serin-Proteasen^[218] und Hydrolasen^[219] bzw. von Glutamat-Dehydrogenasen^[220] oder Kinasen^[221] demonstriert wurde. Zum anderen wurden mit Hilfe von Isoxazolium-Salzen als reaktive Gruppen kovalente Inhibitoren hergestellt, die Glutaminsäuren adressieren.^[222]

In der Umgebung der LP sind einige natürlich vorkommende, nukleophile Seitenketten lokalisiert, die möglicherweise mit passenden Elektrophil-dekorierten LiPoLis kovalente Bindungen ausbilden könnten. Zu diesen Aminosäuren zählen bspw. Asp292, Ser293, Asp294 und Lys295 in der Schleife neben der 6-/7-Position der gebundenen Chinazoline sowie Lys248, Lys249, Ser251, Ser252 und Ser254 im Bereich der α -Helices 1L14 und 2L14, die sich potentiell in räumlicher Nähe zu entsprechenden Liganden in der Tasche befänden (Abb. 43A).

Insbesondere Ser251 und Ser252 könnten in Analogie zum durchgeführten chemisch-genetischen Ansatz mit reaktiven Gruppen, wie z.B. Sulfonylfluoriden in *meta*-Position des 2-Phenylrings von **97**, modifiziert werden können (Abb. 43B). Dahingegen würden Asp292, Ser293, Lys295, Lys248 und Ser254 eher ungünstige Orientierungen für die Adressierung mit Elektrophilen annehmen oder bestimmte miteinander interagierende Seitenketten, wie im Fall von Lys249 und Asp292 bzw. Asp294, von entsprechenden Einheiten behindert werden. Die für die Herstellung von **97** erforderliche Sulfonsäure-Gruppe könnte in Form des Benzaldehyds **93** im Rahmen einer Kondensation von Anthranilamid **4b** in das Chinazolin-Grundgerüst eingeführt werden, das anschließend nach den bereits beschriebenen Vorschriften substituiert und reduziert werden kann. Der Schlüsselschritt der Generierung vom finalen Sulfonylfluorid **97** aus dem resultierenden Intermediat **95** würde eine nach Chlorierung der Säure erfolgende Umsetzung mit Kaliumhydrogenfluorid darstellen (Schema 25).^[223]

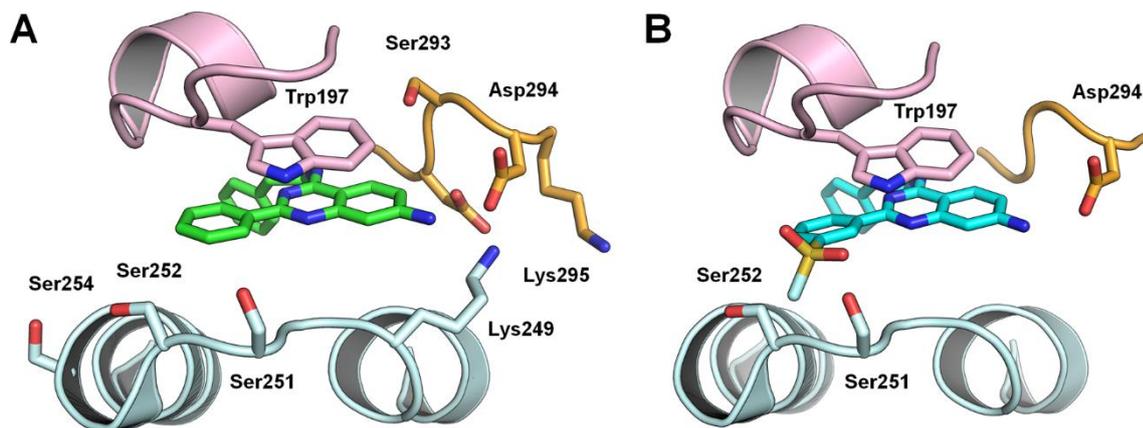
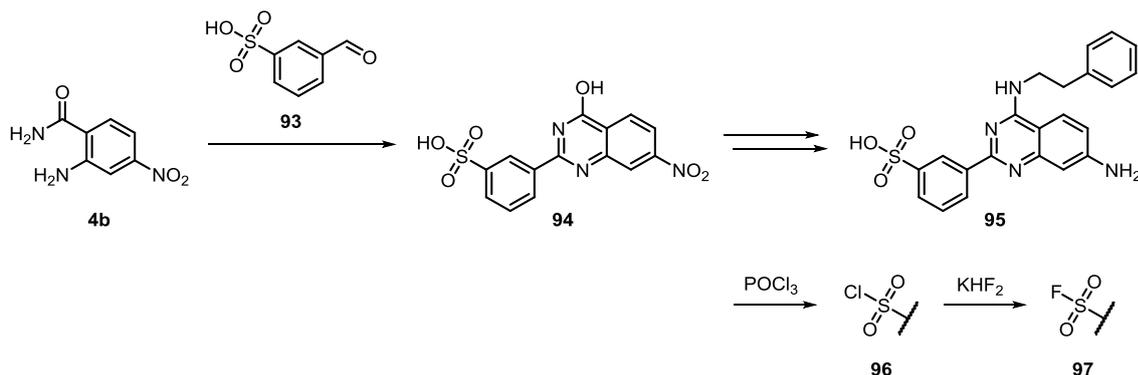


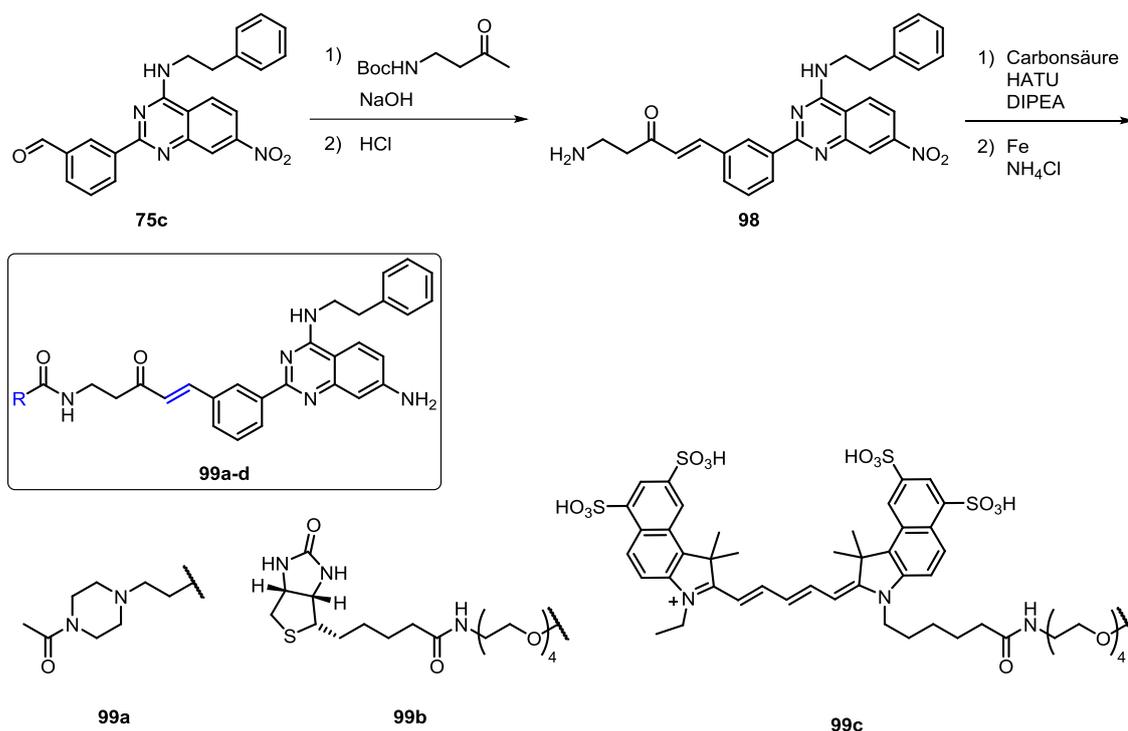
Abb. 43: Design kovalenter LiPoLis zur Adressierung von nukleophilen Aminosäuren in der Peripherie der LP. A) Natürlich vorkommende, nukleophile Aminosäuren in der Peripherie der LP von p38 α im Komplex mit **3a**; B) Modellierung von **94** (cyan) mit zu Ser251 und Ser252 ausgerichtetem Elektrophil; (basierend auf PDB: 4DLJ).

Schema 25: Vorschlag für Syntheserouten zur Darstellung des Sulfonsäurefluorids **97** als kovalente LiPoLis zur Adressierung von nukleophilen Aminosäuren in p38 α .



Für zukünftige Experimente könnte eine Bisfunktionalisierung der kovalenten LiPoLis mit einer weiteren reaktiven bzw. funktionellen Einheit interessant sein. Beispielsweise könnte eine Erweiterung der Moleküle mit Löslichkeits-vermittelnden Gruppen, Fluorophoren als bildgebende Reporter oder Biotin als Affinitäts-*tag* stattfinden. Eine entsprechende Synthese könnte ohne größere Änderung der bereits etablierten Route unter Verwendung eines Boc-geschützten Amin-Bausteins in der Claisen-Schmidt-Kondensation zum Aufbau des Michael-Akzeptor-Systems erfolgen (Schema 36). Das auf diese Weise ins Grundgerüst eingebrachte Amin kann als Substrat für Kupplungsreaktionen mit jeweiligen Carbonsäuren zur Herstellung von bspw. **99a-d** genutzt werden.

Schema 36: Vorschlag für eine allgemeine Syntheseroute zur Darstellung von bisfunktionalisierten, kovalenten LiPoLis.



Mit kovalenten LiPoLis alleine wären bspw. phänotypische Experimente in Zellen möglich. Hierfür wären bestimmte Eigenschaften der Liganden, wie z.B. eine ausreichende Permeabilität und Löslichkeit im wässrigen Milieu, notwendig. Mittels einer doppelten Funktionalisierung der Liganden könnte dies erreicht werden, indem zusätzlich zum Elektrophil solvatisierende Gruppen in das Molekül eingeführt werden. Eine Markierung mit Fluorophoren (bspw. Cy5, vgl. **99c**) ließe eine mikroskopische Verfolgung von p38 α bei Besetzung der LP in Zellen zu und könnte hinsichtlich Fragestellungen nach der subzellulären Lokalisation oder An- bzw. Abreicherung des Proteins in Gegenwart der LiPoLis, etc. von Nutzen sein. Alternativ dazu könnten diesbezüglich auch Fusionsvarianten der Kinase (bspw. mit Grün-fluoreszierendem Protein) im Zusammenhang mit einfachen kovalenten LiPoLis verwendet werden. Für *pull-down*-Versuche geeignete Biotin-modifizierte Liganden ließen eine Isolierung von p38 α aus Zelllysate zu, wenn die adressierte Tasche besetzt ist. Gegebenenfalls lassen sich auf diese Weise Interaktionspartner der Kinase identifizieren, die in der Nähe dieser Region binden bzw. nicht mehr dort binden können. Die genannten Experimente schließen mit ein, dass die generierten Mutanten (bspw. p38 α S252C im Fall von **78b** und Derivaten **99a-d**) in Zellen eingeführt werden können. Dies könnte einerseits über Transfektion entsprechender Plasmide geschehen, wobei zwei Populationen des Enzyms

(WT und Mutante) vorliegen würden. Alternativ könnten auf genetischer Ebene mittels *knock-out* von p38 α WT und *knock-in* der gewählten Variante vergleichende Studien von den WT exprimierenden und für die Mutante codierenden Zelllinien in An- und Abwesenheit von (bisfunktionalisierten) kovalenten LiPoLis ermöglicht werden.

Als möglicher Ausgang von Experimenten *in vivo* oder mit Zelllysaten könnten Hinweise auf das Vorhandensein von PPI-Partnern hervorgehen, wobei andererseits das Blockieren der LP durch LiPoLis eine Bindung von potentiell wechselwirkenden Molekülen verhindern könnte. Wenn diese (Protein-Protein-)Interaktion darüber hinaus transient ist, würde eine Identifikation über *pull-down*-Assays, wie bspw. Ko-Immünpräzipitation, in Gegenwart von einem *cross*-Linker zum Fixieren von PPIs möglich sein. Die Reaktion mit entsprechenden Reagenzien würde dabei unspezifisch an der gesamten Oberfläche der Kinase erfolgen, sodass eine Validierung der gefundenen Binder erfolgen müsste. Hierzu müsste eine Analyse der mutmaßlichen Wechselwirkung mit p38 α in An- und Abwesenheit kovalenter LiPoLis stattfinden, um einen eventuellen Zusammenhang mit der LP zu untersuchen. Alternativ dazu könnte eine irreversible Bindung von Interaktionspartnern mit Hilfe artifiziell eingeführter Aminosäure-Analoga, bspw. in Umgebung der lipophilen Tasche, geschehen, wobei aufgrund der räumlichen Nähe zur LP mutmaßlich eine direkte Beziehung der identifizierten Moleküle zu dieser Region impliziert werden könnte.

Zudem muss eine für *pull-down*-Experimente geeignete Markierung (bspw. Biotin) nicht zwangsläufig über die kovalenten LiPoLis eingeführt werden, sondern könnte stattdessen direkt am Zielprotein p38 α erfolgen, das z.B. nach Inkubation in Gegenwart des Liganden aus Zelllysaten isoliert werden kann.

Es würde einen bedeutungsvollen Ausgang des verfolgten Ansatzes und gleichzeitig eine durchschlagende Bestätigung der Arbeitshypothese bedeuten, wenn im Rahmen entsprechender Studien tatsächlich eine Funktion der LiPoLis in Bezug auf bspw. PPIs nachgewiesen werden könnte. Zahlreiche Experimente würden anschließen, bspw. die Bestimmung Konzentrations-abhängiger Effekte der LiPoLis zur tiefergehenden Charakterisierung der gefundenen Interaktion sowie Ko-Kristallisation mit dem molekularen Binder zur Förderung des strukturellen Verständnisses der zugrunde liegenden Interaktion, um anhand dieses Beispiels einen Beitrag zur Aufklärung nicht-katalytischer Funktionen von Kinasen zu leisten.

5 Strukturbiologische Untersuchungen von Kinaseinhibitoren

Mit Hilfe von erfolgreichen Ko-Kristallisationen konnte am Beispiel der synthetisierten Liganden der LP in p38 α die Bedeutung von strukturbiologischen Charakterisierungen molekularer Komplexe als System zur Verifizierung von Arbeitshypothesen und Ausgangspunkt für die weiterführende Planung von LiPoLis demonstriert werden. Die Generierung von (bzw. die Zugänglichkeit zu) Strukturen, die bspw. die Bindung von niedermolekularen Substanzen an jeweilige Zielproteine beschreiben, stellen neben eingehender biochemischer und zellulärer Evaluierung eine leistungsfähige Möglichkeit dar, weitere Informationen zum Verständnis der zugrundeliegenden Wechselwirkungen zu erlangen.

Von besonderem Interesse sind kristallographische Studien bei der Entwicklung potenter, klinisch relevanter Wirkstoffe, indem sie prinzipiell die Voraussetzung für eine Einsicht in den genauen Bindungsmodus und die Analyse molekularer Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor mit atomarer Auflösung liefern. Hierbei ermöglicht bspw. die Identifikation struktureller Eigenschaften oder Merkmale eines Proteins und/oder eines Inhibitors die Optimierung oder Entwicklung entsprechender Moleküle sowie rationale Ansätze zur Adressierung anderer Zielstrukturen. Darüber hinaus bieten sie potentiell Anhaltspunkte zur Umgehung von Resistenzen bzw. Steigerung der Selektivität von biologisch aktiven Substanzen, die als fortwährende Herausforderungen in der medizinischen Chemie und pharmazeutischen Forschung gelten.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden Ko-Kristallisationen mit ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren der MAPK p38 α durchgeführt. Die entsprechenden gelösten Strukturen lieferten maßgebliche Ergebnisse, die den Wirkmechanismus der eingesetzten Hemmstoffe erklärten (vgl. Kapitel 5.1), Arbeitshypothesen verifizierten (vgl. Kapitel 5.2, 5.3) sowie die Korrelation von Aktivität und Selektivität bei Derivatisierung der verwendeten Liganden gewährleisteten (vgl. Kapitel 5.4, 5.5).

5.1 Skepinone-L-Derivate zur Adressierung des *R-Spine* in p38 α

5.1.1 Theoretischer Hintergrund

Die therapeutische Relevanz von p38 α liegt in der Beteiligung an der Entstehung von neuronalen Erkrankungen^[224], verschiedenen Formen von Krebs^[225] und Entzündungskrankheiten^[226] (vgl. Kapitel 1.2.1), wobei aufgrund von Defiziten und Nebenwirkungen in klinischen Studien bislang kein Inhibitor zur Markteinführung zugelassen wurde.^[227-228]

Laufer und Mitarbeiter entwickelten vor kurzem Skepinone-L als außerordentlich potenten und selektiven Typ I-Inhibitor für p38 α .^[74] Die diesbezüglich gelöste Kristallstruktur offenbarte wesentliche Besonderheiten des gebundenen Inhibitors. Neben der gleichzeitigen Adressierung von HRI und II durch den Liganden, wies diese im Speziellen einen sogenannten Glycin-*flip* auf. Dieser beschreibt die bei der Bindung des Dibenzosuberone-Grundgerüsts induzierte Rotation der in der Scharnierregion befindlichen Aminosäure Gly110 um 180° und stellt mutmaßlich die Grundlage für das hervorragende Aktivitäts-Profil dieser Substanz dar.^[229]

Ausgehend von dieser Entdeckung wurde eine Strategie zur Entwicklung einer neuen Generation an Derivaten verfolgt, wobei die vorteilhaften Eigenschaften des Skepinone-L-Kerns mit typischen strukturellen Elementen von Typ II-Inhibitoren kombiniert wurden.^[230-231] Es zeigte sich, dass diese Liganden überraschenderweise nicht vollständig dem postulierten Bindemodus folgten, d.h. trotz der implementierten Merkmale keine Adressierung der allosterischen Tasche im aktiven Zentrum und somit keine Stabilisierung der DFG-*out*-Konformation erzielt wurde. Stattdessen führten die Bemühungen zur Identifikation von sogenannten Typ I½-Inhibitoren (bspw. **100a**; Tab. 14), die sich durch die Beibehaltung der beschriebenen Interaktionen des Skepinone-L-Templats sowie die gleichzeitige Einnahme des DFG-*in*-Zustands der Kinasedomäne auszeichneten.^[232] Gleichzeitig wurde kein signifikanter Verlust der Aktivität festgestellt.

Die Autoren diskutieren, dass viele Inhibitoren aufgrund unzureichender Selektivität und mangelhafter kinetischer Profile in klinischen Studien scheitern, und dass eine Optimierung dieser Parameter mit einer verlängerten Verweildauer am Enzym realisiert werden könnte. Ein solcher Ansatz würde Vorteile bzgl. einer erhöhten Effizienz der

Liganden *in vitro* und *in vivo* sowie einer anhaltenden pharmakodynamischen Wirkung aufgrund einer bestenfalls (pseudo)irreversiblen Bindung mit sich bringen und auf diese Weise zu verringerten Nebenwirkungen in Tierversuchen/Patienten führen.^[233-234] Die Umsetzung dieser Hypothese sollte mit Hilfe von Inhibitoren erfolgen, die eine konformative Stabilisierung von Substrukturen in der Kinasedomäne induzieren. Diesbezüglich könnte sich das als *R-Spine* bezeichnete hydrophobe Rückgrat eignen, das ein maßgebliches Merkmal der aktiven Kinase-Konformation darstellt.^[20,235] Im Fall von p38 α ist es aus vier konservierten, lipophilen Aminosäuren aufgebaut, bei denen es sich um Leu75 in der α -Helix C, Leu86 im β 3-Strang, His148 im HRD-Motiv und Phe169 des DFG-Motivs handelt (Abb. 44).^[236]

Im Rahmen eines Struktur-basierten Ansatzes sollte eine Substanzbibliothek von Skepinone-L-Derivaten zur Adressierung des *R-Spine* unter Beibehaltung der Interaktionen des Templats innerhalb ATP-Bindungsstelle synthetisiert werden. Die Evaluierung des Ansatzes sollte neben eingehender, biochemischer Charakterisierung vor allem mittels Ko-Kristallisationsexperimenten erfolgen.

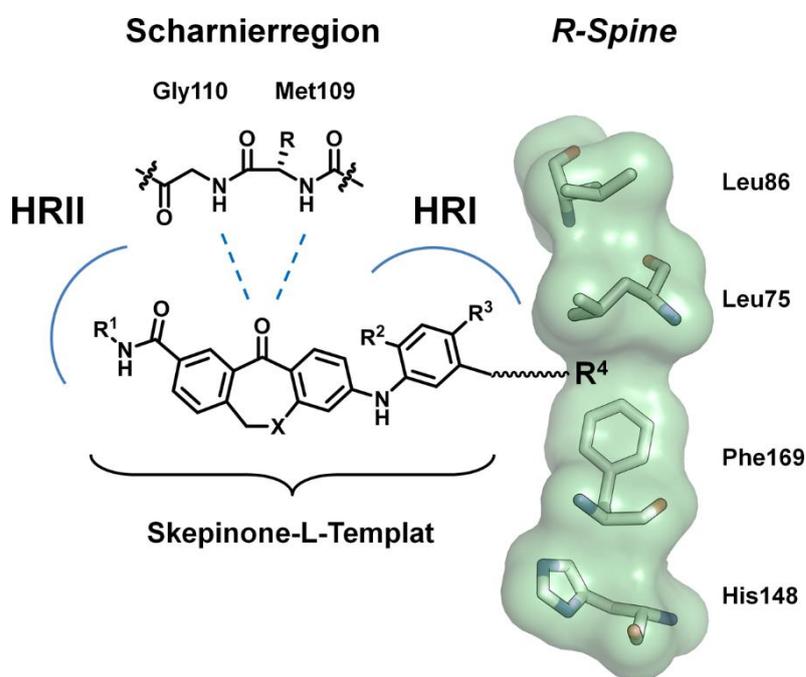


Abb. 44: Schematische Darstellung der Stabilisierung des assemblierten *R-Spine* mit Hilfe von Skepinone-L-Derivaten.

5.1.2 Stabilisierung des *R-Spine* und Verweildauer am Enzym

Auf Basis der zuvor beschriebenen p38 α -Komplex-Strukturen von Skepinone-L und **100a** wurden Liganden entworfen, die am Dibenzosuberon- ($X = \text{CH}_2$) bzw. dem verwandten Dibenzooxepinon-Grundgerüst ($X = \text{O}$) an ausgewählten Positionen mit verschiedenen Substituenten (R^1 - R^4) derivatisiert wurden. Reste R^1 sollten hierbei die Lösungsmittel-exponierte HRII adressieren, während R^2 und R^3 die in Nähe des Türstehers lokalisierte HRI besetzen sollten. Insbesondere ist die Einführung eines hydrophoben Motivs R^4 hervorzuheben, das sich potentiell in Richtung des *R-Spine* erstreckt und mit diesem Strukturelement interagieren kann (Abb. 44).

Im Folgenden wurde eine Auswahl an folglich generierten Inhibitoren herangezogen, um die wesentlichen, ableitbaren SARs aufzuzeigen und schließlich den Erfolg der verfolgten Strategie zu beurteilen (Tab. 14).

Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Assay-Systemen wurden IC_{50} -Werte der synthetisierten Liganden bestimmt (Tab. 15).¹⁶ Zum einen wurde die Aktivität über direkte Hemmung der Zielkinase p38 α , und zum anderen anhand der Freisetzung des Zytokins TNF α in Vollblut-Zellen festgestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Variation von R^1 in Form von Diolen, Alkoholen oder Morpholin (vgl. Skepinone-L vs. **100g** vs. **100h**) keine signifikanten Unterschiede in der jeweiligen Inhibition hervorrief. Die gewählten polaren, solvatisierenden Gruppen scheinen somit alle zur Bindung in die Lösungsmittel-exponierte HRII geeignet zu sein. Unterschiedliche Kombinationen von H, Methyl und/oder F als Substitutionsmuster an Position von R^2 und R^3 (vgl. **100f** vs. **100a** vs. **100h**) führten ebenfalls kaum zu Unterschieden in den detektierten IC_{50} -Werten (ca. 1 pM) und resultierten daher stets in sehr potente Inhibitoren und einer scheinbar effizienten Adressierung der HRI. Interessanterweise zeigte **100a** eine im Vergleich zu den anderen Liganden mehr als 100-fach geringere TNF α -Freisetzung (0.3 nM vs. 34.7 - 463.8 nM). In ähnlicher Weise hatte die Derivatisierung mit einem hydrophoben Motiv R^4 , das in Richtung *R-Spine* reichen sollte, sowohl im isolierten Enzym-Assay als auch im Vollblut-Testsystem keine signifikante Veränderung der hohen, katalytischen Aktivität zur Folge. Dabei wurde die Größe des Substituenten von H, über Cyclopropyl bis zu Thiophenyl und Phenyl variiert (vgl. **100d-j**).

¹⁶ Synthese und biochemische Charakterisierung der Inhibitoren erfolgte im Arbeitskreis Laufer. SPR-Messungen wurden am Translational Research Center, Oss (NL) durchgeführt.

Tab. 14: Strukturelle Identität der chemischen Strukturen einer Auswahl von Skepinone-L-Derivaten zur Adressierung des *R-Spine*.

#	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
Skepinone-L		F	F	H	CH ₂
100a		CH ₃	F		CH ₂
100d		F	F	H	CH ₂
100e		F	F		CH ₂
100f		H	F		CH ₂
100g		F	F		CH ₂
100h		F	F		CH ₂
100i		F	F		O
100j		H	F		O

Hinsichtlich der beiden Grundgerüste wurde hingegen im Vollblut-Testsystem eine bis zu 10-fach geringere Aktivität der Dibenzooxepinone **100i,j** gegenüber den übrigen Dibenzosuberonen beobachtet. Die Abwesenheit eines zusätzlichen Sauerstoffatoms scheint demnach für die Wirkung in Zell-basierten Assays von Bedeutung zu sein.

Tab. 15: Bestimmte IC₅₀-Werte und kinetische Parameter zur Charakterisierung der Skepinone-L-Derivate; p38 α : Messung der enzymatischen Aktivität von p38 α im Ab-basierten Assay; TNF α : Messung der Freisetzung von TNF α im Vollblut-Assay; τ : Verweildauer am Zielprotein.

#	Typ	IC ₅₀ (nM)		kinetische Parameter			
		p38 α	TNF α	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)	τ (s)
Skepinone-L	I	5.0 \pm 2.0	45.0 \pm 1.6	3.2 \cdot 10 ⁵	6.7 \cdot 10 ⁻³	20.9	4.6
SB203580	I	n.d.	n.d.	1.0 \cdot 10 ⁷	2.2 \cdot 10 ⁻¹	21.7	150
BIRB 796	II	n.d.	n.d.	1.2 \cdot 10 ⁴	1.0 \cdot 10 ⁻⁵	0.1	> 10 ⁵
100a	I	1.0 \pm 0.0	0.30 \pm 0.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100d	I / ₂	n.d.	n.d.	6.9 \cdot 10 ⁵	2.8 \cdot 10 ⁻²	4.0	36
100e	I / ₂	2.4 \pm 0.2	47.2 \pm 0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100f	I / ₂	1.0 \pm 0.1	38.0 \pm 1.1	1.2 \cdot 10 ⁶	3.9 \cdot 10 ⁻³	3.1	259
100g	I / ₂	0.6 \pm 0.0	34.7 \pm 0.5	5.8 \cdot 10 ⁵	7.5 \cdot 10 ⁻⁴	1.3	1329
100h	I / ₂	1.0 \pm 0.1	43.0 \pm 0.8	6.2 \cdot 10 ⁴	2.7 \cdot 10 ⁻⁴	4.4	3663
100i	I / ₂	1.3 \pm 0.1	151.5 \pm 3.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100j	I / ₂	1.0 \pm 0.0	463.8 \pm 0.2	1.7 \cdot 10 ⁶	3.1 \cdot 10 ⁻²	17.7	32

n.d.: nicht bestimmt (*not determined*)

Die Rolle der Wahl des Grundgerüsts zeigte sich darüber hinaus in der Verweildauer der Liganden am Zielenzym, ausgedrückt durch den Parameter τ ($= 1/k_{\text{off}}$) (vgl. **100f** vs. **100j**; 259 s vs. 32 s). Insbesondere demonstrieren die kinetischen Messungen jedoch eindrucksvoll den Effekt der Größe des hydrophoben Substituenten an Position R⁴, wobei τ von H (Skepinone-L) bis zu Thiophen-Carboxamiden (**100g,h**) von 5 bis 3663 s zunimmt. Aus der Charakterisierung geht somit hervor, dass mit der Verlängerung der Moleküle in die Region des *R-Spine* tatsächlich eine erhöhte Verweildauer für einige der synthetisierten Inhibitoren an p38 α erzielt werden konnte. Wie diese Beobachtung auf molekularer Grundlage erklärt werden kann, sollte im Rahmen von Ko-Kristallisationsexperimenten geklärt werden.

Unter Verwendung der zuvor angeführten Bedingungen mit der Reservoir-Lösung zugefügtem BOG wurden in Anwesenheit bestimmter Liganden (**100h,g,j**) reproduzierbare p38 α -Kristalle erhalten. Dementsprechend konnten insgesamt drei Komplexe erfolgreich gelöst werden (Abb. 45A-C). In allen Fällen ließ sich die Beibehaltung der charakteristischen Interaktionen des Skepinone-L-Kerns in der Adeninbindenden Region innerhalb des aktiven Zentrums beobachten.

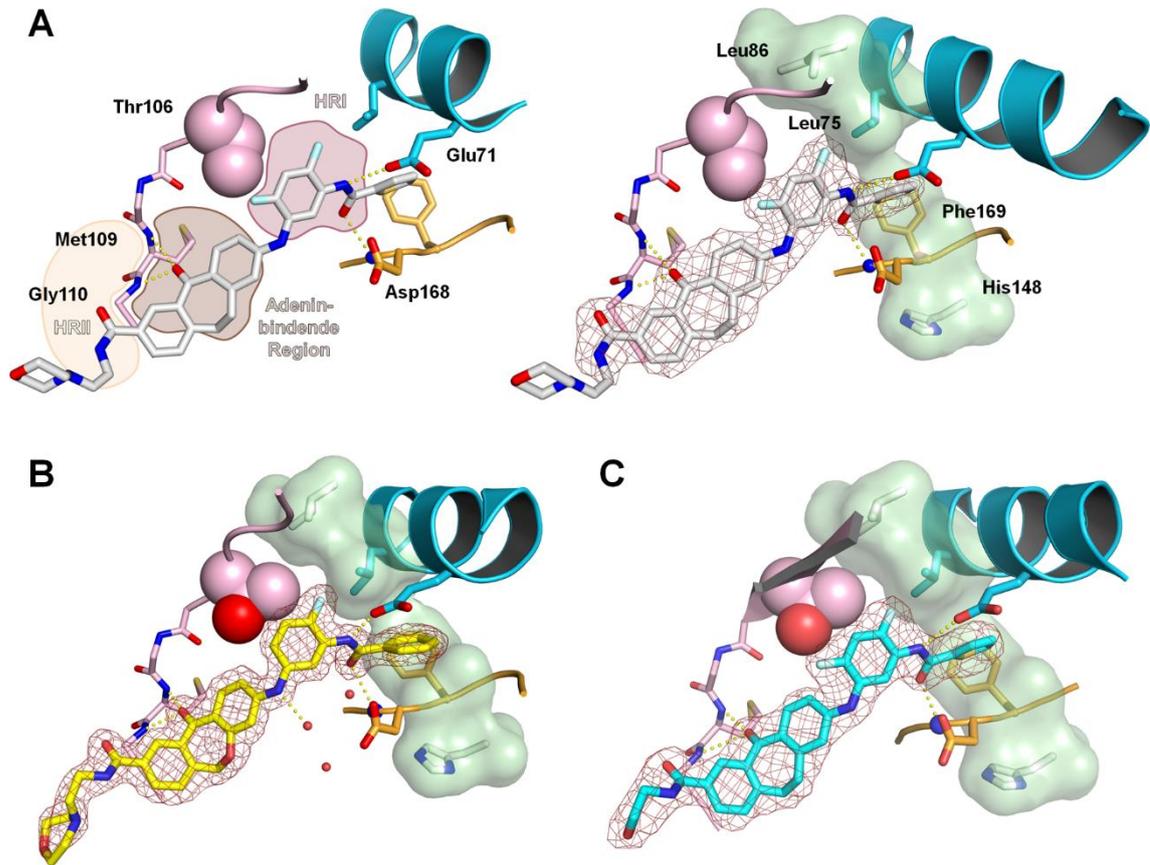


Abb. 45: Ko-Kristallstrukturen von Skepinone-L-Derivaten zur Adressierung des *R-Spine* (Leu75, Leu86, His148, Phe169) im Komplex mit p38 α . Darstellungen von p38 α im Komplex mit A) **100h** (weiß), B) **100g** (gelb) und C) **100j** (cyan); 2mF_o-DF_c-Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte); (PDB: 5MTX, 5MTY, 5TBE).

Dabei handelt es sich um die Ausbildung von zwei direkten WBBs zwischen der Ketogruppe des Grundgerüsts und den Rückgrat-NHs von Met109 und Gly110, welche zum Glycin-*flip* als spezifische Anpassung der Kinase bei Bindung dieser Klasse von Substanzen führt. Darüber hinaus wurden keine Unterschiede bzgl. des Bindungsmodus von Dibenzosuberone und Dibenzooxepinone (**100g** vs. **100j**) festgestellt, die eine Divergenz bzgl. der zellulären Aktivität potentiell begründen könnten.

Bezüglich der Reste R¹ zur Adressierung der HR II zeigte sich jeweils eine gewisse Flexibilität der Substituenten anhand nicht eindeutig definierter Elektronendichte in den entsprechenden Lösungsmittel-exponierten Bereichen. Die Anilineinheit der Inhibitoren besetzt mit unterschiedlichen Fluorierungsmustern R²/R³ die HRI, wobei allerdings keine Interaktionen, wie bspw. Halogen-Bindungen, mit dem Protein festgestellt wurden. Der Amidlinker zur Verknüpfung von R⁴ bildet direkte WBBs zum Rückgrat-NH von Asp168 des DFG-Motivs sowie der Seitenkette von Glu71 in der α -Helix C aus.

Die allerdings mutmaßlich bedeutendste Erkenntnis auf Basis der Kristallstrukturen stellt die Identifikation einer *edge-to-face* π - π -Stapelwechselwirkung zwischen der terminalen, aromatischen Einheit des Substituenten R⁴ und der Seitenkette von Phe169 dar. Durch diese konstruktive Interaktion und der passenden Orientierung wird die Konformation von Phe169 fixiert und auf diese Weise vermutlich eine Assemblierung und Stabilisierung des *R-Spine* erreicht.

Die bestimmten kinetischen Daten der Liganden wurden folglich mit den gelösten Kristallstrukturen, insb. hinsichtlich Verweildauer τ , verglichen. Aus der SAR war eine ca. 100-fache Verlängerung von τ für **100h** gegenüber **100j** ersichtlich (3663 s vs. 32 s). Diese Inhibitoren unterscheiden sich hauptsächlich im jeweiligen Grundgerüst und der Art des arylischen Substituenten R⁴ (Phenyl vs. Thiophen). Die strukturbiologischen Untersuchungen lieferten keine Anhaltspunkte darauf, dass der Unterschied in den Verweildauern durch den zusätzlichen Sauerstoff im Dibenzooxepinon-Kern verursacht werden könnte. Stattdessen ist vermutlich die Wahl des Amid-verknüpften Aromaten, der mit Phe169 im *R-Spine* interagiert, hauptsächlich ausschlaggebend für die optimierten kinetischen Eigenschaften der Derivate.

Die Verteilung der positiven und negativen elektrostatischen Oberflächenpotentiale der beiden Ringsysteme ist unterschiedlich und könnte eine Erklärung für die attraktive *edge-to-face* Stapelwechselwirkung der beiden Aromaten darstellen.^[237] Weiterhin könnte es sein, dass in Gegenwart des größeren Phenylrestes in **100j** im Gegensatz zu dem Thiophen **100h** aufgrund sterischer Effekte teilweise Repulsion zu Phe169 verursacht wird, was sich in einer kürzeren Verweildauer an der Kinase niederschlägt.

Mit Hilfe der erfolgreich gelösten Kristallstrukturen konnte demnach die Arbeitshypothese bestätigt werden, nach welcher die Stabilisierung des *R-Spine* als konserviertes, katalytisch relevantes Strukturelement und wichtiges Merkmal der aktiven Kinasekonformation zu bevorzugten kinetischen Eigenschaften der Liganden führt. Tatsächlich führte die Erweiterung des Grundgerüsts mit entsprechenden Substituenten zu einer direkten Interaktion mit diesem hydrophoben Proteinrückgrat sowie der Einnahme eines für Typ II₂-Inhibitoren typischen Bindungsmodus. Diese Beobachtungen korrelieren weiterhin mit einer signifikant verlängerten Verweildauer am Enzym, d.h. einer über 700-fachen Steigerung (3663 s vs. 4.6 s) gegenüber der Parentalsubstanz Skepinone-L.

5.1.3 Harnstoffderivate und Unterbrechung des *R-Spine*

Neben den Amid-verknüpften Resten R^4 wurde im Arbeitskreis Laufer eine weitere Reihe an Derivaten synthetisiert, wobei es sich um Harnstoffderivate des Dibenzosuberon-Templats handelt (Tab. 16). Unter Verwendung dieses Linkers werden ein größerer Abstand zum Grundgerüst der Inhibitoren und eine mutmaßlich kürzere räumliche Entfernung des endständigen Substituenten zum *R-Spine* realisiert. Bisher hat noch keine eingehende biochemische Charakterisierung dieser Substanzen stattgefunden, jedoch wurden bereits drei Derivate dieser Serie in p38 α ko-kristallisiert und offenbaren interessante strukturbiologische Beobachtungen.

In allen Fällen wiesen die Liganden einen zu Skepinone-L ähnlichen Bindungsmodus auf, wobei weiterhin eine Adressierung von HRI und II sowie die Induktion des Glycin-*flips* von Gly110 in der Scharnierregion festgestellt wurde (Abb. 46A-C). Zusätzlich zu der WBB zwischen Harnstoff-Carbonyl und dem Rückgrat-NH von Asp168, wie sie in ähnlicher Weise mit den Amid-Gruppen der vorherigen Serie festgestellt wurde, werden zwei weitere polare Kontakte über die NH-Gruppen des R^4 -Linkers mit der Seitenkette von Glu71 ausgebildet. Die Harnstoff-verknüpften Cyclopropyl-Reste reichten wie die Benzamide oder Thiophen-Carboxamide der zuvor beschriebenen Inhibitoren ebenfalls in Richtung des *R-Spine* und können dieses stabilisieren

Tab. 16: Strukturelle Identität der chemischen Strukturen einer Auswahl von Skepinone-L-Harnstoffderivaten zur Adressierung des *R-Spine*.

#	R^1	R^2	R^3	R^4
Skepinone-L		F	F	H
101a		CH ₃	F	
101b		H	F	
101c		H	F	

Da es sich hier jedoch nicht um aromatische Systeme handelt, kann diese Interaktion nicht mit dem Aufbau einer π - π -Stapelwechselwirkung erklärt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass möglicherweise alleine aufgrund räumlicher Nähe und passender Orientierung eine Fixierung von Phe169 bzw. eine Verschiebung des konformativen Gleichgewichts der Kinase erfolgen kann. Diese Vermutung wird ferner durch die Überlagerung der Strukturen von **100h** und **101b** gestützt, aus der hervorgeht, dass die beiden Substituenten R⁴ fast deckungsgleich in den Bereich des hydrophoben Proteingratts binden (Abb. 46D).

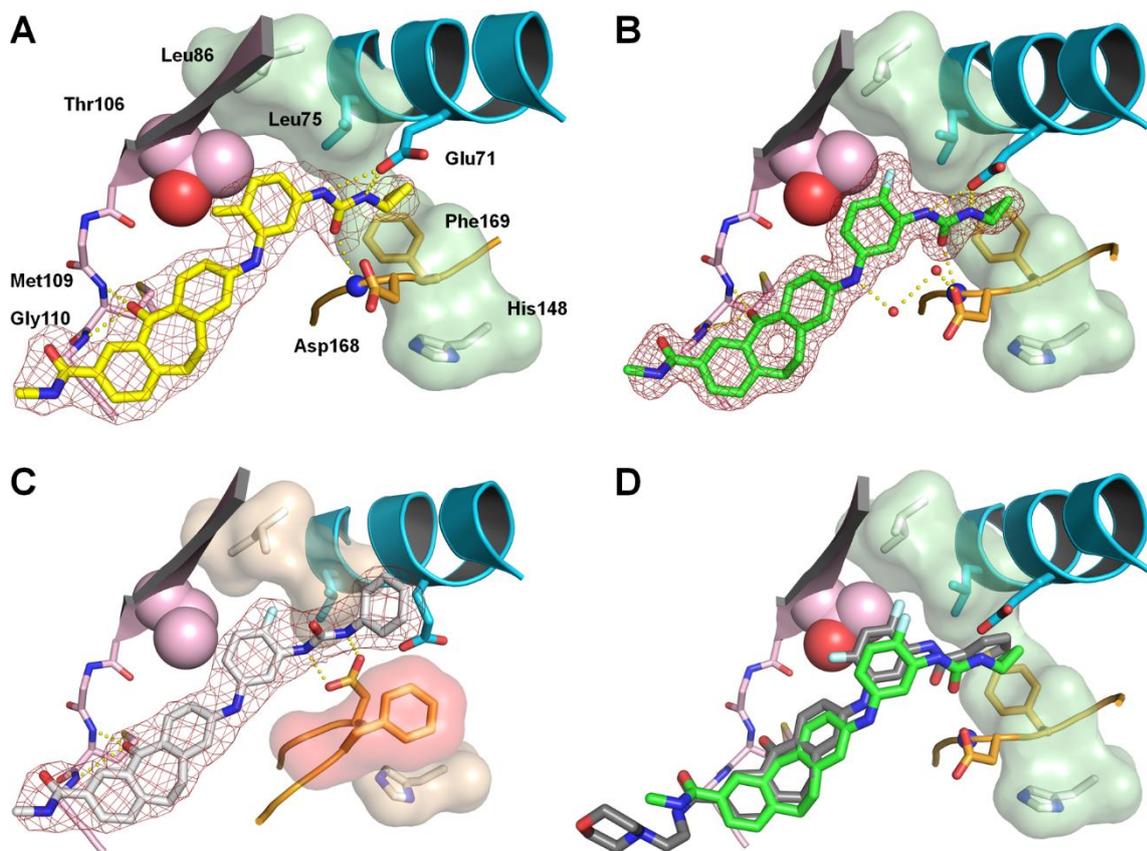


Abb. 46: Ko-Kristallstrukturen von Skepinone-L-Harnstoffderivaten zur Adressierung des *R-Spine* im Komplex mit p38 α . Darstellungen von p38 α im Komplex mit A) **101a** (gelb), B) **101b** (grün) und C) **101c** (weiß) zeigen die Abhängigkeit der Interaktion mit dem *R-Spine* von der Beschaffenheit des hydrophoben Restes R⁴; D) Überlagerung von **100h** (grau) und **101b** (grün) im Komplex mit p38 α ; 2mF_o-DF_c-Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte); (PDB: unveröffentlicht).

Darüber hinaus konnte am Beispiel von **101c** gezeigt werden, dass ab einer kritischen Länge des Linkers bzw. Größe des hydrophoben Motivs R^4 die Assemblierung des *R-Spine* gestört und Phe169 aus der DFG-*in*-Konformation verdrängt wird, sodass die Kinase stattdessen den DFG-*out*-Zustand einnimmt. Die Harnstoffeinheit rotiert dabei um ca. 180° , woraufhin die NH-Gruppen direkte WBBs zu Asp168 im DFG-Motiv ausbilden können und die inaktive Konformation weiter stabilisieren. Damit erfüllen diese Liganden mit der Besetzung der allosterischen Tasche im aktiven Zentrum Merkmale des für Typ II-Inhibitoren typischen Bindungsmodus, allerdings in Kombination mit den für Skepinone-L typischen Interaktionen.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Studien insgesamt sechs neuartige Kristallstrukturen von Skepinone-L-Derivaten im Komplex mit p38 α gelöst. Die entsprechenden Daten bestätigten die hinsichtlich des initialen Designs postulierten Interaktionen der Inhibitoren im aktiven Zentrum und offenbarten zusätzlich Merkmale eines Typ I $\frac{1}{2}$ -Bindungsmodus. Darüber hinaus konnte die Stabilisierung des assemblierten *R-Spine* als potentielle Erklärung für die signifikant erhöhte Verweildauer der mit Aromaten R^4 substituierten Liganden **100g,h,j** abgeleitet werden. Dieser Effekt wurde weiterhin für die Harnstoffderivate **101a,b**, die terminal kleinere Cyclopropyl-Gruppen trugen, beobachtet, während die Einführung eines sterisch anspruchsvolleren Phenylrings zur Unterbrechung des *R-Spine* und der Einnahme der DFG-*out*-Konformation führte. Ausblickend wäre es interessant, ob mit einer weiteren Verlängerung des hydrophoben Motivs R^4 (bspw. wie im entworfenen Molekül **102**) unter Umständen die Seitenkette von Phe169 ersetzt werden kann, sodass der Inhibitor selbst als Bestandteil des *R-Spine* fungiert, während die Kinase im inaktiven Zustand vorliegt (Abb. 47).

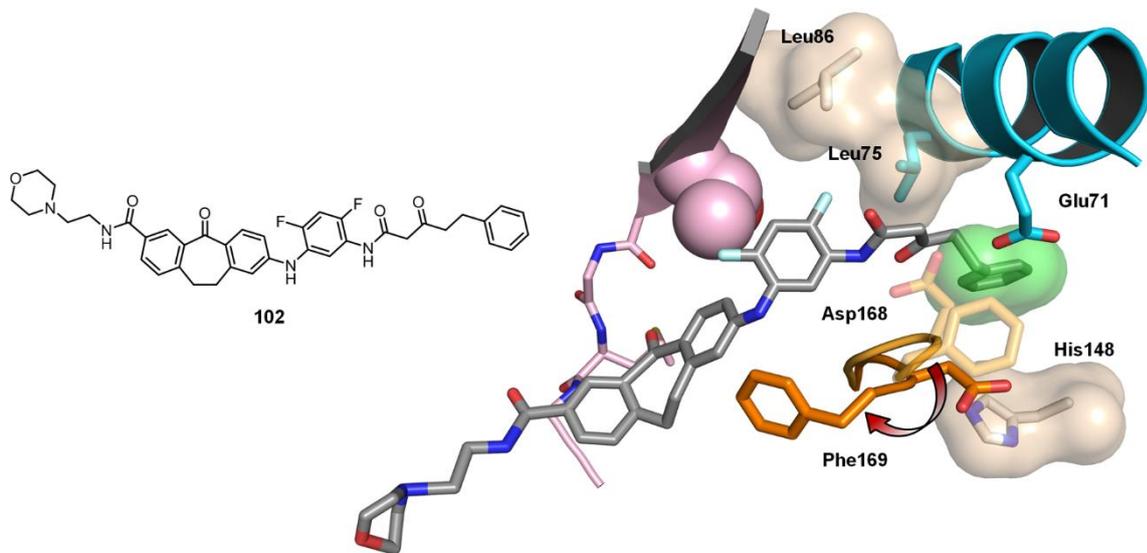


Abb. 47: Chemische Struktur von **102** und Modellierung des Moleküls in das aktive Zentrum von p38 α zur Verdrängung von Phe169 und Einlagerung in das *R-Spine*; (PDB: 1KV1 und teilweise unveröffentlicht).

Eine Validierung der verfolgten Strategie und eine angemessene Interpretation der kinetischen Messungen auf molekularer Ebene war hierbei nur mit Hilfe der Analyse entsprechend gelöster Ko-Kristallstrukturen möglich. Am Beispiel der Charakterisierung der Skepinone-L-Derivate konnte überzeugend gezeigt werden, wie die Einsicht in die strukturellen Merkmale und die Identifikation von Besonderheiten im Bindungsmodus von Kinaseinhibitoren zum Verständnis und der Validierung von biochemisch generierten Daten beitragen und final den Erfolg von Arbeitshypothesen bestätigen können.

5.2 Algorithmus-gestützte Vorhersage von Halogen-Bindungen

5.2.1 Theoretischer Hintergrund

Unter Halogen-Bindungen versteht man im Allgemeinen die attraktive Wechselwirkung zwischen einem Donor, typischerweise eine C-X-Bindung an Aromaten (mit „X“ als Halogenatom), und einem Akzeptor, bei dem es sich prinzipiell um jegliche Art von Elektronendonoren, bspw. nicht-protonierte Stickstoffe oder Carbonyl-Sauerstoffe des Proteinrückgrats, handeln kann. Die konzeptionelle Grundlage stellt dabei das sogenannte Sigma-Loch (σ -hole) dar.^[238] Am aromatischen System kommt es aufgrund des positiven Oberflächenpotentials zu einer anisotropen Elektronen-Verteilung, d.h. einer unterrepräsentierten elektronischen Ladung in der äußeren Schale des p_z -Orbitals, welches in Richtung der C-X-Bindung zeigt und somit die Orientierung der Interaktion vorgibt (Abb. 48).

Der Energiegehalt von Halogen-Bindungen beträgt durchschnittlich ca. -2 bis -15 kJ/mol, wobei die Bindungsstärke von X = Cl über Br nach I steigt.^[239-241] Als maßgebliche geometrische Parameter zur Bewertung von Halogen-Bindungen beträgt der Abstand zwischen Donor- und Akzeptoratom typischerweise ca. 3 Å und der Sigma-Loch-Winkel misst 130 - 183° (bspw. für C-X...O=C), wodurch die räumliche Ausrichtung der Interaktionspartner definiert ist.^[240]

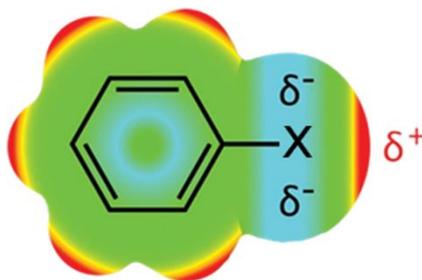


Abb. 48: Schematische Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials Halogen-substituierter Aromaten; X: Halogen.

Kürzlich wurde im Arbeitskreis Böckler ein Modell zur Prognose von Halogen-Bindungen zwischen an ein Protein gebundenen Liganden und Carbonyl-Sauerstoffatome des Proteinrückgrats mittels einer Funktion namens XBScore entwickelt.^[242] Diese spezielle Art der Wechselwirkung ist dabei eine der häufigsten beobachteten Halogen-Bindungen in Kristallstrukturen. Weiterführend sollte nun eine Dekorierungs-Methode für Grundgerüste in die XBScore-Funktion zur Vorhersage von Halogen-Bindungen implementiert werden, d.h. eine automatische Halogenierung von an ein Protein gebundenen Liganden *in silico* sowie die anschließende Bewertung einer potentiell begünstigenden Halogen-Bindung hinsichtlich der Steigerung der Affinität erfolgen. Der entsprechende Algorithmus identifiziert zunächst auf Basis von PDB-Strukturen nicht-substituierte aromatische Kohlenstoffatome in Liganden, die ungeachtet der praktischen Umsetzbarkeit „theoretisch“ halogeniert werden. Für jedes auf diese Weise eingeführte Halogenatom werden in räumlicher Nähe befindliche Carbonyl-Sauerstoffatome gesucht und auf Eignung als mutmaßliche Akzeptoren geprüft und mit Hilfe von XBScore (und ggf. einer Funktion zur Einschätzung eventuell auftretender sterischer Kollisionen) bewertet.

Zur Validierung dieser Methode sollte die Anwendung des Algorithmus auf p38 α -Kristallstrukturen der PDB und die Analyse der Ergebnisse der *scoring*-Funktion(en) erfolgen, auf deren Basis die Synthese der gefundenen halogenierten Analoge der ans Protein gebundenen Parentalsubstanz durchgeführt werden sollte. Die Steigerung der Affinitäten (und Aktivitäten) der Liganden sollte anschließend im Rahmen biochemischer Charakterisierung nachgewiesen werden und schließlich die Ko-Kristallisationsexperimente zur Bestätigung des postulierten Bindungsmodus und des Vorhandenseins einer Halogen-Bindung anhand der genannten geometrischen Parameter stattfinden.

5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Berechnungen mittels des entwickelten Algorithmus wurden am Beispiel von der Komplexstruktur des Benzophenons **103a** im Komplex mit p38 α (PDB: 3QUD) durchgeführt und der Carbonyl-Sauerstoff von His107 in der Scharnierregion der Kinase für die Adressierung mit in 2-Position am Grundgerüst der Inhibitoren eingeführten Halogenen identifiziert (Abb. 49A).

Die theoretisch bestimmten Werte für Abstände und Winkel der diesbezüglichen Halogen-Bindungen betragen 2.9 - 3.1 Å und 152 - 154° und lägen somit im Rahmen der charakteristischen geometrischen Parameter (Tab. 17). In diesem Fall wurden nachfolgend lediglich Ergebnisse für die Substitution mit Cl und Br berücksichtigt, da für das entsprechende Iod-Derivat die chemische Umsetzung nicht erfolgreich war (Abb. 49B). Die gefundenen Derivate **103c,d** der Parentalsubstanz **103a** wurden nachfolgend synthetisiert und zusätzlich das Methyl-substituierte Analog **103b** als Kontrollligand hergestellt. Im Rahmen der experimentellen Evaluierung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Polarisations-Assays^[243] wurden innerhalb der Serie tatsächlich eine zunehmende inhibitorische Aktivität und Affinität von Parentalsubstanz **103a** (R = H), über Substitution mit CH₃ (Kontrollligand **103b**) und Cl (**103c**) bis Br (**103d**) beobachtet.¹⁷ Eine weitere Validierung der Ergebnisse sollte mit Hilfe von Proteinkristallisation erfolgen und der postulierte Bindungsmodus nachgewiesen sowie insb. der Abstand zum adressierten Carbonyl-Sauerstoffatom bzw. die Länge der vermuteten Halogen-Bindung bestimmt werden.

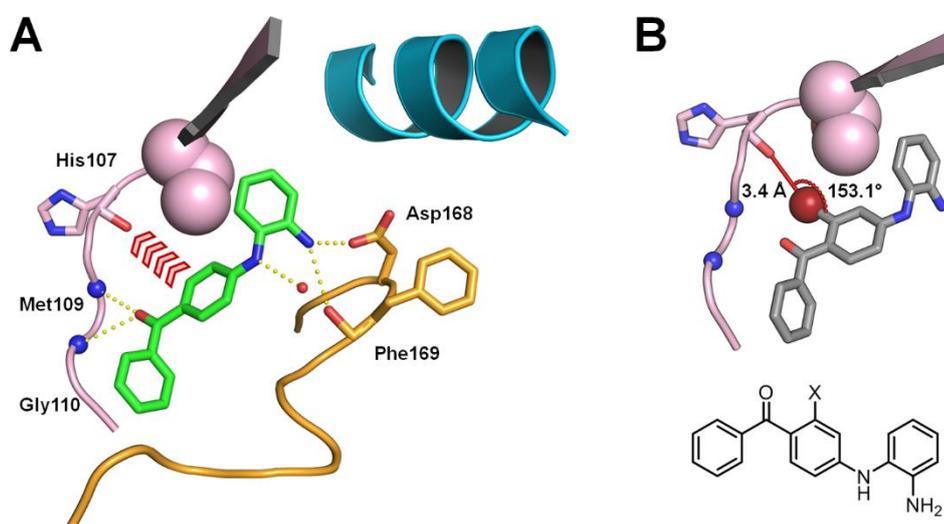


Abb. 49: Einführung von Halogenatomen in das Grundgerüst von **103a**. A) Benzophenon-basierter Inhibitor **103a** (grün) im Komplex mit p38 α ; WBBs (gelbe Punkte); B) Modell eines Halogen-substituierten Benzophenon-Derivats (grau) in das aktive Zentrum von p38 α ; Halogen-Bindung (rote Linie) (PDB: 3QUD).

¹⁷ Die Entwicklung des Algorithmus sowie die biochemische Evaluierung wurden im Arbeitskreis Böckler durchgeführt. Die Synthese der Inhibitoren erfolgte im Arbeitskreis Laufer.

Tab. 17: Chemische Identität der Benzophenon-Derivate **103a-d**, mittels XBScore bestimmte Parameter und biochemische Daten; IC₅₀: effektive Konzentration zur Bildung eines halbmaximal besetzten Komplexes; *: Umrechnung nach Nikolovska-Coleska *et al.*^[244].

#	R	XBScore	Bindungs-abstand (Å)	Bindungs-winkel (°)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)*
103a	H	-	-	-	1242 ± 9	244 ± 2
103b	CH ₃	-	-	-	590 ± 25	114 ± 5
103c	Cl	0.347	3.1	154	175 ± 19	31 ± 4
103d	Br	0.427	2.9	152	155 ± 14	27 ± 3

Die drei Inhibitoren wurden unter den zuvor beschriebenen Bedingungen in Anwesenheit von BOG erfolgreich im Komplex mit p38 α ko-kristallisiert und folglich ein allgemeiner Bindungsmodus der Benzophenone **103b-c** beobachtet (Abb. 50A-C). Die Ketogruppe des Grundgerüsts bildet dabei Kontakte zu den Rückgrat-NHs von Met109 und Gly110 in der Scharnierregion aus und die 4-(2-Aminophenyl)-Einheit der Liganden interagiert mit der Seitenkette von Asp168 und dem Rückgrat-Carbonyl von Phe169 des DFG-Motivs. Außerdem wurde eine direkte WBB zwischen dem verknüpfenden sekundären 4-Amin und dem Rückgrat-Carbonyl von Phe169 festgestellt. Interessanterweise war in sämtlichen Komplexen die Aktivierungsschleife über das DFG-Motiv hinweg um jeweils vier weitere Aminosäuren aufgelöst, was vermutlich auf eine Stabilisierung dieses Strukturelements aufgrund der beschriebenen Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann. Darüber hinaus wurde jedoch insbesondere eine Halogen-Bindung zwischen den eingebrachten Halogenatomen (Cl, bzw. Br) und dem Carbonyl-Sauerstoff des Rückgrats von His107 beobachtet, genau wie es nach mittels des Algorithmus postuliert wurde. Die bestimmten geometrischen Parameter erfüllen die vorhergesagten Kriterien für die Ausbildung einer solchen Interaktion und stimmen mit den berechneten Abständen und Winkeln gut überein (Tab. 18).

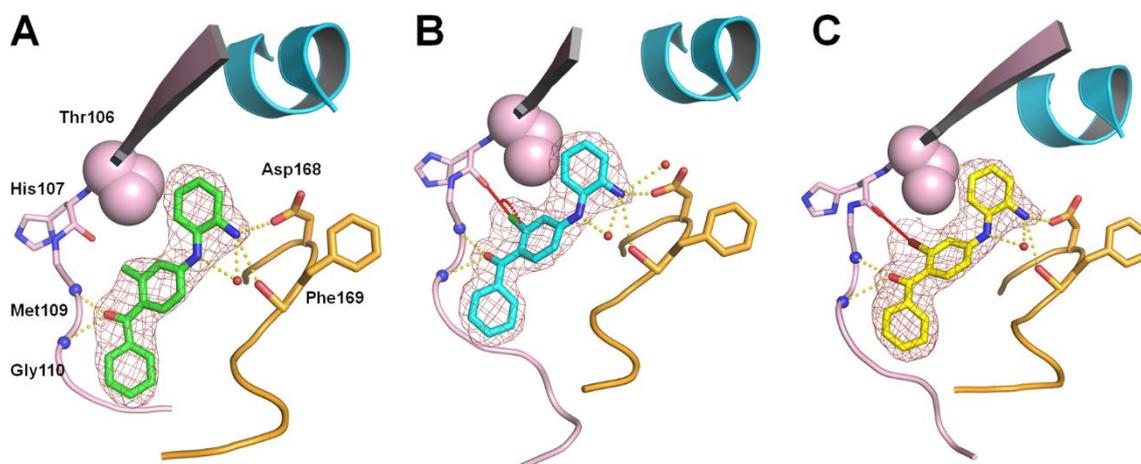


Abb. 50: Ko-Kristallstrukturen von Benzophenon-Derivaten zur Adressierung vom Rückgrat-Carbonyl von His107 im Komplex mit p38 α . Darstellungen von p38 α im Komplex mit A) **103b** (grün), B) **103c** (cyan) und C) **103d** (gelb) zeigen die Ausbildung einer Halogenbindung in Abhängigkeit vom eingeführten Rest R; 2mF₀-DF_c-Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Halogen-Bindungen (rote Linien), WBBs (gelbe Punkte); (PDB: 5MYZ, 5MZ0, 5MZ1; unveröffentlicht).

Tab. 18: Vergleich der theoretisch und auf Basis der Kristallstrukturen bestimmten Bindungsabstände und -winkel zwischen der 2-Methylgruppe in **103b** und His107 in p38 α sowie der Halogen-Bindungen zwischen **103c,d** und der Kinase.

#	R	theoretisch		experimentell	
		Bindungsabstand (Å)	Bindungswinkel (°)	Bindungsabstand (Å)	Bindungswinkel (°)
103b	CH ₃	-	-	3.4	170.6
103c	Cl	3.1	154	3.1	161.4
103d	Br	2.9	152	3.0	162.9

Bezüglich der Kontrollsubstanz **103b** ist aufgrund fehlender Halogene keine Ausbildung entsprechender Bindungen möglich. Allerdings nimmt sie im Vergleich zu **103c,d** einen ähnlichen Bindungsmodus ein, wodurch die Methylgruppe in 2-Position des Benzophenon-Kerns ebenfalls in räumliche Nähe zum Rückgrat-Carbonyl von His107 kommt. Demnach konnten hier ebenfalls die für Halogen-Bindungen typischen Distanzen und Winkel gemessen und weiterhin keine signifikanten Unterschiede in der Ausrichtung des Liganden innerhalb der Bindetasche festgestellt wurden. Dessen ungeachtet kann vor allem im Zusammenhang mit den biochemisch bestimmten Daten anhand der Gesamtheit der Ergebnisse die erfolgreiche Umsetzung des initialen Konzepts festgemacht werden.

Mit Hilfe des angewandten Algorithmus im Zusammenhang mit der XBScore-Funktion konnte die zur Ausbildung von Halogen-Bindungen erforderliche Dekorierung von an der MAPK p38 α gebundenen Inhibitoren vorhergesagt werden. Die angenommenen Wechselwirkungen sowie die Orientierung des Liganden innerhalb des aktiven Zentrums hinsichtlich der Interaktionen zum Rückgrat-Carbonyl von His107 in der Scharnierregion wurden ferner im Rahmen von Ko-Kristallisationsexperimenten bestätigt. Zusammenfassend wurde gezeigt, wie strukturbiologische Untersuchungen zur Verifizierung dieser nützlichen Methode zur Identifikation von Wechselwirkungen beitragen konnten, die zukünftig für die rationale Entwicklung neuer Wirkstoffe genutzt werden kann.

5.3 Effekte von Fluor-Substituenten am Beispiel von Sorafenib und Regorafenib

5.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die Bedeutung von selektiven Kinaseinhibitoren als therapeutischer Ansatz zur Behandlung diverser Krankheitsbilder wurde bereits einleitend diskutiert (Kapitel 1.1.2). Sorafenib wurde in den 1990ern von Bayer als Inhibitor potenter Ser/Thr-Kinase Raf1 entwickelt (*in vitro* IC₅₀ = 6 nM) und zeigte in Xenograph-Modellen effektiven Rückgang von Tumorwachstum.^[245-246] Darüber hinaus adressiert es aber auch verschiedene (Krebskorrelierte) Kinasen, darunter B-Raf WT und B-Raf V600E sowie diverse Rezeptor-Tyr-Kinasen.^[246] Sorafenib ist auch ein bekannter Hemmstoff der MAPK p38 α und stabilisiert als Typ II-Binder die DFG-*out*-Konformation des Enzyms.^[247-248] Der später ebenfalls von Bayer stammende Multikinase-Inhibitor Regorafenib offenbarte ein ähnliches, aber dennoch ausgereifteres Wirkungsprofil im Vergleich zu Sorafenib, wobei interessanterweise von Regorafenib bislang noch keine Kristallstruktur im Komplex mit p38 α veröffentlicht wurde.^[249]

Die beiden strukturell verwandten Substanzen unterscheiden sich lediglich in einem Atom, wobei Regorafenib in 3-Position des Phenoxyrings ein Fluoratom (statt H in Sorafenib) trägt. Daraus ergeben sich im Fall von Regorafenib unterschiedliche Rotationskonformere bzgl. der N-C-Bindung zwischen der Harnstoffeinheit und dem 3-Fluorphenoxyring (Abb. 51). Hieraus lassen sich zwei konformative Grenzfälle ableiten, die durch Rotamer I und Rotamer II beschrieben werden können. In Rotamer I ist das Fluoratom in räumlicher Nähe zum Carbonyl-Sauerstoff der Harnstoff-Gruppe lokalisiert, wohingegen in Rotamer II das entsprechend dekorierte aromatische System um 180° gedreht ist.

5.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Zur Charakterisierung der beiden Substanzen hinsichtlich der Wirkung auf p38 α wurden einerseits ein Fluoreszenz-basierter Affinitäts-Assay und des Weiteren ein Aktivitäts-basierter HTRF[®]-Assay durchgeführt.^[256] In beiden Testsystemen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Inhibitoren (bzw. Vorteile von Regorafenib gegenüber Sorafenib) auf.¹⁸ Die detektierten K_D - und IC_{50} -Werte lagen jeweils in einem vergleichbaren Bereich, sodass in diesen Messungen unter den gewählten Bedingungen die postulierte Begünstigung von Regorafenib nicht bestätigt werden konnte.

Beide Inhibitoren konnten nach dem bereits beschriebenen Protokoll in Anwesenheit von BOG erfolgreich ko-kristallisiert und jeweils zwei Strukturen von p38 α im Komplex mit Sorafenib bzw. Regorafenib gelöst werden. Ein gemeinsamer Bindungsmodus wurde lediglich für den Bereich der Liganden beobachtet, der sich über HRI hinaus in Richtung der allosterischen Untertasche des aktiven Zentrums erstreckt. Dabei interagiert die in beiden Inhibitoren vorhandene Harnstoffeinheit über beide NH-Gruppen mit der Seitenkette von Glu71 in der α -Helix C und über das Carbonyl mit dem Rückgrat-NH von Asp168 im DFG-Motiv (Abb. 52A-D; Abb. 53B).

Allerdings wurden signifikante Unterschiede zwischen an die Kinase gebundenen Sorafenib und Regorafenib im Bereich der Scharnierregion festgestellt. Die 4-Oxy-N-methylpicolinamid-Einheit ist im Vergleich ca. 180° um die O-C-Bindung der Phenoxygruppe gedreht, wodurch sich grundlegend verschiedene Wechselwirkungen mit dem Enzym ergeben (Abb. 53A).

Tab. 19: Bestimmte Dissoziationskonstanten und IC_{50} -Werte für Sorafenib und Regorafenib.

	K_D (nM)	IC_{50} (nM)
Sorafenib	290.6 \pm 102.2	74.8 \pm 21.7
Regorafenib	354.5 \pm 130.0	78.2 \pm 0*

*: Einfachbestimmung.

¹⁸ Die biochemische Charakterisierung wurde von Jörn Weisner durchgeführt.

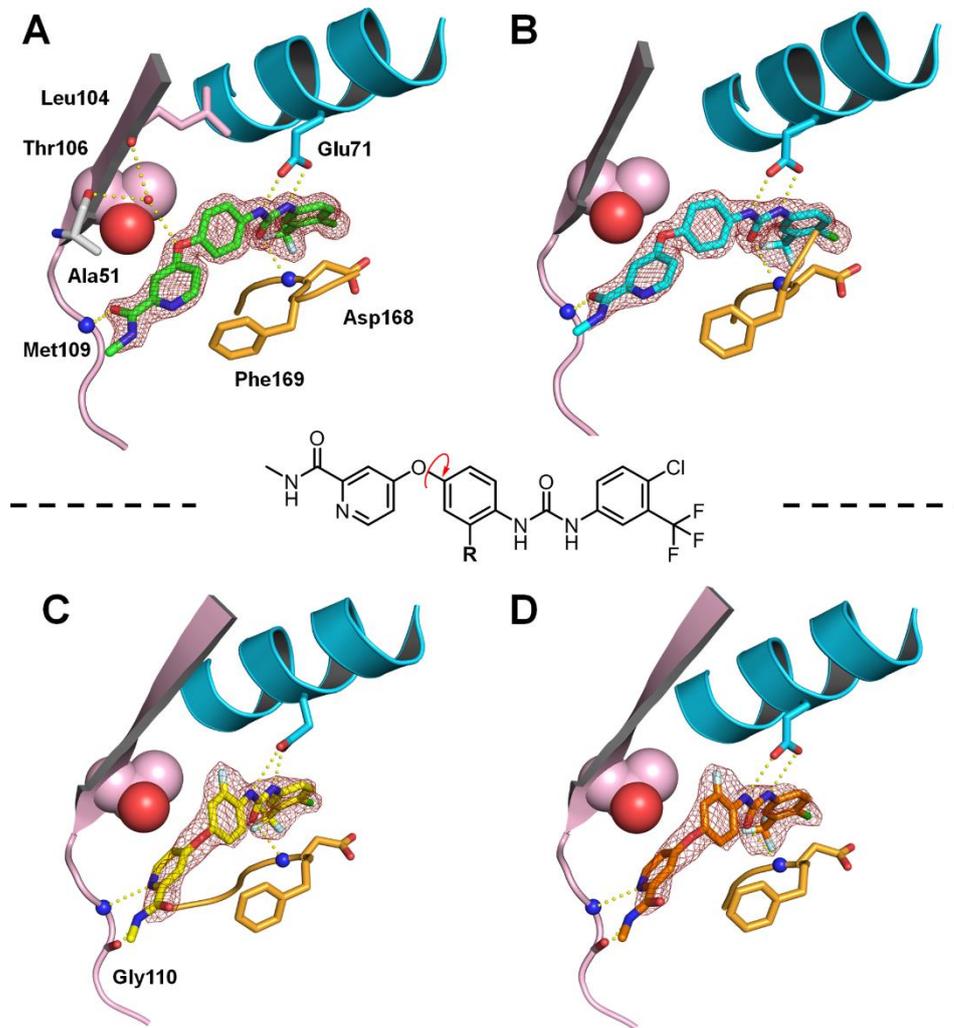


Abb. 52: Ko-Kristallstrukturen von Sorafenib und Regorafenib im Komplex mit p38 α . Darstellungen von p38 α im Komplex mit A) Sorafenib (grün; 1.9 Å), B) Sorafenib (cyan; 2.0 Å), C) Regorafenib (gelb; 2.5 Å) und D) Regorafenib (orange; 2.6 Å); 2mF_o-DF_o-Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Halogen-Bindung (rote Punkte), WBBs (gelbe Punkte); (PDB: unveröffentlicht).

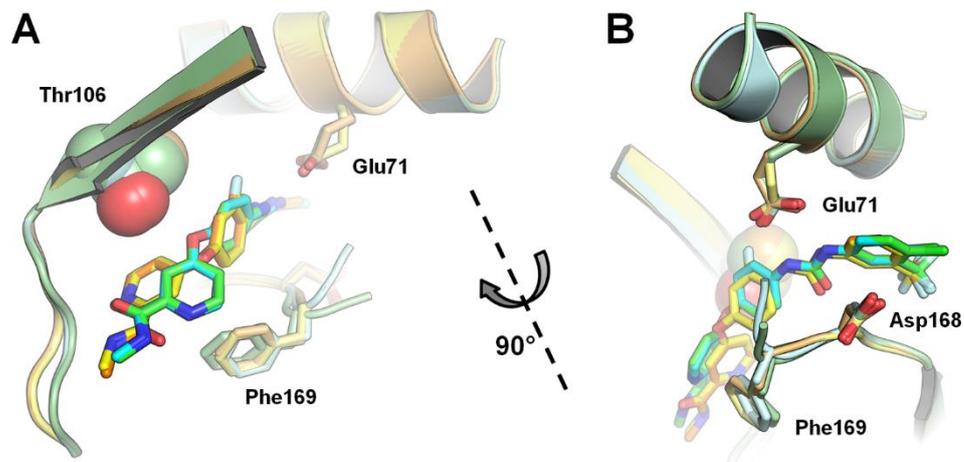


Abb. 53: Detailansichten der Ko-Kristallstrukturen von Sorafenib und Regorafenib im Komplex mit p38 α . A) Interaktionen der Inhibitoren im Bereich der Scharnierregion; B) Wechselwirkungen der Liganden im Bereich des DFG-Motivs; Sorafenib: grün, cyan; Regorafenib: gelb, orange.

Im Fall von Sorafenib bildet das endständige Acetamid über das Carbonyl eine WBB mit dem Rückgrat-NH von Met109 aus. Der Sauerstoff des Phenoxyrings geht polare Kontakte mit einem verbrückenden Wassermolekül ein, welches jeweils mit den Rückgrat-Carbonylgruppen von Ala51 und Leu104 und ebenfalls mit der Seitenkette Thr106 interagiert (Abb. 52A). Im Gegensatz dazu wurden für Regorafenib Kontakte zur Scharnierregion in Form von WBBs über das freie Elektronenpaar des Pyridin-Stickstoffs des Liganden zum Rückgrat-NH von Met109 sowie dem terminalen Acetamid-NH zur Carbonylgruppe derselben Aminosäure beobachtet (Abb. 52C,D). Diese Besonderheiten waren jeweils in beiden gelösten Strukturen der Inhibitoren gleichermaßen festzustellen (Abb. 53A,B).

Für Regorafenib wurde im Komplex mit p38 α ein Konformer gefunden, das am ehesten dem Rotamer II entspricht, was im Einklang mit den Vorhersagen auf Basis der initialen Berechnungen steht. Eine direkte Erklärung für die Orientierung des Fluorphenoxyrings bzw. der Harnstoffeinheit und einer möglichen Rolle des Fluor-Substituenten gehen aus den Strukturen jedoch nicht unmittelbar hervor. Folglich konnten bspw. keine Anzeichen von Halogen-Bindungen identifiziert werden, d.h. im Umkreis von 5 Å des Fluoratoms befinden sich keine Aminosäuren mit denen potentiell Wechselwirkungen eingegangen werden können. Darüber hinaus könnte die Fluorierung in dieser Position eine effizientere Besetzung der HRI ermöglichen, was aus einem Vergleich mit der Komplexstruktur von Skepinone-L ersichtlich wird (Abb. 54A). Dabei bindet das entsprechende Element in Skepinone-L deutlich tiefer in die HRI, wodurch eine räumlich größere Nähe zum Protein resultiert. Dahingegen wird jedoch im Komplex mit Regorafenib (und Sorafenib) eine Ausrichtung von Glu71 in der α -Helix C ermöglicht, sodass eine Interaktion mit der Harnstoffeinheit der Inhibitoren über beide Sauerstoffatome der Seitenkette ausgebildet werden kann, wobei die Harnstoff-Derivate von Skepinone-L diesbezüglich nur eine einfache WBB mit dieser Aminosäure eingehen (Abb. 54B).

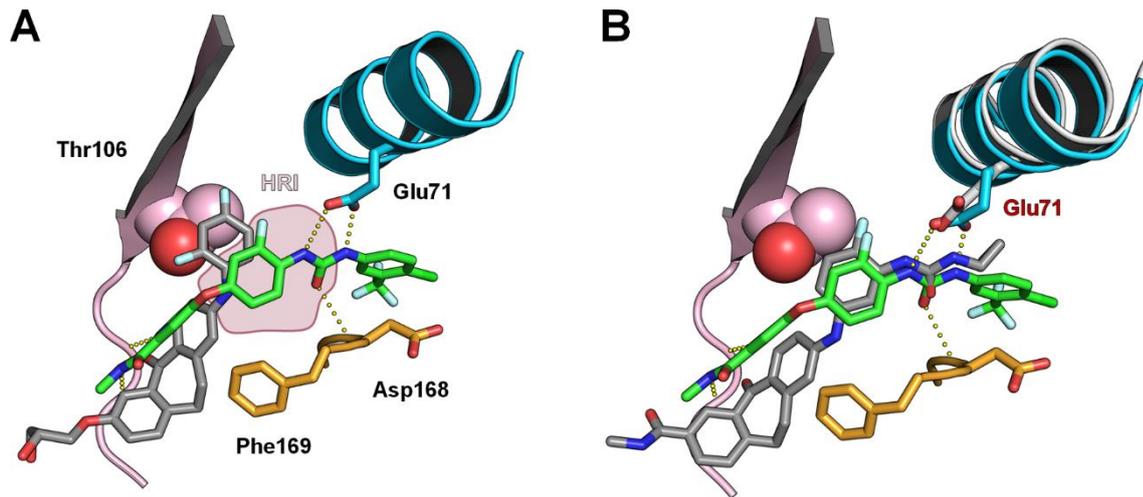


Abb. 54: Überlagerung der Kristallstrukturen von Regorafenib mit anderen ATP-kompetitiven Inhibitoren, jeweils im Komplex mit p38 α . A) Überlagerung der Komplexstrukturen von Regorafenib (grün) und Skepinone-L (grau); B) Überlagerung der Komplexstrukturen von Regorafenib (grün) und Skepinone-L-Harnstoff-Derivat **101b** (grau); Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte); (PDB: 3QUE, **101b** und Regorafenib: unveröffentlicht).

Zusammenfassend wurde die auf Berechnungen der freien Bindungsenergie basierte Vorhersage bevorzugter Rotations-Konformere des Kinaseinhibitors Regorafenib bei Bindung an MAPK p38 α im Vergleich zum strukturell verwandten Sorafenib mit Hilfe von biochemischen Messungen und Ko-Kristallisationsexperimenten evaluiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Liganden hinsichtlich ihrer Affinität und Aktivität nicht signifikant differieren, in den erfolgreich gelösten Ko-Kristallstrukturen jedoch maßgebliche Unterschiede, insb. bzgl. der Wechselwirkungen im Bereich der Scharnierregion, aufweisen. Hierbei konnte darüber hinaus als begünstigt postulierte Regorafenib-Rotamer II gegenüber Rotamer I als das im Komplex mit dem Protein vorliegende Konformer identifiziert werden.

Eine eingehendere Charakterisierung der Inhibitoren könnte zukünftig mittels SPR-Messungen und (vor allem) isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt werden. Auch wenn die hier bestimmten Dissoziationskonstanten und IC₅₀-Werte keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, könnten entsprechende Versuche einerseits zusätzliche Informationen zum Bindungsereignis in Form von kinetischen Parametern (Geschwindigkeitskonstanten) und dem Verfolgen der Interaktion in Echtzeit liefern. Zum anderen könnten anhand thermodynamischer Größen (Entropie, Enthalpie) Vergleiche hinsichtlich der vorgenommenen Berechnungen und Schlussfolgerungen auf Basis der freien Bindungsenergie vorgenommen werden. Die in den Kristallstrukturen demonstrierten Besonderheiten legen durchaus begründete Unterschiede im Bindungsverhalten nahe, die auf diese Weise genauer untersucht werden könnten.

5.4 Entwicklung dual-spezifischer CK1 δ - und p38 α -Inhibitoren

5.4.1 Theoretischer Hintergrund

Die Ser/Thr-Kinase CK1 δ (Casein-Kinase 1 *delta*) ist an der Entstehung diverser schwerer Krankheiten wie Alzheimer^[257], amyotrophe Lateralsklerose^[258] oder Krebs^[259-261] beteiligt und stellt somit eine relevante Zielstruktur für die medizinische Wirkstoffforschung dar. Eine der maßgeblichen Herausforderungen liegt dabei in der Entwicklung Isoform-selektiver Inhibitoren. Insgesamt sind sechs humane CK1-Varianten (α , γ 1, γ 2, γ 3, δ , ϵ) bekannt, wobei diese teilweise ähnliche, aber andererseits auch grundsätzlich unterschiedliche (patho)physiologische Eigenschaften aufweisen bzw. zelluläre Aufgaben erfüllen.^[262] Zudem sind bislang nur wenige spezifische CK1 δ -Inhibitoren bekannt und häufig wird für entsprechende Substanzen die gleichzeitige Adressierung von weiteren Kinasen, wie z.B. der MAPK p38 α , beobachtet, was potentiell zu gravierenden Nebenwirkungen führen kann und die Notwendigkeit selektiver Wirkstoffe weiterhin unterstreicht.

Einer der am besten untersuchten CK1-Inhibitoren weist eine *in vivo*-Aktivität von ca. 1 μ M auf und ist wirksam in Pankreaskrebs, wie anhand von Xenograft-Modellen demonstriert werden konnte.^[263] Allerdings ist auch bekannt, dass parallel andere Prozesse und Strukturen adressiert werden.^[264-265] Darüber hinaus wurden von Peifer *et al.* 4,5-Diarylimidazole beschrieben, die ursprünglich für die Inhibition von p38 α entwickelt wurden, allerdings ebenfalls hervorragende Aktivität gegenüber CK1 δ ($IC_{50} = 5$ nM) und CK1 ϵ ($IC_{50} = 73$ nM) zeigten.^[266] Durch die Oxidation des enthaltenen Thioethers zum korrespondierenden Sulfinyl konnte eine Steigerung der Selektivität bzgl. der beiden Isoformen ($IC_{50}(CK1\delta) = 11$ nM; $IC_{50}(CK1\epsilon) = 447$ nM) erzielt werden (Abb. 55). Die bisherigen Moleküle weisen allerdings kritische Nachteile auf, da sich die *E/Z*-Isomerisierung der Doppelbindung und der vorhandene Michael-Akzeptor ungünstig auf die Stabilität und praktische Anwendbarkeit der Moleküle auswirken.

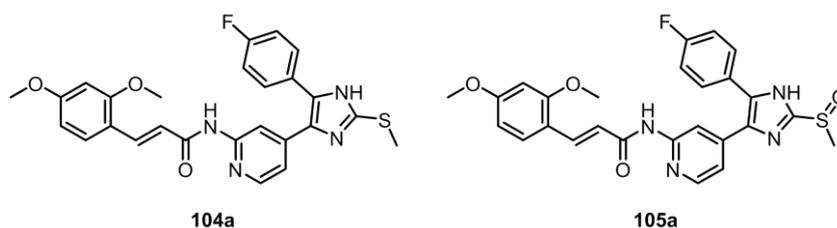


Abb. 55: Strukturelle Identität der dual-spezifischen Kinaseinhibitoren **104a** und **105a**.

In nachfolgenden Untersuchungen sollten optimierte Derivate der Parentalsubstanzen **104a** und **105a** synthetisiert werden, die von den aufgeführten Defiziten befreit sind und gleichzeitig immer noch selektiv in Bezug auf CK1 δ/ϵ sind. Hierfür wurde ein klassischer medizinalchemischer Ansatz, ausgehend von der Generierung molekularer Modelle der geplanten Inhibitoren *in silico* zur Abschätzung der eingenommenen Orientierung im aktiven Zentrum, der anschließenden chemischen Synthese vielversprechender Liganden und der biochemischen Evaluierung verfolgt. Zusätzlich sollten im Rahmen von Ko-Kristallisation in CK1 δ und p38 α die experimentell bestimmten Bindungsmodi mit den theoretischen Posen verglichen und auf diese Weise das initiale Design validiert werden.

5.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Der Bindungsmodus von neuartigen, auf den Parentalsubstanzen **104a** und **105a** basierenden Diarylimidazol-Derivaten wurde jeweils im Komplex mit CK1 δ und p38 α modelliert und aussichtsreiche Liganden selektiert, die daraufhin synthetisch hergestellt wurden. Zu den Zielsubstanzen zählten entworfene Moleküle, aus denen die „problematische“ Doppelbindung entfernt und durch Alkylketten, Alkylketone, Harnstoffeinheiten oder Methylpyrrole an dieser Stelle ersetzt wurde. Dabei wurden zwei Serien in Form von Thioethern (**104**) und entsprechenden Sulfonylen (**105**) generiert (Tab. 20).¹⁹

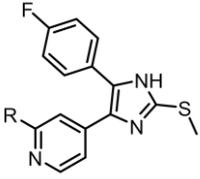
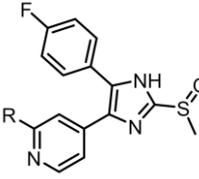
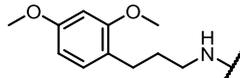
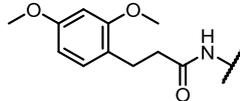
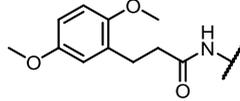
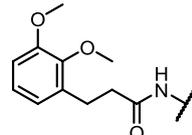
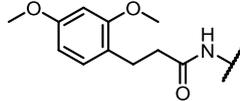
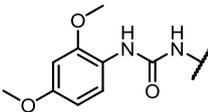
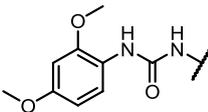
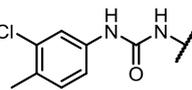
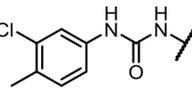
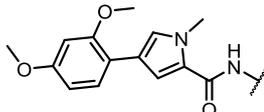
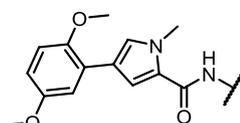
¹⁹ Modellierung, Synthese und biochemische Evaluierung wurde im Arbeitskreis Peifer durchgeführt.

Mit Hilfe eines Autoradiographie-basierten Assays wurde unter Verwendung von Isotopen-markiertem Co-Substrat ATP- γ - ^{32}P die inhibitorische Aktivität der synthetisierten, Dimethoxyphenyl-dekorierten Liganden auf CK1 δ und CK1 ϵ bestimmt (Tab. 20). Im Vergleich zeigten sich stets eine stärkere Hemmung von CK1 δ gegenüber CK1 ϵ sowie eine generell höhere Potenz der Thioether als der analogen Sulfinyle.

Die Alkylamin-verknüpften Dimethoxyphenyle (bspw. **104b**) waren vergleichsweise zum Rest der getesteten Substanzen eher weniger aktiv, wohingegen die Einführung von entsprechenden Amidgruppen (vgl. **104c-e**) einen ca. 10 - 100-fachen Gewinn an Inhibition ($\text{IC}_{50}(\mathbf{104e}) = 4 \text{ nM}$ vs. $\text{IC}_{50}(\mathbf{104b}) = 386 \text{ nM}$ auf CK1 δ) bewirkte. Diese Beobachtung lässt auf eine mutmaßliche Rolle der Carbonylgruppe bei der Ausbildung von Wechselwirkungen innerhalb des aktiven Zentrums schließen. Anhand von **104f-d** wurde festgestellt, dass einerseits die Einführung einer verbrückenden Harnstoffeinheit (anstatt des Michael-Akzeptors der Parentalsubstanzen) zur Abnahme der detektierten Inhibition führt, während bspw. eine Methylierung oder Halogenierung des endständigen aromatischen Systems keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Methoxygruppen an dieser Stelle hervorrufen. Allerdings stammte der selektivste Ligand der Bibliothek (**104f**, $\text{IC}_{50}(\text{CK1}\delta) = 19 \text{ nM}$ vs. $\text{IC}_{50}(\text{CK1}\epsilon) = 227 \text{ nM}$) aus dieser Serie und zählt mit **104d,e** und **104h,i** zu den insgesamt aktivsten Substanzen. Letztere (**104h,i**) verfügen über einen Methylpyrrol-Linker zum Dimethoxyphenyl-Rest und waren ähnlich potent und selektiv wie **104c-e**.

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte eine Auswahl an Inhibitoren (**104d,f,i**) zur Gegenüberstellung der Aktivitäten auf CK1 δ und p38 α (Tab. 21). Hierbei wurde mit allen Liganden eine effiziente Hemmung beider Kinasen erreicht, wobei jedoch keine Selektivität gegenüber einem der Enzyme beobachtet wurde und p38 α nach wie vor als prominentes *off-target* von den generierten dual-spezifischen Inhibitoren adressiert wird (vgl. **104d,f,i**; $\text{IC}_{50}(\text{CK1}\delta) = 4$ vs. 19 vs. 8 nM ; $\text{IC}_{50}(\text{CK1}\epsilon) = 25$ vs. 227 vs. 81 nM ; $\text{IC}_{50}(\text{p38}\alpha) = 10$ vs. 28 vs. 10 nM). Vergleichbares zeigte sich auch in einer Durchmusterung von **104d** (bei einer Konzentration von 100 nM) gegen eine Anzahl von 320 Kinasen, der ein definiertes Profil für CK1 δ/ϵ zu entnehmen war und welche zusätzlich die Inhibition von lediglich sechs weiteren getesteten Proteinen, darunter auch p38 α , aufwies (Daten nicht gezeigt).

Tab. 20: Strukturelle Identität der chemischen Strukturen einer Auswahl von 4,5-Diarylpyrozol-Derivaten und bestimmte IC₅₀-Werte gegenüber CK1δ und CK1ε.

#	R	IC ₅₀ (nM)	
		CK1δ	CK1ε
			
			
104b		386 ± 86	6731 ± 2680
104c		20 ± 2	129 ± 22
104d		4 ± 1	25 ± 4
104e		14 ± 2	91 ± 12
105b		93 ± 12	499 ± 70
104f		19 ± 3	227 ± 37
105c		153 ± 24	910 ± 18
104g		35 ± 10	203 ± 67
105d		115 ± 18	764 ± 207
104h		9 ± 1	45 ± 7
104i		8 ± 1	81 ± 15

Tab. 21: Bestimmte IC₅₀-Werte für **104d,f,i** gegenüber CK1 δ im Vergleich zu p38 α ; in Einfachbestimmung.

#	IC ₅₀ (nM)	
	CK1 δ	p38 α
104d	< 3	10
104f	10	28
104i	< 3	10

Die jeweils potentesten Inhibitoren jeder Serie wurden in Ko-Kristallisationsexperimenten sowohl mit p38 α als auch CK1 δ eingesetzt.²⁰ Daraus gingen die erfolgreich gelösten Strukturen von **104d** im Komplex mit p38 α und **104i** im Komplex mit CK1 δ hervor (Abb. 56A,B). In beiden Fällen interagiert die 2-Aminopyridineinheit als Scharnierregion-bindendes Motiv mit den in diesem Element befindlichen Rückgrat-NH und -Carbonylen von Met109 (p38 α) bzw. Leu85 (CK1 δ). Weitere Gemeinsamkeiten liegen in der Besetzung der HRI durch die Fluorphenylgruppe und einer WBB zwischen dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs in 3-Position des Imidazol-Kerns der Liganden und einem in der Bindetasche gelegenen Wassermolekül. Ein weiterer polarer Kontakt zu diesem Wasser über das Carbonyl der Amideinheit wurde für **104d** in p38 α beobachtet (Abb. 56A). In dieser Struktur liegt das DFG-Motiv in einer *in between*-Konformation vor, die allerdings mutmaßlich durch ein in eine benachbarte Region gebundenes BOG-Molekül hervorgerufen wird. In CK1 δ hingegen wurde der für Typ I-Inhibitoren typische DFG-*in*-Zustand und darüber hinaus ein sich über zwei Wassermoleküle erstreckendes WBB-Netzwerk zu Glu52 identifiziert (Abb. 56B).

In beiden Fällen ist der Bindungsmodus der Liganden in den aktiven Zentren der jeweiligen Kinasen sehr ähnlich. In den einzelnen Kristallstrukturen konnten demnach keine „spezifischen“ Wechselwirkungen, im Sinne von alleinstellenden Interaktionen mit dem Enzym, festgestellt werden. Beide Inhibitoren könnten somit in die ATP-Bindetasche des jeweils anderen Proteins binden, was durchaus mit der beobachteten SAR korreliert.

²⁰ Die Kristallisation von CK1 δ wurde im Arbeitskreis Baumann durchgeführt.

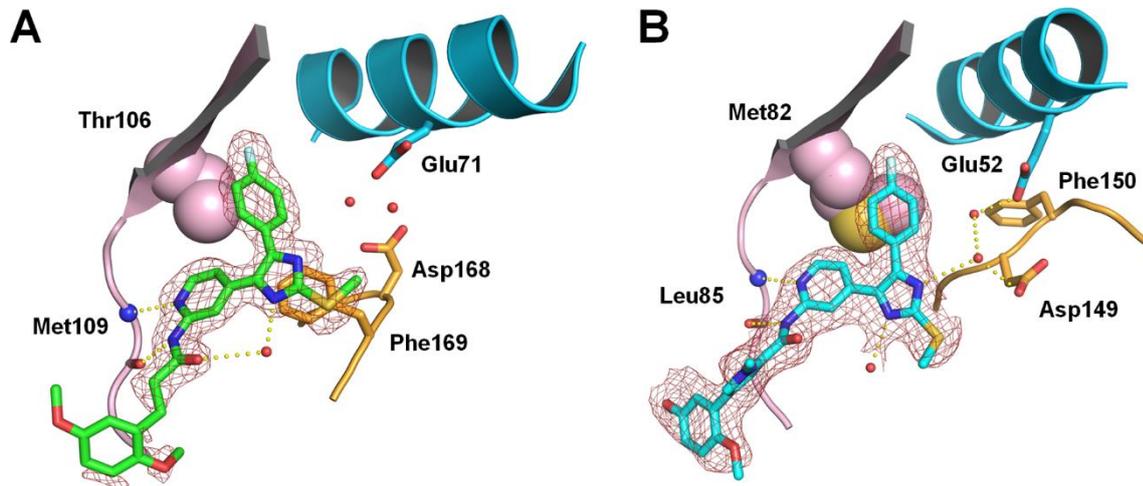


Abb. 56: Ko-Kristallstrukturen von dual-spezifischen CK1 δ - und p38 α -Inhibitoren. Darstellungen von A) **104d** (grün) im Komplex mit p38 α und B) **104i** (cyan) im Komplex mit CK1 δ ; 2mF $_o$ -DF $_c$ -Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte); (PDB: 5ML5, 5MQV).

Mit den neuartigen Komplexen ist die Grundlage für eine Struktur-basierte Optimierung der Liganden hinsichtlich der Steigerung der inhibitorischen Aktivität sowie vor allem der Selektivität gegenüber einer bestimmten Kinase gegeben. Hierzu könnte eine weitläufigere Analyse der Peripherie der Bindungsstelle stattfinden. Beispielsweise befindet sich in Scharnierregion jeweils eine zum Pyridinring der Liganden orientierte Carbonylgruppe des Proteinrückgrats (p38 α : His107, CK1 δ : Glu83), die potentiell mit Halogenen in 3-Position des Aromaten adressiert werden könnte, wie es am Beispiel von p38 α bereits erfolgreich gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel 5.3) (Abb. 57A,B). Am C-terminalen Ende der Scharnierregion ist in beiden Proteinen ein Aspartat lokalisiert (p38 α : Asp112, CK1 δ : Asp90), das durch entsprechende Erweiterung der Dimethoxyphenyleinheit zur Ausbildung konstruktiver Wechselwirkungen genutzt werden könnte.

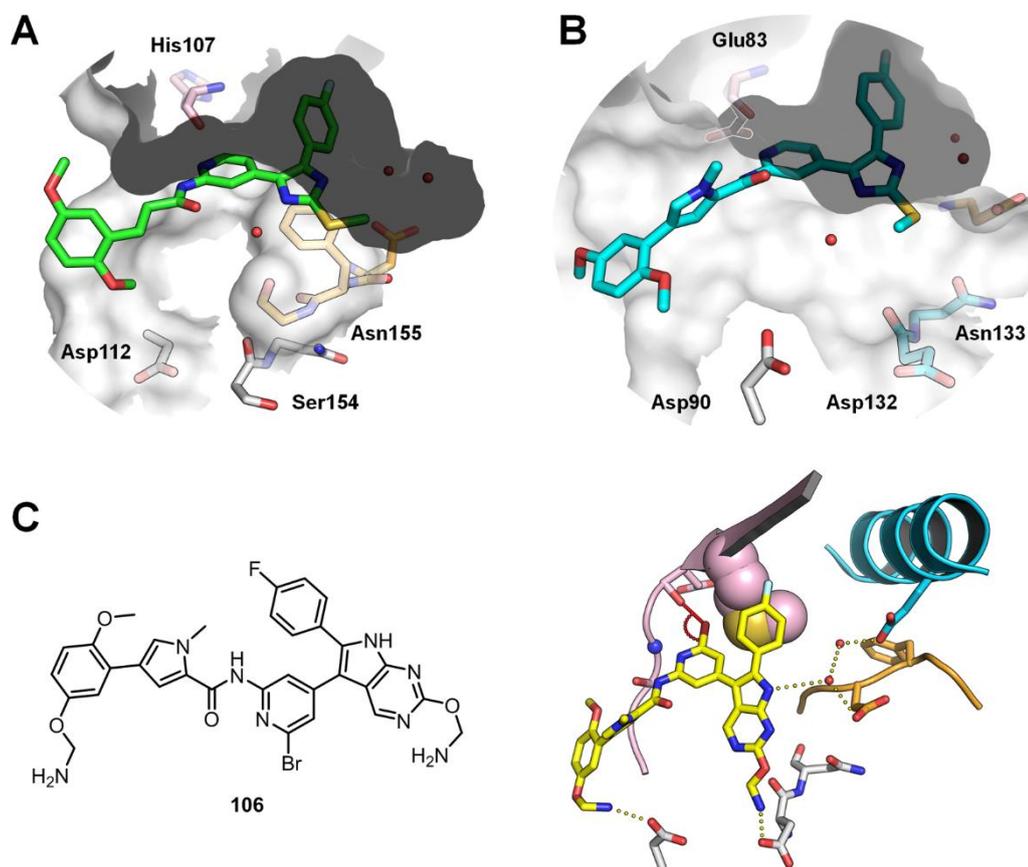


Abb. 57: Analyse der Peripherie der ko-kristallisierten Inhibitoren **104d,i** und Design CK1 δ -spezifischer Liganden. Darstellungen von A) **104d** (grün) im Komplex mit p38 α und B) **104i** (cyan) im Komplex mit CK1 δ ; C) chemische Struktur des entworfenen Liganden **106** (gelb) und postulierter Bindungsmodus im aktiven Zentrum von CK1 δ .

Ferner sind die 2- und 3-Position des Pyrazol-Kerns Lösungsmittel-exponiert und bieten viel ungenutzten Raum für eine Erweiterung des Grundgerüsts, z.B. in Form von Diarylpyrrolen oder -pyrrolopyrimidinen. Hierbei würde allerdings auf eine Thioethergruppe verzichtet werden, gleichzeitig jedoch eine Ausweitung der Moleküle in Richtung der polaren Aminosäuren in der Umgebung des DFG-Motivs und des HRD-Motivs erzielt werden.²¹ Diesbezüglich bietet CK1 δ eine Besonderheit, die zur Gewinnung von Selektivität im Vergleich zu p38 α ausgenutzt werden könnte. Sie weist C-terminal vom HRD-Motiv die beiden polaren Aminosäuren Asp132 und Asn133 auf, wohingegen p38 α hier lediglich ein Asparagin (Asn155) besitzt. Durch Substitution mit Wasserstoffbrücken-Donoren und Einhaltung eines geeigneten Abstandes könnte die Ausbildung einer WWB zu Asp132 erzielt werden und potentiell in zusätzlicher Affinität gegenüber CK1 δ resultieren.

²¹ Diese Beobachtung wird durch die Kristallstruktur mit **104d** nicht gut widerspiegelt, da das Enzym (vermutlich) aufgrund des anwesenden BOG eine DFG-*in between*-Konformation einnimmt. Anhand des Komplexes des strukturell verwandten SB203580 (in Abwesenheit von BOG) geht der Sachverhalt deutlicher hervor, da hier die Kinase im DFG-*in*-Zustand vorliegt und eine damit einhergehende „Öffnung“ dieser Region resultiert. (PDB: 1A9U).

Ein entsprechendes Molekül könnte (ungeachtet der synthetischen Umsetzbarkeit) der Struktur von **106** folgen. Im entsprechenden Modell im Komplex mit CK1 δ kommt die eingeführten Aminfunktionen in räumliche Nähe zu den adressierten Seitenketten von Asp112 und Asp132, welche durch Dekoration des ursprünglichen Dimethoxyphenylrings und Verwendung eines Pyrrolopyrimidin-Grundgerüsts ermöglicht wird (Abb. 57C). Eine potentielle Halogen-Bindung zu Glu83 erscheint basierend auf dem theoretisch gemessenen Abstand (2.8 Å) und Winkel (135°) sowie der Annahme einer Flexibilität des Liganden in der Bindungstasche zur bevorzugten geometrischen Ausrichtung durchaus möglich.

Zusammenfassend wurde ein *in silico*-Design und die nachfolgende Synthese von ATP-kompetitiven 4,5-Diarylimidazol-basierten Kinaseinhibitoren durchgeführt, die eine gesteigerte Selektivität gegenüber dem Zielenzym CK1 δ im Vergleich zu den Isoformen dieses Proteins sowie zu p38 α als bekanntes *off-target* entsprechender Hemmstoffe aufweisen sollten. Aus der Aktivitäts-basierten Evaluierung gingen potente dual-spezifische CK1 δ /p38 α -Inhibitoren mit einem teilweise exzellenten (CK1 α , CK γ 1-3), stellenweise jedoch moderaten Isoform-Selektivitäts-Profil (CK1 ϵ) hervor. In erfolgreichen Ko-Kristallisationsstudien zeigte sich anhand der Komplexstrukturen von **104h** und p38 α bzw. **104i** und CK1 δ dass beide Liganden einen ähnlichen Bindungsmodus in den aktiven Zentren der jeweiligen Kinase einnehmen, was die gleichzeitige Adressierung beider Proteine erklärt. Allerdings zählen die synthetisierten Substanzen zu den potentesten bislang bekannten CK1 δ -Inhibitoren, sodass diese (insb. **104d**) als molekulare, pharmakologische Werkzeuge in Studien zu CK1 δ -Signalwegen und -korrelierten Krankheiten verwendet werden können. Die im Rahmen der Ko-Kristallisation identifizierten Bindungsmodi bieten einen Ausgangspunkt für die weitere Optimierung der Substanzen hinsichtlich mono- und Isoform-spezifischer CK1 δ -Inhibitoren.

5.5 Evaluierung von Benzothiazin-basierten p38 α -Inhibitoren

5.5.1 Theoretischer Hintergrund

Die MAPK p38 α gilt als klinisch relevante Zielstruktur, die in einer Vielzahl an Erkrankungen involviert ist und daher ein wichtiger Gegenstand der aktuellen medizinalchemischen Forschung und Wirkstoffentwicklung (vgl. Kapitel 1.2.1). Viele Inhibitoren sind im Verlauf von klinischen Studien gescheitert, sodass bis heute noch keine entsprechenden Substanzen die Marktzulassung erhalten haben, woraus sich weiterhin die Notwendigkeit neuartiger Modulatoren dieser Kinase ergibt. In diesem Zusammenhang beschrieben Forscher des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften in Perugia kürzlich Serien neuartiger Benzothiazin-basierter p38 α -Inhibitoren, deren potenteste Vertreter (**107a,b**) nun in weiterführenden Studien untersucht werden sollten (Tab. 22).^[267] Hierbei sollten zum einen eine eingehende Charakterisierung in Zell-basierten Assays sowie Ko-Kristallisationsexperimente zur Aufdeckung des bislang unbekanntenen Bindungsmodus der Liganden stattfinden.

Tab. 22: Strukturelle Identität und bestimmte IC₅₀-Werte der p38 α -Inhibitoren **107a,b**; p38 α : Messung der enzymatischen Aktivität von p38 α im Ab-basierten Assay; TNF α : Messung der Freisetzung von TNF α im Vollblut-Assay.

#	IC ₅₀ (μ M)	
	p38 α	TNF α
107a	0.46 \pm 0.05	0.5 \pm 0.1
107b	0.94 \pm 0.30	18.0 \pm 3.5

5.5.2 Ergebnisse und Diskussion

In initialen Versuchen konnte anhand von HT29, einer humanen kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie, ein erhöhtes Zellüberleben in Gegenwart der Inhibitoren detektiert werden, wobei **107a** einen signifikanteren Effekt gegenüber **107b** aufwies. Ein ähnlicher Trend wurde phänotypisch in der Proliferation von Zellen beobachtet, indem ein deutlicher Rückgang im Wachstum von Kolonien in Anwesenheit von **107a** stattfand, der unter Verwendung von **107b** weniger betont war. Weitere zelluläre Studien, wie bspw. Untersuchungen des Phosphorylierungszustandes von p38 α und verwandten oder nachgeschalteten Kinasen sind zu diesem Zeitpunkt noch andauernd.²²

Eine strukturelle Charakterisierung der Inhibitoren sollte erfolgen, um Einsicht in die molekularen Wechselwirkungen innerhalb der adressierten ATP-Bindetasche zu erlangen und auf diese Weise potentiell Erklärungen für die Unterschiede im Aktivitäts-Profil der Substanzen zu finden. Diesbezügliche Experimente führten zu einer direkten Ko-Kristallisation von **107a** im Komplex mit dem Zielprotein in Anwesenheit von BOG, während diese Vorgehensweise im Fall von **107b** nicht zum Erfolg führte (Abb. 58A). Deswegen wurden nachfolgend p38 α -Kristalle in Gegenwart reversibel bindender LiPoLis (vgl. Kapitel 3.4) für *soaking*-Ansätze mit **107b** verwendet, wodurch schließlich auch das Lösen der entsprechenden Komplexstruktur realisiert werden konnte (Abb. 58B).

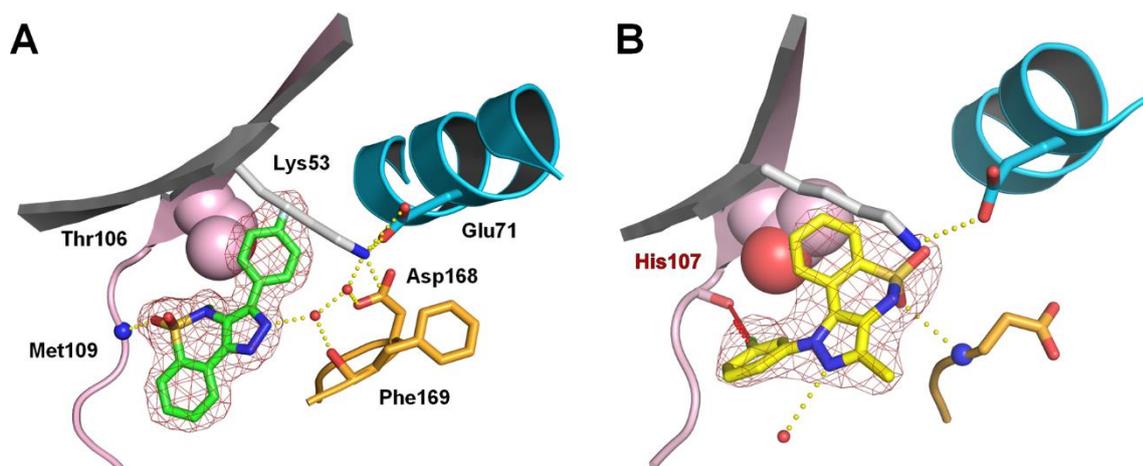


Abb. 58: Ko-Kristallstrukturen von p38 α -Inhibitoren. Darstellungen von A) **107a** (grün) im Komplex mit p38 α und B) **107b** (gelb) im Komplex mit p38 α ; 2mF $_o$ -DF $_c$ -Elektronendichte (rot) wurde bei 1.0 σ konturiert; Wassermoleküle (rote Sphären), WBBs (gelbe Punkte), Halogen-Bindung (rote-Linie); (PDB: unveröffentlicht).

²² Die Zell-basierte Charakterisierung der Inhibitoren wurde am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften in Perugia durchgeführt.

Aus der anschließenden Analyse der Daten zeigten sich überraschenderweise zwei jeweils signifikant unterschiedliche Bindungsmodi im aktiven Zentrum der Kinase. Für **107a** wurde eine WBB zwischen einem Sulfonyl-Sauerstoff und dem Rückgrat-NH von Met109 in der Scharnierregion sowie die Besetzung HRI durch den Fluorphenyl-Substituenten des Liganden im Bereich der Türsteher-Aminosäure Thr106 beobachtet. Außerdem wurde eine Wasser-vermittelte WBB zum Rückgrat-Carbonyl von Phe169 im DFG-Motiv festgestellt. Dieses wies eine *in between*-Konformation auf, wobei jedoch kein BOG in Nachbarschaft des aktiven Zentrums identifiziert wurde. Im Fall von **107b** belegte das Benzothiazin-Grundgerüst (teilweise) die HRI, wodurch sich eine geeignete Orientierung der Sulfonylgruppe ergab, um mit dem Rückgrat-NH von Asp168 eine WBB auszubilden. In der entsprechenden Struktur ist Phe169 nicht aufgelöst und folglich konnte die DFG-Konformation nicht eindeutig bestimmt werden. Aufgrund der Ausrichtung von Asp168 zur α -Helix C kann jedoch ein DFG-out-Zustand der Kinase angenommen werden. Außerdem wird aus der Überlagerung der Komplexstrukturen mit **107a,b** ersichtlich, dass die 3-Methylgruppe in **107b** eine alternative Orientierung der Aktivierungsschleife aufgrund sterischer Repulsion wahrscheinlich nicht erlauben würde (Abb. 59A).

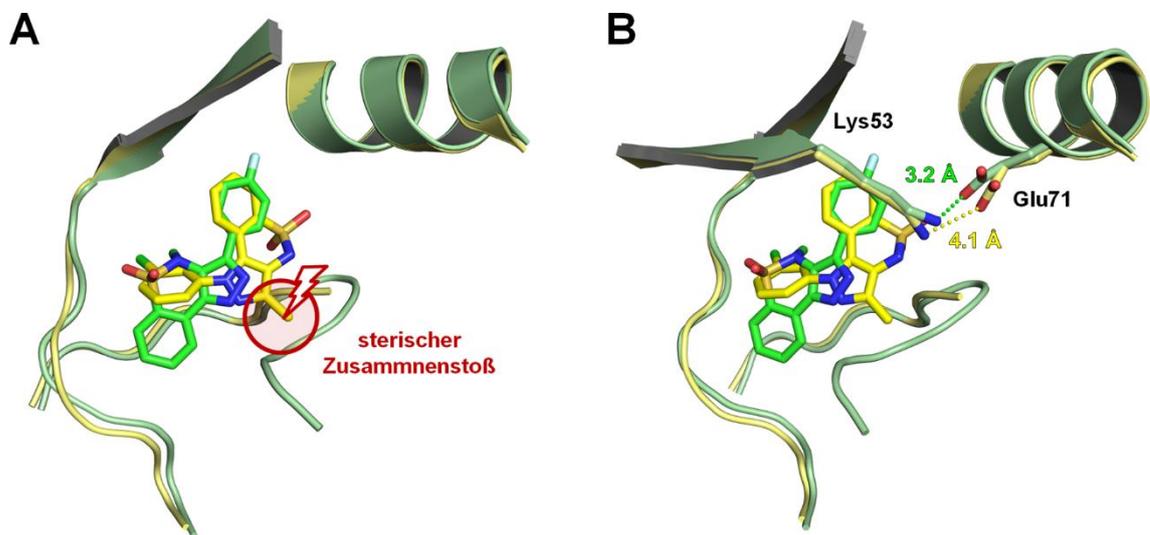


Abb. 59: Überlagerung der Ko-Kristallstrukturen von **107a** und **107b** im Komplex mit p38 α . A) Sterischer Zusammenstoß (roter Kreis) der 3-Methylgruppe am Pyrazolring von **107b** mit der Aktivierungsschleife im Bereich des DFG-Motivs; B) Vergleich der Entfernungen der Seitenketten von Lys53 und Glu71.

Die freien Elektronenpaare des Stickstoffs in 2-Position des Pyrrazolrings gehen eine WBB mit einem in der Bindetasche befindlichen Wassermolekül ein. Zusätzlich wurde eine Halogen-Bindung zwischen dem Chlorphenyl-Substituent und dem Carbonylsauerstoff von His107 in der Scharnierregion beobachtet (Abstand 3.2 Å, Winkel: 155.1°), ähnlich wie in anderen für p38 α bereits beschriebenen Strukturen (vgl. Kapitel 5.2.2). Darüber hinaus wies dieser Inhibitor aufgrund fehlender entsprechender Struktur motive keine weiteren Interaktionen über für Kinaseinhibitoren sonst typische Scharnierregion-bindende Motive auf.

Vergleichend lässt sich ein um ca. 1 Å vergrößerter Abstand zwischen den Seitenketten der konservierten Aminosäuren Lys53 und Glu71 feststellen, der sich vermutlich auf die in diese Region ragende Sulfonylgruppe von **107b** zurückführen lässt, welche einerseits sterisch anspruchsvoll ist und des Weiteren einen potentiellen Wasserstoffbrückenakzeptor zur Interaktion mit Lys53 darstellt (Abb. 59B). In Kombination mit der Beobachtung zweier unterschiedlicher DFG-Konformationen lässt sich annehmen, dass die beiden Inhibitoren jeweils einen unterschiedlichen Aktivitätszustand der Kinase stabilisieren, d.h. **107a** „DFG-*in between*“ und eine intakte Lys53-Glu71-Wechselwirkung induzieren, während für **107b** in „DFG-*out*“ bindet und mutmaßlich die Lys53-Glu71-Interaktion (zumindest teilweise) stört.

Wenn durch die präsentierten Liganden tatsächlich verschiedene Konformationen von p38 α adressiert werden können, würden möglicherweise SPR-Messungen weitere Informationen bzgl. der Kinetik des Bindungsereignisses in Echtzeit und dadurch eine Erklärung der bislang festgestellten unterschiedlichen Wirkung in Zellen liefern. Eine zukünftige Entwicklung bzw. Optimierung der Substanzen hinsichtlich potenterer und selektiverer Inhibitoren könnte ausgehend von **107b** erfolgen, da dieser Ligand einen unorthodoxen Bindungsmodus offenbarte, der den strukturellen Ausbau entlang der Scharnierregion nahelegt, um dort bspw. Wechselwirkungen mit dem Rückgrat von Met109 und Gly110 auszubauen. Weiterer Affinitätsgewinn könnte außerdem durch die Substitution von Chlor durch Brom (oder Iod) zur Verstärkung der beobachteten Halogen-Bindung oder Fluorierung des aromatischen Systems im Benzothiazin-Grundgerüst zur effizienteren Besetzung von HRI erzielt werden, wobei die Ausrichtung des eingeführten Fluor-Atoms potentiell attraktive elektrostatische Intraaktionen mit dem Carbonyl-Kohlenstoff von Leu104 ermöglicht (im Gegensatz zu den bislang geschilderten HRI-bindenden Motiven), wie beispielhaft an dem Modell von **108** gezeigt (Abb. 60).

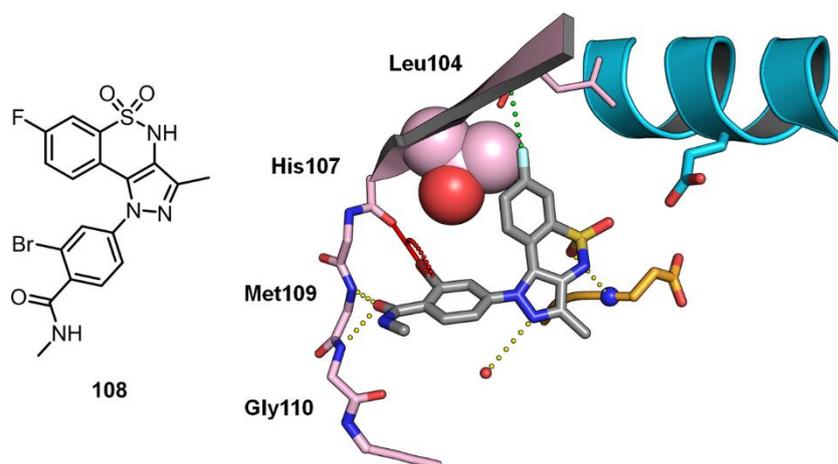


Abb. 60: Chemische Struktur von **108** und Modellierung des Moleküls in das aktive Zentrum von p38 α ; WBBs (gelbe Punkte), elektrostatische Interaktion (grüne Punkte), Halogen-Bindung (rote Linie); (PDB: unveröffentlicht).

Zusammenfassend wurden neuartige Inhibitoren der MAPK p38 α entwickelt und biochemisch sowie zellulär charakterisiert. Strukturbiologische Untersuchungen der potentesten Derivate **107a,b** offenbarten zwei deutlich verschiedene Bindungsposen der Liganden im Komplex mit p38 α , die sich durch die Adressierung unterschiedlicher Regionen innerhalb der ATP-Bindetasche und der Ausbildung jeweils spezifischer Wechselwirkungen auszeichnen. Diese Kristallstrukturen könnten als Ansatzpunkt für die Erklärung der zukünftig zu erfassenden, detaillierteren SAR bzw. aufzustellenden Wirkungsprofile der beiden Substanzen *in vitro* und *in vivo* dienen. Außerdem stellen sie die Grundlage für eine potentielle Weiterentwicklung der Inhibitoren zu effizienten Wirkstoffen mit einem unter Umständen einzigartigen Bindungsmodus (ausgehend von **107b**) dar.

6 Zusammenfassung

In den letzten zwei Dekaden gewährleistete der Fortschritt chemisch-biologischer Technologien und medizinisch-chemischer Wirkstoffforschung fundamentale Beiträge zur Aufdeckung von Signaltransduktions-Netzwerken und Identifikation von an der Entstehung von Krankheiten verantwortlichen Zielstrukturen. Diesbezüglich erweckte bspw. die Aufklärung molekularer Mechanismen, die zur Fehlregulierung von Proteinkinasen als Ursache diverser humaner Erkrankungen führen, maßgebliches wissenschaftliches Interesse. Aus diesem Zusammenhang leitet sich die hauptsächliche pharmazeutische Relevanz der katalytischen Funktion dieser Enzyme, d.h. dem Phosphattransfer von ATP auf Substrate und der damit i.d.R. verbundenen Modulation deren Aktivitätszustandes sowie die daraus folgende Notwendigkeit der Entwicklung von potenten und selektiven Kinaseinhibitoren ab. Insbesondere wird diese Fokussierung durch die Anzahl der Publikationen und veröffentlichten Kristallstrukturen, die sich mit dem aktiven Zentrum der Transferasen beschäftigen, widerspiegelt.

Darüber hinaus existieren allerdings auch sogenannte gerüstgebende Funktionen von Kinasen, unter denen man die Involvierung in nicht-katalytische Prozesse, wie bspw. der Ausbildung von PPIs oder der Formierung von MECs versteht, die u.a. vor allem der Regulation oder Lokalisation von Substratmolekülen dienen. Es wird angenommen, dass diese Funktionen in Anzahl und Wichtigkeit die bislang intensiv untersuchten katalytischen Eigenschaften übersteigen könnten. Bislang sind jedoch nur wenige entsprechende Beispiele in der Literatur beschrieben, sodass die Identifikation und Charakterisierung von Kinase-korrelierten Prozessen abseits der Phosphorylierung von zentraler Bedeutung für zukünftige Fragestellungen in der Chemischen Biologie sind.

In der C-terminalen Subdomäne der MAPK p38 α ist eine in Entfernung zum aktiven Zentrum gelegene Bindetasche lokalisiert, deren Funktion bislang noch nicht vollständig verstanden ist. Diese LP kann durch verschiedene Liganden, sogenannten LiPoLis, adressiert werden und war kürzlich Gegenstand diverser Studien, die eine potentielle biologische Rolle dieser Region allerdings nicht umfassend klärten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand von 2-Arylchinazolin, die im Arbeitskreis Rauh als LiPoLis identifiziert wurden, das Struktur-basierte Design und die organische Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek sowie die anschließende biophysikalische Charakterisierung und strukturblogische Evaluierung der hergestellten Liganden erfolgen. Dabei sollten chemisch optimierte und gegenüber dem Zielprotein affine

LP-Binder erhalten werden, die in zukünftigen Experimenten als geeignete Sondenmoleküle eingesetzt werden können, um möglicherweise die Frage nach der Relevanz dieser Tasche und ihrer Liganden zu beantworten.

Hierfür wurden Ko-Kristallstrukturen von **3a,b** im Komplex mit p38 α analysiert und auf diese Weise Positionen am Chinazolin-Grundgerüst identifiziert, die zur Derivatisierung der LiPoLis genutzt wurden. Im Einzelnen handelte es sich dabei insb. um den hydrophoben Rest in 4-Position, welcher tief ins Innere der LP bindet, den Substituenten in 7- und 8-Position, die theoretisch Wechselwirkungen mit den polaren Aminosäure-Seitenketten in der Peripherie der Tasche ausbilden könnten, und die Dekoration des 2-Phenylrings mit solvatisierenden Gruppen, die an die Lösungsmittel-exponierte *para*-Position eingebracht werden sollten. Die Generierung einer fokussierten Substanzbibliothek erfolgte nach Aufstellen und Optimierung einer allgemeinen Syntheseroute, die final 49 Chinazolin-Derivate umfasste. Nachfolgend wurde die Charakterisierung der hergestellten Liganden mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden durchgeführt, um sie hinsichtlich der Affinität zu p38 α zu evaluieren. Dabei lag der Schwerpunkt hauptsächlich auf SPR-Messungen, die Vorteile bei der direkten Verfolgung der Interaktion in Echtzeit und der Berechnung kinetischer und thermodynamischer Parameter in Form von Geschwindigkeits- und Dissoziationskonstanten anhand der detektierten Sensorgramme boten. Darüber hinaus wurden TSA, MST und BLI als orthogonale Methoden hinzugezogen, wobei sich anhand der erhaltenen Ergebnisse jeweils übereinstimmend zeigte, dass die Liganden unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine lediglich geringe Affinität gegenüber der Zielkinase aufwiesen und dadurch für den Einsatz als Sondenmoleküle nicht geeignet sind.

Dennoch konnte das initiale Design der LiPoLis durch erfolgreiche Ko-Kristallisation von insgesamt acht Derivaten im Komplex mit p38 α bestätigt werden, zu denen jeweils vier Derivate, die in 4-Position mit unterschiedlich großen Substituenten modifiziert wurden (**3d,e,h,l**), und vier Liganden, die in 2-Position Löslichkeits-vermittelnde Gruppen bzw. eine Biotin-Markierung trugen (**3n,o,t,u**), zählen. Anhand der Strukturen konnte der postulierte Bindungsmodus validiert werden, indem in allen Fällen die Beibehaltung der charakteristischen Interaktionen der Parentalsubstanz **3a** innerhalb der LP festgestellt wurde. Außerdem wurde eine gewisse konformative Flexibilität in Form einer in Abhängigkeit der gebundenen LiPoLis unterschiedlich ausgeprägten Öffnung der Tasche beobachtet, die im zellulären Kontext bspw. eine Funktion bei der Rekrutierung

von molekularen Wechselwirkungspartnern nahelegt. Ferner ließen sich mit Hilfe der erhaltenen Kristallstrukturen tolerierte Substitutionsmuster, die weiterhin eine Bindung der LP erlauben sowie potentielle Anhaltspunkte für das Design einer zukünftigen weiteren Generation Chinazolin-basierter (oder verwandter) Substanzen mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Affinität gegenüber p38 α ableiten. Innerhalb dieser Arbeit wurde zur Optimierung der Liganden in diesem Zusammenhang jedoch auf eine alternative Strategie zurückgegriffen. In einem chemisch-genetischen Ansatz sollten eine kovalente Adressierung der Kinase und die Maximierung der Verweildauer der LiPoLis in der LP realisiert werden.

Zur Umsetzung dieses Konzepts wurden auf Grundlage der gelösten Kristallstrukturen zunächst Positionen in der direkten Umgebung der Tasche identifiziert, an denen die Mutation von Aminosäuren zu Cysteinen erfolgen könnte, um eine Reaktion der Thiol(at)-Seitenketten mit entsprechenden, Elektrophil-dekorierten Liganden zu ermöglichen. Hierfür wurden durch ortsgerichtete Mutagenese und anschließender Expression insgesamt vier verschiedene p38 α -Varianten (p38 α K249C, S251C, S252C, D294C) generiert. Nach Aktivierung mit MKK6 erfolgte eine Charakterisierung der Mutanten mittels HTRF hinsichtlich der kinetischen Parameter ATP- und Substrat-K_m im Vergleich mit dem WT zur Sicherstellung der strukturellen und funktionellen Integrität nach Einführung der artifiziellen Aminosäuren. In Bezug auf die entworfenen Proteine wurden die Planung von geeigneten Syntheserouten und die Herstellung einer fokussierten Substanzbibliothek an Elektrophil-tragenden LiPoLis und einiger reversibler Gegenstücke verwirklicht. Dabei fand die Einführung von Michael-Akzeptor-Systemen in Form diverser Acylamide und Alkylketone an 7- und 8-Position des Chinazolin-Grundgerüsts sowie an *meta*- und *para*-Position am 2-Phenylring, statt, sodass insgesamt 14 Liganden erhalten wurden.

Die Identifikation spezifischer Protein-Ligand-Paare erfolgte daraufhin mittels MS-Experimenten, in denen sich neben charakteristischen Profile hinsichtlich der Reaktivität bestimmter Cysteine bzw. LiPoLis auch zwei selektiv zueinander passende Kombinationen aus Cystein-Mutanten und kovalenten LiPoLis (p38 α S251C und **78a**, p38 α S252C und **78b**) abzeichneten. Diese detektierten Addukte wurden weiterhin in Tandem-MS-Studien nach tryptischen Verdau analysiert, um das jeweilige artifizielle Cystein als tatsächliche Markierungsposition zu verifizieren. Am Beispiel von p38 α S251C konnte anhand der Massendifferenzen zwischen den theoretischen und den detektierten Peptidfragmenten die kovalente Bindung von **78a** an Cys251 eindeutig

nachgewiesen werden. Zur weiteren Validierung der synthetisierten Substanzbibliothek wurden Ko-Kristallisationen aller möglichen Kombinationen an p38 α -Mutanten und LiPoLis angesetzt, aus denen im Einklang mit den vorherigen Beobachtungen nur für zwei bestimmte Paare reproduzierbare Kristalle hervorgingen. Dabei handelte es sich um die zuvor identifizierten Kombinationen, deren Komplexstrukturen erfolgreich gelöst werden konnten und überzeugenderweise einen charakteristischen Bindungsmodus unter Beibehaltung der bereits für die reversiblen Liganden festgestellten Interaktionen innerhalb der LP offenbarten. Außerdem konnten zusätzliche Wechselwirkungen der Carbonylgruppen der jeweiligen Michael-Akzeptoren zum Proteinerückgrat sowie insb. eine anhand der Elektronendichte deutlich definierte kovalente Bindung zu den artifiziellen Cysteinen konstatiert und somit der Erfolg des postulierten chemisch-genetischen Ansatzes anschaulich bestätigt werden.

In Übereinstimmung mit einigen Hypothesen zur biologischen Relevanz der LP, die eine Beteiligung in der Feinregulierung der Kinaseaktivität nahelegen, wurde im Rahmen Aktivitäts-basierter HTRF[®]-Messungen eine Inhibition von p38 α S252C in Gegenwart von **78b** (IC₅₀ = 3.5 μ M) detektiert. Ein solcher Zusammenhang ließe sich mit Hilfe der identifizierten kovalenten LiPoLis als geeignete Sondenmoleküle in zellulären Systemen näher untersuchen. Darüber hinaus könnte bspw. die Lokalisation von p38 α in Gegenwart und Abwesenheit der Liganden oder der Nachweis von PPIs über vergleichende *cross-linking*- und *pull-down*-Methoden als zukünftige Anwendungsmöglichkeiten erfolgen.

Mit Hilfe der Ergebnisse aus umfangreichen Vorarbeiten zu reversiblen LiPoLis, die eine geringe Affinität gegenüber der adressierten MAPK p38 α aufwiesen, konnte ein neuartiger chemisch-genetischer Ansatz konzipiert und erfolgreich umgesetzt werden. Dieser umfasste die Generierung von Cystein-tragenden Varianten der Kinase und die Synthese dazu passender Elektrophil-dekorierter Chinazoline. In MS- und Ko-Kristallisationsexperimenten konnte die Identifikation zweier spezifischer Protein-Ligand-Paare sowie die tatsächliche Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den LiPoLis und den in der Peripherie der LP befindlichen, artifiziellen Cysteinen eindrucksvoll demonstriert werden.

Mit der auf diese Weise erzielten maximalen Affinität gegenüber (bzw. Verweildauer an) den entsprechenden Mutanten können die generierten Liganden zukünftig als geeignete Sondenmoleküle bspw. in zellulären Studien eingesetzt werden. Die chemische Perturbation von solchen biologischen Systemen könnte einen maßgeblichen Beitrag zur Aufklärung der nicht vollständig ergründeten, physiologischen Funktion der LP in p38 α und dem Verständnis nicht-katalytischer Kinasefunktionen leisten.

Der Erfolg dieses Ansatzes wurde u.a. auch durch die umfassenden strukturbiologischen Untersuchungen ermöglicht, wobei die Proteinkristallographie als leistungsfähige Methode eine detaillierte Einsicht in die molekularen Interaktionen innerhalb von Liganden-gebundenen Komplexen gewährleisten und somit wertvolle Information zur Beantwortung verschiedener chemisch-biologischer Fragestellungen bereitstellen kann. In weiteren zahlreichen Beispielen wurde in dieser Arbeit die tragende Rolle von Kristallisationsstudien anhand von p38 α dargelegt.

Beispielsweise wurden strukturell besondere Typ I $\frac{1}{2}$ -Inhibitoren identifiziert, die in der Lage sind, stabilisierend mit dem *R-Spine* der Kinase zu interagieren, was mit einer signifikant verlängerten Verweildauer der Liganden am Enzym korreliert werden konnte. Weiterhin gelang die Verifizierung algorithmisch vorhergesagter Halogen-Bindungen mit Hilfe erfolgreich gelöster Ko-Kristallstrukturen, aus denen die postulierte Interaktion eindeutig hervorging. Strukturbiologische Untersuchungen dienten zudem zur Charakterisierung von neuartigen Kinaseinhibitoren und deren Bindungsmodi, die eine Interpretation entsprechender SAR-Profile zuließen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Material und Methoden

7.1.1 Vorbemerkungen

Sämtliche für die Durchführung der beschriebenen Experimente genutzten Geräte und Instrumente sind in den nachfolgenden Listen aufgeführt. Wenn nicht anderes erwähnt, wurden Reagenzien und Lösungsmittel von Acros, Alfa Aesar, Apollo Scientific, chemPUR, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden von kommerziellen Herstellern erhalten.

Die chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -Spektren sind in δ (ppm) als

- s (Singulett)
- d (Dublett)
- dd (Dublett von Dublett)
- t (Triplett)
- q (Quartett)
- m (Multiplett)
- bs (breites Singulett)

und im Bezug zum verbleibenden Signal des Lösungsmittels angegeben:

- DMSO- d_6 (2.50) oder CDCl_3 (7.26) für ^1H
- DMSO- d_6 (39.52) oder CDCl_3 (77.16) für ^{13}C

Die Identität von Substanzen wurde weiterhin mittels LCMS- und HRMS-Analyse bestätigt. Reinigung von Substanzen erfolgte über analytische Dünnschichtchromatographie (DC), Säulenchromatographie an Kieselgel, automatisierte *Flash*-Chromatographie oder preparativer HPLC.

7.1.2 Instrumente und Geräte

INSTRUMENT/GERÄT	MODELL, HERSTELLER
Feinwaage	Cubis® MSU125P-100-DI, Sartorius
<i>Flash</i> -Chromatographie-System	Isolera™ ONE, Biotage
HPLC, preparativ	Varian ProStar 215, Agilent
HRMS	Finnigan LCQ Advantage MAX (1200 series), Agilent
LCMS-1	LCQ Fleet™, Thermo Fisher Scientific
LCMS-2	Thermo LTQ Orbitrap Velos, Thermo Electron
NanoTemper (MST)	Monolith NT.115, NanoTemper Technologies
NMR-1	Avance DRX 400, Bruker
NMR-2	Avance DRX 500, Bruker
Mikrotiterplatten-Lesegerät	EnVision™, Perkin Elmer
Octet (BLI)	Octet RED96, Pall ForteBio
pH-Meter	SevenCompact, Mettler Toledo
<i>Real-Time</i> Thermocycler (TSA)	LightCycler® 480 II, Roche
Spektralphotometer für Mikrovolumen	NanoDrop™ 2000c
Schüttler für Mikrotiterplatten	Titramax 100, Heidolph
SPR	SPR-2/4, Sierra Sensors
Thermocycler	ThermoMixer C, Eppendorf
Tischzentrifuge-1	Centrifuge 5415 R, Eppendorf
Tischzentrifuge-2	Centrifuge 5424 R, Eppendorf
Ultraschallbad	Sonorex, Bandelin
Waage, analytische	M-Pact AX224, Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R, Eppendorf

7.1.3 (Verbrauchs-)Materialien

MATERIAL	BEZUGSQUELLE
ATF2-GST-Substratpeptid	Lot#: 0007, New England Biolabs
anti-GST-XL665 Ab	Lot#: 08A, Cisbio
anti-phospho-ATF2 Ab	Lot#: 05G, Cisbio
BLI-Messplatten	96-well, Pall ForteBio
BLI-Streptavidin-Biosensoren	Dip and Read™ SAX, Pall ForteBio
DC, analytisch	Kieselgel 60 F245, Aluminium-versehen, Merck
Dialysekassetten	Slide-A-Lyzer™, 10.000 MW Ausschlussgrenze, Thermo
EZ-Link™ Biotinylierungs-Kit	#21435, Thermo
His ₆ -Peptid	#3310-205, MBL
Kristallisationsplatten und Deckel	EasyXtal 15-well Tool und X-Seal, Qiagen
Säulen für Chromatographie- gestützte Instrumente:	
- <i>Flash</i> -Chromatographie	SNAP und SNAP Ultra (verschiedene Größen), Biotage
- HPLC, preparativ	VP 250/21 Nucleosil C18 PPN, Macherey-Nagel
- LCMS-1	EC 50/2 Nucleodur C18, 1.8 µm, Macherey-Nagel
- LCMS-2	Hypersil GOLD™, Thermo Electron
- HRMS	Eclipse XDB-C18, 5 µM, 150 × 1.6 mm, Phenomenex

MATERIAL	BEZUGSQUELLE
Silicagel-1	40-70 µm Partikelgröße, Baker
Silicagel-2	Normasil 60, 40-63 µm, VWR Prolabo
NeutrAvidin	#31000, Thermo
MKK6 S207E/T211E	Lot#: 877061F, Thermo
Mikropipetten und Spitzen	Eppendorf
Mikrotiterplatten	Bio-one, schwarz, 386-well, flach, Greiner
MST-Premium-Kapillaren	MO-K005, NanoTemper
MST-Proteinmarkierungs-Kit	MO-L004, NanoTemper
Platten für SPR	96-well, U-bottom, Eppendorf
Reaktionsgefäße	0.5-5 mL, Eppendorf
SPR-Acetatpuffer	10 mM NaOAc (pH 4.5 - 6.0), Sierra Sensors
SPR-Aminkupplungs-Kit	EDC, NHS, Sierra Sensors
SPR-Probenröhrchen	0.8 mL, PP, 7 × 41 mm Gilson
SPR-Probenröhrchen-Verschluss	8 mm, PE, Thermo
SPR-Sensoren	HCA-Sensoren, Sierra Sensors
SYPRO® Orange	5000x Stammlösung in DMSO, Sigma
TSA-Messplatten	TW-MT, weiß, 96-well, Biozym

7.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

7.2.1 Synthese von reversiblen LiPoLis

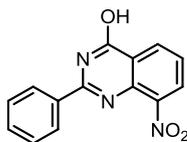
7.2.1.1 Aufbau des Chinazolin-Grundgerüsts

Allgemeine Vorschrift A1 für die Kondensation von Anthranilamiden mit Benzaldehyden. Anthranilamide (1 eq), NaHSO₃ (1.2 eq) und Benzaldehyd-Bausteine (1 eq) wurden in DMAc gelöst und die Reaktionsmischung für 30 min bei rt gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von *p*TsOH (0.1 eq) und weiteres Rühren für 18 h bei 155 °C. Nach Beendigung der Reaktion und Verdampfen des Lösungsmittels wurde der erhaltene Rückstand in DCM aufgenommen, mit gesättigtem NaHCO₃(aq) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt, um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

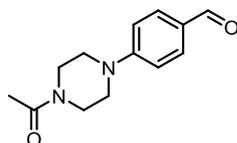
Synthese von 7-Nitro-2-phenylchinazolin-4-ol (5a)



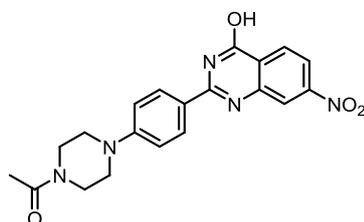
Zu einer Lösung von 4-Nitroanthranilsäure **4a** (5 g, 1 eq, 27.45 mmol) in 2-Methoxyethanol (250 mL) und AcOH (3 mL) wurde Benzamidin-Hydrochlorid-Hydrat (13.2 g, 4 eq, 109.8 mmol) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 18 h bei 130 °C gerührt. Danach wurde die nach warme Lösung filtriert und der Filterkuchen mit kaltem MeOH gewaschen, um die Zielsubstanz **5a** (1.8 g, 24 %) als hellbraunen Feststoff zu erhalten. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.93 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.36 (d, 1H), 8.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.24 – 8.20 (m, 2H), 7.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.3, 154.5, 151.3, 149.1, 132.1, 131.9, 128.6, 128.1, 128.0, 125.3, 122.4, 112.0; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₄H₁₀O₃N₃ [M+H]⁺: 268.07167; gefunden: 268.07159.

Synthese von 8-Nitro-2-phenylchinazolin-4-ol (5e)

Benzoessäureanhydrid (1.55 g, 2 eq, 6.9 mmol) wurde bei 40 °C geschmolzen, bevor die Zugabe von 3-Nitroanthranilsäure **4c** (500 mg, 1 eq, 2.8 mmol) und Formamid (1.1 mL, 10 eq, 27.5 mmol) erfolgte. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für 5 min bei 200 °C in einem Mikrowellen-Reaktor erhitzt und anschließend auf kaltes MeOH gegeben. Nach Rühren für 15 min wurde das entstandene Präzipitat abfiltriert und mit MeOH und Wasser gewaschen, um die Zielsubstanz **5e** (268 mg, 37 %) als hellbraunen Feststoff zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.93 (s, 1H), 8.38 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 8.31 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 8.18 – 8.13 (m, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 2H), 7.60 – 7.54 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.0, 154.7, 146.7, 140.6, 132.2, 132.0, 129.7, 128.8, 128.2, 128.2, 126.0, 122.5.

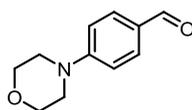
Synthese von 4-(4-Acetylpiperazin-1-yl)benzaldehyd (11b) und 1-(4-(4-(4-Hydroxy-7-nitrochinazolin-2-yl)phenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on (5d)

4-Fluorobenzaldehyd **10** (619 µL, 1.5 eq, 5.85 mmol), 1-Acetylpiperazin (500 µL, 1 eq 3.90 mmol) und Na₂CO₃ (620 mg, 1.5 eq, 5.85 mmol) wurden in Wasser (25 mL) gelöst und für 20 h bei 100 °C unter Rückfluss gerührt. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Extraktion mit DCM und Konzentration der vereinigten organischen Phasen. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (3 % MeOH/DCM) lieferte die Zielsubstanz **11b** (942 mg, 58 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.73 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.65 – 3.54 (m, 4H), 3.50 – 3.44 (m, 2H), 3.42 – 3.36 (m, 2H), 2.04 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 190.2, 168.42, 154.3, 131.4, 126.4, 113.2, 46.3, 46.0, 44.9, 40.3, 21.1; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₃H₁₇N₂O₂ [M+H]⁺: 233.12845; gefunden: 233.12871.

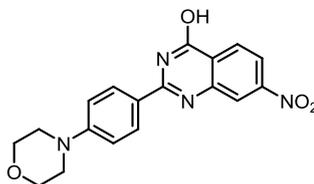


4-Nitroanthranilamid **4b** (1 g, 5.5 mmol) wurde gemäß Vorschrift **A1** mit NaHSO_3 (690 mg, 6.6 mmol), Aldehyd **11b** (1.3 g, 5.6 mmol) and *p*TsOH (100 mg, 0.5 mmol) in DMAc (50 mL) umgesetzt. Reinigung über automatisierte Säulenchromatographie (0 % → 2 % MeOH/DCM) lieferte die Zielsubstanz **5d** (390 mg, 18 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.58 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.12 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.67 – 3.54 (m, 4H), 3.43 – 3.38 (m, 2H), 3.34 – 3.29 (m, 2H), 2.05 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168.4, 154.1, 152.8, 151.3, 129.3, 128.1, 120.5, 119.0, 113.7, 46.8, 46.5, 45.0, 40.4, 21.2; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 393.15098; gefunden: 393.15035.

Synthese von 4-Morpholinobenzaldehyd (11a) und 2-(4-Morpholinophenyl)-7-nitrochinazolin-4-ol (5c)



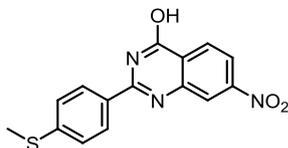
4-Fluorobenzaldehyd **10** (1.8 mL, 1.5 eq, 17.24 mmol), Morpholin (1 mL, 1 eq, 11.49 mmol) und Na_2CO_3 (1.83 g, 1.5 eq, 17.24 mmol) wurden in Wasser (40 mL) gelöst und für 20 h bei 100 °C unter Rückfluss gerührt. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Extraktion mit DCM und Konzentration der vereinigten organischen Phasen. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (20 % EtOAc/PE) lieferte die Zielsubstanz **11a** (2.36 g, 55 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.85 (s, 1H), 7.78 – 7.64 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.32 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 191.0, 154.9, 131.7, 126.7, 118.3, 65.8, 46.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 192.10191; gefunden: 192.10186.



4-Nitroanthranilamid **4b** (2.2 g, 12.1 mmol) wurde gemäß Vorschrift **A1** mit NaHSO_3 (1.5 g, 14.4 mmol), Aldehyd **11a** (2.3 g, 12.1 mmol) and *p*TsOH (230 mg, 1.2 mmol) in DMAc (50 mL) umgesetzt. Reinigung über automatisierte Säulenchromatographie (0 % → 2 % MeOH/DCM) lieferte die Zielsubstanz **5c** (430 mg, 10 %). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.60 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.29 (dd, $J = 8.7, 1.5$ Hz, 1H), 8.17 – 8.09 (m, 3H), 7.05 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.73 (s, 4H), 3.28 (s, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz,

DMSO- d_6) δ 153.4, 151.4, 129.3, 128.2, 120.8, 119.1, 115.9, 115.7, 113.6, 65.9, 47.0;
HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₈H₁₇O₄N₄ [M+H]⁺: 353.12443; gefunden: 333.12444.

Synthese von 2-(4-(Methylthio)phenyl)-7-nitrochinazolin-4-ol (**5b**)



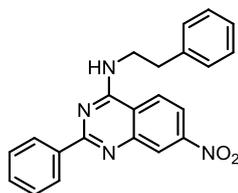
4-Nitroanthranilamid **4b** (400 mg, 2.2 mmol) wurde gemäß Vorschrift **A1** mit NaHSO₃ (270 mg, 2.6 mmol), 4-(Methylthio)benzaldehyd **9** (420 mg, 2.2 mmol) and *p*TsOH (40 mg, 0.2 mmol) in DMAc (5 mL) umgesetzt. Die Zielsubstanz **5b** (235 mg, 34 %) wurde als gelber Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung weiterverwendet. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.85 (s, 1H), 8.40 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 2.56 (s, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.41, 153.99, 151.37, 149.28, 146.85, 144.03, 128.36, 128.19, 127.91, 125.25, 125.10, 122.30, 119.85, 14.04; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₁₅H₁₂O₃N₃S [M+H]⁺: 314.05939; gefunden: 314.05934.

7.2.1.2 Substitution an 4-Hydroxychinazolinen

Allgemeine Vorschrift **B1** für die Aktivierung von 4-Hydroxychinazolinen mit SOCl₂ und anschließende nukleophile aromatische Substitution. 4-Hydroxychinazoline (1 eq) wurden in SOCl₂ und DMF (kat.) gelöst und die Reaktionsmischung für 4 h bei 80 °C unter Rückfluss gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel verdampft, der Rückstand in DCM/*i*PrOH (3:2) aufgenommen und abschließend der Amin-Baustein (1.5 eq) und DIPEA (2 eq) hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für weitere 19 h bei rt gerührt, mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel oder Umkristallisation in MeOH gereinigt, um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

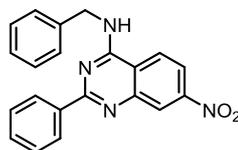
Allgemeine Vorschrift **B2** für die Aktivierung von 4-Hydroxychinazolinen mit HCCP und anschließende nukleophile aromatische Substitution. 4-Hydroxychinazoline (1 eq) und HCCP (1 eq) wurden in MeCN und DIPEA (5 eq) gelöst und die Reaktionsmischung für 1 h bei rt gerührt. Nach Zugabe vom Amin-Baustein (6 eq) wurde für weitere 18 h bei rt gerührt und das Rohprodukt nach Verdampfen des Lösungsmittels durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt, um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

Synthese von 7-Nitro-N-phenethyl-2-phenylchinazolin-4-amin (**6a**)

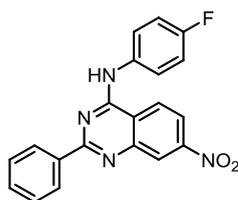


4-Hydroxychinazolin **5a** (350 mg, 1.22 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 1 % MeOH/DCM), um die Zielsubstanz **6a** (390 mg, 86 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (s, 1H), 8.51 (s, 2H), 8.48 – 8.40 (m, 2H), 8.19 (s, 1H), 7.53 (s, 3H), 7.38 – 7.25 (m, 4H), 7.21 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.07 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ 161.1, 159.3, 149.8, 139.4, 137.7, 130.7, 128.7, 128.4, 128.3, 128.3, 128.3, 128.1, 126.1, 125.1, 122.7, 118.4, 117.4, 42.5, 34.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371.15025, gefunden: 371.15028.

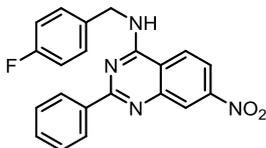
Synthese von N-Benzyl-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (**6c**)



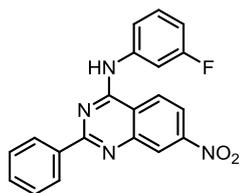
4-Hydroxychinazolin **5a** (200 mg, 0.75 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B1** umgesetzt und die Zielsubstanz **6c** (211 mg, 79 %) nach Umkristallisation in MeOH in reiner Form erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.32 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.48 – 8.42 (m, 3H), 8.22 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H), 7.55 – 7.42 (m, 5H), 7.39 – 7.28 (m, 2H), 7.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.94 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161.2, 159.3, 150.1, 139.1, 137.7, 131.0, 128.3, 128.3, 128.1, 127.5, 125.2, 122.8, 118.5, 117.4, 44.1; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 357.13460; gefunden: 357.13446.

Synthese von *N*-(4-Fluorophenyl)-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (6f)

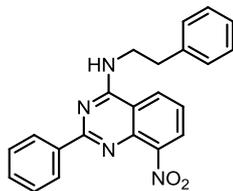
4-Hydroxychinazolin **5a** (240 mg, 0.89 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B1** umgesetzt und die Zielsubstanz **6f** (213 mg, 66 %) nach Umkristallisation in MeOH in reiner Form erhalten. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.22 (s, 1H), 8.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.45 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.42 – 8.36 (m, 2H), 8.24 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 7.94 – 7.83 (m, 2H), 7.54 – 7.46 (m, 3H), 7.29 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.05, 158.42 (d, $J = 240.7$ Hz), 157.75, 150.64, 150.05, 137.82, 136.64, 130.71, 128.43, 128.11, 125.71, 124.65 (d, $J = 8.0$ Hz), 122.68, 118.72, 118.53, 115.06 (d, $J = 22.2$ Hz); **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 361.10953; gefunden: 361.10963.

Synthese von *N*-(4-Fluorobenzyl)-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (6h)

4-Hydroxychinazolin **5a** (200 mg, 0.75 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (5 % → 12 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **6h** (265 mg, 95 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.33 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.46 (m, 3H), 8.22 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 7.60 – 7.45 (m, 5H), 7.16 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.91 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.28 (d, $J = 242.4$ Hz), 161.13, 159.28, 150.14, 137.68, 135.33, 130.79, 129.51 (d, $J = 8.1$ Hz), 128.40, 128.14, 125.24, 122.89, 118.65, 117.45, 115.14 (d, $J = 21.3$ Hz), 43.42; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 375.12518; gefunden: 375.12529.

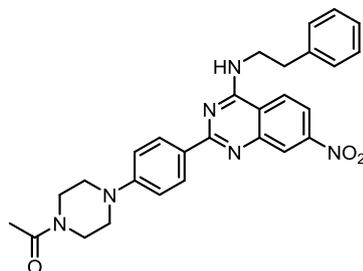
Synthese von N-(3-Fluorophenyl)-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (6g)

4-Hydroxychinazolin **5a** (240 mg, 0.89 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B1** umgesetzt und die Zielsubstanz **6g** (233 mg, 72 %) nach Umkristallisation in MeOH in reiner Form erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.27 (s, 1H), 8.78 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.53 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.45 – 8.38 (m, 2H), 8.34 – 8.24 (m, 1H), 7.96 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.58 – 7.23 (m, 4H), 7.10 – 7.02 (m, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161.95 (d, $J = 241.4$ Hz), 160.85, 157.63, 150.54, 150.31, 140.51 (d, $J = 11.1$ Hz), 137.34, 131.00, 130.08 (d, $J = 9.5$ Hz), 128.55, 128.06, 125.58, 123.09, 119.10, 117.91, 117.55, 110.57 (d, $J = 21.0$ Hz), 109.02 (d, $J = 26.2$ Hz); **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 361.10953; gefunden: 361.11130.

Synthese von 8-Nitro-N-phenethyl-2-phenylchinazolin-4-amin (6p)

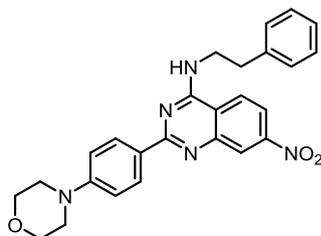
4-Hydroxychinazolin **5e** (200 mg, 0.75 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (30 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **6p** (324 mg, 87 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.46 – 8.42 (m, 2H), 8.24 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.55 – 7.51 (m, 3H), 7.35 – 7.29 (m, 4H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 3.93 (dd, $J = 14.1, 6.3$ Hz, 2H), 3.08 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.0, 159.2, 147.0, 141.9, 139.4, 137.7, 131.0, 128.8, 128.5, 128.5, 128.2, 126.7, 126.5, 126.2, 124.2, 114.9, 42.6, 34.4; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371.15025; gefunden: 371.15018.

Synthese von 1-(4-(4-(7-Nitro-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on (6o)

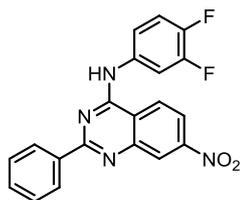


4-Hydroxychinazolin **5d** (366 mg, 0.74 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 10 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **6o** (329 mg, 69 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.73 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 8.47 - 8.33 (m, 4H), 8.12 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 4.4 Hz, 4H), 7.27 - 7.17 (m, 1H), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 3.88 (dd, J = 14.3, 6.1 Hz, 2H), 3.61 (s, 4H), 3.34 (dd, J = 10.1, 5.3 Hz, 2H), 3.30 - 3.27 (m, 2H), 3.10 - 3.02 (m, 2H), 2.06 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 168.3, 161.3, 159.0, 152.3, 150.8, 150.3, 150.0, 139.4, 129.4, 128.7, 128.4, 127.8, 126.1, 125.0, 122.4, 117.5, 117.2, 114.2, 47.4, 47.1, 45.2, 42.5, 40.5, 34.3, 21.1; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 497.22957; gefunden: 497.22855.

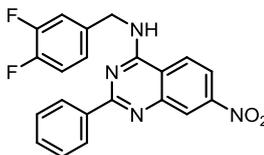
Synthese von 2-(4-Morpholinophenyl)-7-nitro-N-phenethylchinazolin-4-amin (6n)



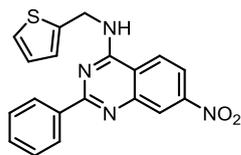
4-Hydroxychinazolin **5c** (490 mg, 1.22 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 10 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **6n** (268 mg, 48 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.89 - 8.71 (m, J = 5.0 Hz, 1H), 8.52 - 8.35 (m, 4H), 8.15 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 4.3 Hz, 4H), 7.27 - 7.16 (m, J = 8.6, 4.3 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 3.96 - 3.84 (m, J = 13.0, 6.7 Hz, 2H), 3.77 (t, J = 4.0 Hz, 4H), 3.30 - 3.21 (m, J = 4.3 Hz, 4H), 3.06 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162.2, 158.5, 153.7, 150.9, 140.4, 130.3, 130.2, 129.8, 129.4, 129.1, 128.8, 127.0, 125.9, 123.3, 114.7, 66.9, 48.4, 43.4, 35.2; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 456.20302; gefunden: 456.20230.

Synthese von N-(3,4-Difluorphenyl)-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (6i)

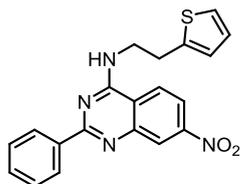
4-Hydroxychinazolin **5a** (150 mg, 0.56 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (1 % → 20 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **6i** (114 mg, 56 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.25 (s, 1H), 8.72 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.37 (m, 2H), 8.28 (dd, $J = 9.0$ Hz, 2.2 Hz, 1H), 8.11 (ddd, $J = 13.2$ Hz, 7.5 Hz, 2.5 Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.53 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160.7, 157.5, 150.3, 150.2, 137.1, 135.7, 135.6, 131.0, 128.5, 128.0, 125.4, 122.9, 119.0, 118.7, 117.3, 117.2, 117.0, 111.4 (d, $J = 21.5$ Hz); **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 379.10011; gefunden: 379.1013.

Synthese von N-(3,4-Difluorobenzyl)-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (6j)

4-Hydroxychinazolin **5a** (150 mg, 0.56 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (2 % → 20 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **6j** (141 mg, 64 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.30 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.53 (d, $J = 9.0$, 1H), 8.46 (m, 3H), 8.23 (dd, $J = 9.0$ Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.52 (m, 4H), 7.40 (dt, $J = 10.7$ Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.33 (m, 1H), 4.90 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 161.0, 159.3, 150.1, 150.1, 148.2, 137.6, 137.0, 130.7, 128.3, 128.1, 125.2, 124.1, 122.8, 118.6, 117.4, 117.2, 116.5, 116.4, 43.2; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 393.11576; gefunden: 393.11448.

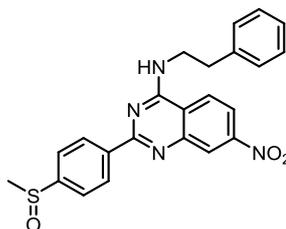
Synthese von 7-Nitro-2-phenyl-N-(thiophen-2-ylmethyl)chinazolin-4-amin (6d)

4-Hydroxychinazolin **5a** (150 mg, 0.56 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (1 % → 20 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **6d** (144 mg, 71 %) zu erhalten. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.52 (s, 1H), 8.58 (d, $J = 3.5$ Hz, 2H), 8.52 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.24 (dd, $J = 8.7$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.56 (s, 3H), 7.38 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.99 (m, 1H), 5.09 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.7, 159.8, 151.1, 142.4, 131.8, 129.3, 129.2, 127.4, 127.2, 126.4, 126.1, 123.5, 119.7, 118.2, 40.0; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₁₉H₁₅N₄O₂S [M+H]⁺: 363.09102; gefunden: 363.09115.

Synthese von 7-Nitro-2-phenyl-N-(2-(thiophen-2-yl)ethyl)chinazolin-4-amin (6e)

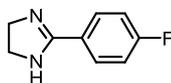
4-Hydroxychinazolin **5a** (150 mg, 0.56 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (10 % → 20 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **6e** (137 mg, 65 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.92 (s, 1H), 8.52 (dd, $J = 6.6$ Hz, 3.1 Hz, 2H), 8.48 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 8.22 (dd, $J = 8.9$ Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.34 (dd, $J = 4.9$ Hz, 1.3 Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 8.3$ Hz, 3.3 Hz, 2H), 3.94 (dd, $J = 12.8$ Hz, 7.0 Hz, 2H), 3.28 (s, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.1, 159.3, 150.1, 141.4, 139.2, 137.7, 130.7, 128.3, 128.1, 127.0, 125.3, 125.1, 124.2, 122.8, 118.5, 117.4, 42.6, 28.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₀H₁₇N₄O₂S [M+H]⁺: 377.10667; gefunden: 377.10703.

Synthese von 2-(4-(Methylsulfinyl)phenyl)-7-nitro-N-phenethylchinazolin-4-amin (6m)



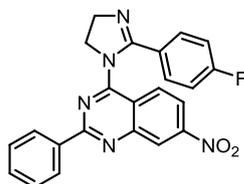
4-Hydroxychinazolin **5b** (400 mg, 1.27 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und das Rohprodukt nachfolgend ohne weitere Reinigung verwendet. Das entsprechende Chinazolin (500 mg, 1 eq, 1.20 mmol) wurde in DCM (10 mL) gelöst und unter Rühren bei 0 °C *m*CPBA (800 mg, 4 eq, 4.80 mmol) portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei rt gerührt, durch Zugabe von gesättigter NaHCO₃:NaS₂O₃ (1:1)-Lösung (10 mL) gestoppt und anschließend extrahiert. Der nach Konzentration der vereinigten organischen Phasen erhaltene Rückstand wurde in kaltem Wasser aufgenommen und die beschriebene Zielsubstanz **6m** (478 mg, 87 %) nach Filtration des Präzipitats erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.96 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.50 – 8.45 (m, 2H), 8.23 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.36 – 7.29 (m, 4H), 7.24 – 7.19 (m, 1H), 3.91 (dd, *J* = 14.1, 6.3 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.7, 159.4, 150.1, 149.8, 142.4, 142.3, 139.3, 128.7, 128.4, 127.1, 126.2, 125.2, 122.9, 119.1, 117.6, 43.5, 42.6, 34.3; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₃H₂₁N₄O₃S [M+H]⁺: 433.13289; gefunden: 433.13260.

Synthese von 2-(4-Fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol (13) und 4-(2-(4-Fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-2-phenylchinazolin (6k)



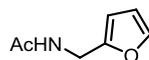
4-Fluorobenzaldehyd **10** (1.28 mL, 1 eq, 12.1 mmol) wurde in Ethylendiamin (1.1 mL, 1.3 eq, 15.72 mmol) und *t*BuOH gelöst und die Reaktionsmischung für 30 min bei rt gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von K₂CO₃ (2.5 g, 1.5 eq, 18.14 mmol) und I₂ (9.2 g, 3 eq, 36.28 mL) und weiteres Rühren für 3.5 h bei 70 °C. Die Reaktion wurde mit gesättigtem Na₂SO₃(aq) gestoppt und das Rohprodukt nach Extraktion mit gesättigter NaHCO₃(aq) und EtOAc sowie Konzentration der vereinigten organischen Phasen erhalten. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (4 % → 10 % MeOH/DCM → 6 % MeOH/DCM + 1 % NH₃(aq)) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **13** (1.1 g,

54 %) als weißen Feststoff. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.92 – 7.85 (m, 2H), 7.48 (br, 1H), 7.28 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.63 (s, 2H, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.4 (d, *J* = 247.7 Hz), 162.7, 129.6 (d, *J* = 8.8 Hz, 2C), 126.4 (d, *J* = 2.8 Hz), 115.2 (d, *J* = 21.7 Hz, 2C), 49.2; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₉H₁₀N₂F [M+H]⁺: 165.08225; gefunden: 165.08209.

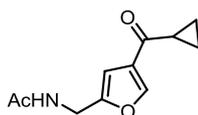


4-Hydroxychinazolin **5a** (150 mg, 0.56 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (20 % EtOAc/PE → 100 % EtOAc), um Zielsubstanz **6k** (137 mg, 65 %) zu erhalten. Abweichend zur allgemeinen Vorschrift wurde in der Reaktion K₂CO₃ (5 eq, 323 mg, 2.34 mmol) als Base verwendet. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.66 (m, 1H), 8.54 (m, 1H), 8.31 (m, 1H), 7.72 (m, 4H), 7.44 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 4.49 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.12 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3, 161.6, 160.3, 153.0, 151.4, 137.2, 132.1, 131.0, 130.9, 129.8, 129.2, 128.9, 128.7, 124.1, 120.3, 120.2, 116.1 (d, *J* = 22.0 Hz), 56.4, 54.1; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₀H₁₇N₄O₂S [M+H]⁺: 414.13608; gefunden: 414.13580.

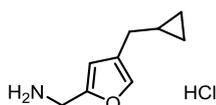
Synthese von (4-(Cyclopropylmethyl)furan-2-yl)methanamin-Hydrochlorid (14) und N-((4-(Cyclopropylmethyl)furan-2-yl)methyl)-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin-Hydrochlorid (6l)



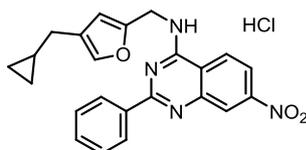
Furfurylamin **15** (920 μL, 1 eq, 10.4 mmol) wurde in Ac₂O (2.9 mL, 3 eq, 31 mmol), TEA (2.86 mL, 2 eq, 20.6 mmol) und DCM (50 mL) gelöst und die Reaktionsmischung für 19 h bei rt gerührt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (5 % → 50 % EtOAc/PE) gereinigt, um Zielsubstanz **16** (1.26 g, 88 %) zu erhalten. **¹H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 6.38 (dd, *J* = 3.1 Hz, 1.9 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.83 (s, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.0, 152.4, 142.0, 110.4, 106.7, 35.4, 22.4; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₇H₁₀NO₂ [M+H]⁺: 140.07061; gefunden: 140.07070.



Cyclopropanecarbonylchlorid **17** (850 μL , 1.3 eq, 9.35 mmol) und AlCl_3 (2.88 g, 3 eq, 21.57 mmol) wurden bei 0 °C in DCM (15 mL) gelöst und die Reaktionsmischung für 30 min bei rt gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Furan **16** (1 g, 1 eq, 7.19 mmol) und weiteres Rühren für 18 h bei rt. Die Reaktion wurde mit Wasser und EtOAc versetzt und das Rohprodukt nach Extraktion und Konzentration der vereinigten organischen Phasen erhalten. Säulenchromatographie an Kieselgel (1 % \rightarrow 2 % MeOH/DCM) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **18** (861 mg, 58 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.44 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.64 (tt, $J = 7.2, 5.4$ Hz, 1H), 1.86 (s, 3H), 1.07 – 0.88 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 187.4, 169.3, 157.8, 151.4, 119.5, 109.4, 35.7, 22.4, 16.6, 10.4; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 208.09682, gefunden: 208.09768.



Furan **18** (200 mg, 0.97 mmol) wurde in konzentrierter HCl (5 mL) für 20 h bei rt gerührt und das reduzierte Rohprodukt ohne weitere Reining in der nächsten Reaktion weiterverwendet. Hierfür wurde das entsprechende Furan (591 mg, 3.58 mmol) in TFA (11 mL) gelöst und unter Rühren tropfen TES (1.374 mL, 8.6 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 19 h bei rt gerührt und anschließend mit Wasser und kalter gesättigter $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ versetzt und anschließend mit EtOAc extrahiert. Das Rohprodukt wurde nach Konzentration der vereinigten organischen Phasen erhalten und Säulenchromatographie an Kieselgel (1 % \rightarrow 5 % MeOH/DCM) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **14** (620 mg, 92 %). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.28 (s, 3H), 6.41 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 6.14 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.66 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.17 (s, 1H), 2.63 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.73 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 156.1, 145.8, 110.9, 106.3, 45.0, 35.2, 31.4, 26.5, 24.8; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}^{35}\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 188.08367; gefunden: 188.08411, berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}^{37}\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 190.08072; gefunden: 190.08146.

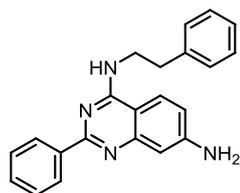


4-Hydroxychinazolin **5a** (180 mg, 0.67 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (25 % → 50 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **6l** (233 mg, 87 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.59 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.56 – 8.52 (m, 3H), 8.27 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H), 7.62 – 7.54 (m, 4H), 6.33 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.60 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.39 – 2.37 (m, 1H), 1.83 – 1.55 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 159.2, 154.6, 150.3, 145.8, 132.0, 128.7, 128.5, 128.3, 128.1, 125.5, 120.1, 117.3, 111.1, 108.4, 106.4, 106.0, 45.5, 31.9, 27.0, 25.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3^{35}\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 437.13749; gefunden: 437.13815, berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3^{37}\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 439.13454; gefunden: 439.13526.

7.2.1.3 Reduktion von 7- und 8-Nitrochinazolinen

Allgemeine Vorschrift C1 für die Reduktion von 7- und 8-Nitrochinazolinen mit 10 % Pd/C und Ammoniumformiat. Nitrochinazoline (1 eq), 10 % Pd/C (0.2 mol-%) und Ammoniumformiat (6 eq) wurden in EtOH gelöst und für 2 h bei 80 °C unter Rückfluss gerührt. Die noch warme Reaktionsmischung wurde über Celite® filtriert, der Filterkuchen mit MeOH, EtOAc und DCM gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt, um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

Allgemeine Vorschrift C2 für die Reduktion von 7- und 8-Nitrochinazolinen Eisen und NH_4Cl . Nitrochinazoline (1 eq), Eisen (5 eq) und NH_4Cl (8 eq) wurden in MeOH:H₂O (4:1) gelöst und die Reaktionsmischung für 3 h bei 80 °C unter Rückfluss gerührt. Die noch warme Reaktionsmischung wurde über Celite® filtriert, der Filterkuchen mit MeOH, EtOAc und DCM gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

Synthese von N⁴-Phenethyl-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (3a)

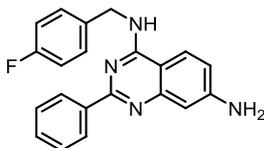
7-Nitrochinazolin **6a** (120 mg, 0.40 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (1 % → 2 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3a** (100 mg, 91 %) zu erhalten. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO) δ 8.42 (t, $J = 17.5$ Hz, 2H), 8.13 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 7.32 (d, $J = 4.3$ Hz, 4H), 7.21 (dt, $J = 8.7, 4.2$ Hz, 1H), 6.86 – 6.65 (m, 2H), 5.90 (s, 2H), 3.81 (dd, $J = 14.1, 6.2$ Hz, 2H), 3.09 – 2.94 (m, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 163.0, 159.0, 152.9, 139.7, 130.0, 128.7, 128.3, 128.1, 127.8, 126.0, 123.7, 115.7, 105.1, 104.2, 42.3, 35.0; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₂H₂₁N₄ [M+H]⁺: 341.17607; gefunden: 341.17618.

Synthese von N⁴-Benzyl-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (3c)

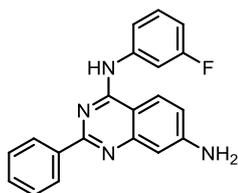
7-Nitrochinazolin **5c** (100 mg, 0.30 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (1 % → 10 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3c** (90 mg, 93 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.51 (s, $J = 40.7$ Hz, 1H), 8.40 – 8.33 (m, 2H), 7.98 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 7.44 (m, 5H), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.80 (dd, $J = 8.8, 1.9$ Hz, 1H), 6.78 – 6.75 (m, $J = 1.9$ Hz, 1H), 5.94 (s, 2H), 4.87 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.0, 158.8, 152.9, 140.3, 129.8, 128.2, 128.1, 127.7, 127.4, 126.6, 123.7, 116.0, 105.6, 104.3, 43.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₁H₁₉N₄ [M+H]⁺: 327.16042; gefunden: 327.16056.

Synthese von *N*-(4-Fluorophenyl)-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (3f)

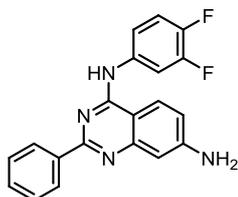
7-Nitrochinazolin **6f** (513 mg, 1.42 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (2 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3f** (264 mg, 56 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.48 (s, 1H), 8.43 – 8.29 (m, 2H), 8.19 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.01 – 7.82 (m, 2H), 7.55 – 7.39 (m, 3H), 7.35 – 7.19 (m, 2H), 6.90 (dd, $J = 8.9, 2.1$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.06 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 158.8, 158.0 (d, $J = 239.6$ Hz), 157.2, 153.2, 152.5, 138.7, 136.3, 129.9, 128.3, 127.7, 124.0, 123.6 (d, $J = 7.8$ Hz), 116.4, 115.0 (d, $J = 22.1$ Hz), 106.0, 104.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 331.13535; gefunden: 331.13574.

Synthese von *N*⁴-(4-Fluorobenzyl)-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (3h)

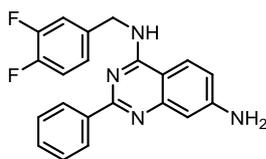
7-Nitrochinazolin **6h** (280 mg, 0.75 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0.5 % → 2 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3h** (157 mg, 61 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.46 (m, 1H), 8.42 – 8.34 (m, 2H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.59 – 7.29 (m, 5H), 7.14 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.79 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.83 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 161.1 (d, $J = 242.0$ Hz), 159.0, 158.9, 152.9, 138.8, 136.6, 129.8, 129.3 (d, $J = 8.1$ Hz), 128.1, 127.7, 123.7, 115.7, 115.0 (d, $J = 21.2$ Hz), 105.9, 104.5, 42.9; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 345.15100; gefunden: 345.15117.

Synthese von *N*⁴-(3-Fluorophenyl)-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (3g)

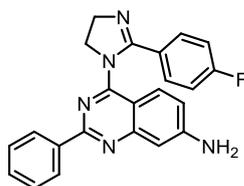
7-Nitrochinazolin **6g** (68 mg, 0.19 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (1 % → 5 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3g** (60 mg, 96 %) zu erhalten. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.67 (s, 1H), 8.45 – 8.32 (m, 2H), 8.24 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.60 – 7.47 (m, 3H), 7.46 – 7.39 (m, 1H), 6.92 (td, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.19 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.1 (d, *J* = 240.3 Hz), 158.6, 157.1, 153.5, 141.8 (d, *J* = 10.8 Hz), 130.1 (d, *J* = 18.66 Hz), 129.9, 128.4, 127.8, 124.2, 117.1, 116.7, 109.1 (d, *J* = 19.4 Hz), 108.1 (d, *J* = 25.4 Hz), 104.6; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₀H₁₆N₄F [M+H]⁺: 331.13535; gefunden: 331.13580.

Synthese von *N*⁴-(3,4-Difluorophenyl)-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (3i)

7-Nitrochinazolin **6i** (59 mg, 0.16 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 1 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3i** (36 mg, 66 %) zu erhalten. ¹H NMR (400.1 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.57 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 8.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.71 (m, 1H), 7.48 (m, 4H), 6.92 (dd, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.11 (s, 2H); ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.6, 157.7, 154.1, 163.6, 139.6, 138.1, 138.0, 130.8, 129.2, 128.5, 124.7, 118.3, 117.9, 117.8, 117.4, 111.1 (d, *J* = 21.6 Hz), 107.0, 105.5; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₀H₁₅N₄F₂ [M+H]⁺: 349.12593; gefunden: 349.12594.

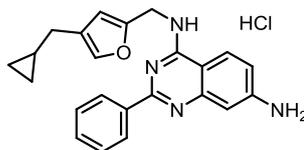
Synthese von *N*⁴-(3,4-Difluorobenzyl)-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (3j)

7-Nitrochinazolin **6j** (53 mg, 0.13 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 10 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3j** (35 mg, 72 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.49 (s, 1H), 8.36 (dd, *J* = 6.6 Hz, 3.0 Hz, 2H), 8.14 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.45 (m, 4H), 7.37 (dd, *J* = 19.2 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 6.82 (dd, *J* = 8.8 Hz, 1.7 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.94 (s, 2H), 4.82 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.2, 158.9, 158.8, 153.0, 138.5, 138.4, 129.9, 128.2, 127.8, 124.0, 123.8, 117.4, 117.2, 116.4, 116.2, 115.9, 105.6, 104.3, 42.8; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₁H₁₇N₄F₂ [M+H]⁺: 363.14158; gefunden: 363.14154.

Synthese von 4-(2-(4-Fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl)-2-phenylchinazolin-7-amin (3k)

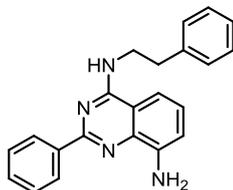
7-Nitrochinazolin **6k** (80 mg, 0.20 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 1 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3k** (61 mg, 81 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.91 (m, 1H), 7.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.61 (dd, *J* = 8.6 Hz, 5.6 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 14.3 Hz, 6.6 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.99 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.1 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.30 (s, 2H), 4.27 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.04 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.6, 161.7, 160.7, 157.8, 154.5, 153.8, 137.8, 129.9, 129.7, 129.7, 127.9, 127.3, 126.2, 117.7, 115.1, 115.0, 114.9, 114.8, 107.9, 105.1, 55.1, 53.3; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₃H₁₉N₅F [M+H]⁺: 384.16190; gefunden: 384.16173.

Synthese von *N*⁴-((4-(Cyclopropylmethyl)furan-2-yl)methyl)-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (3l**)**



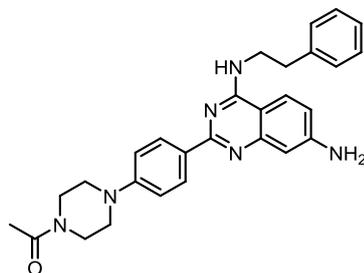
7-Nitrochinazolin **6l** (135 mg, 0.31 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0.5 % → 5 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3l** (99 mg, 87 %) zu erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.46 (dd, *J* = 17.5, 6.8 Hz, 2H), 7.95 (dd, *J* = 25.3, 8.7 Hz, 1H), 7.58 – 7.39 (m, 3H), 6.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.22 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 5.87 (br, 1H), 4.76 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.63 – 3.57 (m, 2H), 2.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.40 – 2.37 (m, 1H), 1.79 – 1.62 (m, 4H); **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.3, 154.6, 151.9, 139.8, 130.1, 128.6, 128.3, 124.2, 116.2, 108.0, 106.3, 45.5, 40.5, 31.9, 27.1, 25.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₃H₂₄N₄OCl [M+H]⁺: 407.16332 and 409.16037; gefunden: 407.16399 and 409.16100.

Synthese von *N*⁴-Phenethyl-2-phenylchinazolin-4,8-diamin (3p**)**



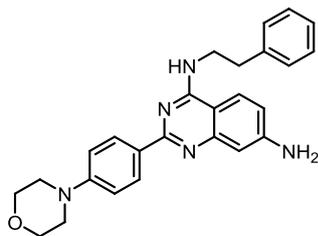
8-Nitrochinazolin **5e** (370 mg, 1.00 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (25 % → 35 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **3p** (271 mg, 80 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.11 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.55 – 7.42 (m, 3H), 7.35 – 7.30 (m, 4H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 7.16 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.88 (s, 2H), 3.87 (dd, *J* = 13.7, 6.7 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.5, 156.4, 144.8, 139.7, 138.9, 138.4, 129.6, 128.7, 128.4, 128.1, 127.7, 126.0, 125.8, 113.8, 112.0, 108.0, 42.4, 34.7; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₂H₂₁N₄ [M+H]⁺: 341.17607; gefunden: 341.17608.

Synthese von 1-(4-(4-(7-Amino-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on (3o)

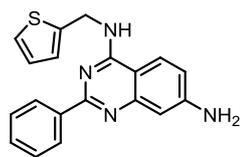


7-Nitrochinazolin **6o** (268 mg, 0.54 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (2 % → 10 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3o** (147 mg, 58 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.26 (s, 1H), 9.60 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.32 (t, *J* = 15.3 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 4.4 Hz, 4H), 7.23 – 7.17 (m, 1H), 7.11 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 3.91 (dt, *J* = 13.9, 6.4 Hz, 2H), 3.64 – 3.58 (m, 4H), 3.47 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.40 (s, 2H), 3.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.4, 158.5, 155.7, 155.1, 153.5, 141.2, 139.0, 130.4, 128.7, 128.4, 126.2, 125.3, 119.2, 116.0, 113.4, 100.9, 97.4, 46.5, 46.2, 44.9, 42.6, 40.3, 34.8, 21.2; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₈H₃₁N₆O [M+H]⁺: 467.25539; gefunden: 467.25443.

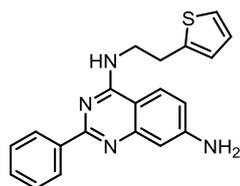
Synthese von 2-(4-Morpholinophenyl)-N⁴-phenethylchinazolin-4,7-diamin (3n)



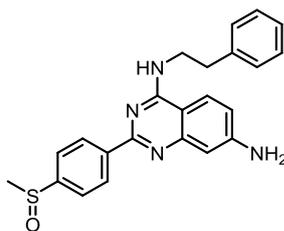
7-Nitrochinazolin **6n** (21 mg, 0.05 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (2 % → 10 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3n** (13 mg, 66 %) zu erhalten. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 9.7 Hz, 6H), 6.98 (dd, *J* = 6.7, 4.2 Hz, 3H), 6.67 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 4.11 (br, 2H), 3.97 (dd, *J* = 12.9, 6.9 Hz, 2H), 3.92 – 3.86 (m, 4H), 3.31 – 3.24 (m, 4H), 3.06 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ 159.0, 152.8, 150.5, 143.5, 139.6, 129.8, 129.1, 128.8, 126.6, 122.4, 115.4, 114.6, 77.4, 67.0, 48.7, 42.5, 35.7; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₆H₂₈N₅O [M+H]⁺: 426.22884; gefunden: 426.22857.

Synthese von 2-Phenyl-N⁴-(thiophen-2-ylmethyl)chinazolin-4,7-diamin (3d)

7-Nitrochinazolin **6d** (59 mg, 0.16 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (1 % → 10 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3d** (45 mg, 83 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.47 (dd, *J* = 6.6 Hz, 3.0 Hz, 2H), 7.98 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.35 (dd, *J* = 5.1 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 5.0 Hz, 3.5 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 6.19 (s, 2H), 5.02 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.4, 158.9, 154.6, 143.3, 131.7, 129.2, 127.5, 127.3, 126.2, 125.1, 117.0, 104.3, 49.45; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₉H₁₇N₄S [M+H]⁺: 333.11684; gefunden: 333.11689.

Synthese von 2-phenyl-N⁴-(2-(Thiophen-2-yl)ethyl)chinazolin-4,7-diamin (3e)

7-Nitrochinazolin **6e** (60 mg, 0.16 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 2 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3e** (46 mg, 84 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.76 (s, 1H), 8.33 (m, 2H), 8.17 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.72 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.66 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.34 (dd, *J* = 5.0 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.95 (m, 5H), 3.97 (dd, *J* = 12.9 Hz, 7.0 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 7.2, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.8, 156.4, 155.3, 140.8, 133.0, 128.8, 128.7, 127.0, 125.5, 125.4, 124.3, 117.0, 101.2, 42.8; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₀H₁₉N₄S [M+H]⁺: 347.13249; gefunden: 347.13256.

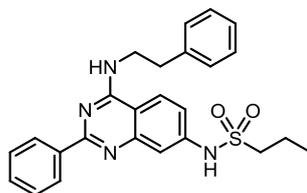
Synthese von 2-(4-(Methylsulfinyl)phenyl)-N⁴-phenethylchinazolin-4,7-diamin (3m)

7-Nitrochinazolin **6m** (478 mg, 1.11 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 6 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **3m** (272 mg, 61 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.41 – 7.30 (m, 4H), 7.28 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H), 7.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 4.17 (s, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.06 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 159.4, 159.2, 152.3, 150.7, 144.8, 141.1, 139.3, 129.3, 129.0, 128.9, 127.3, 126.8, 122.2, 116.7, 109.4, 106.7, 44.8, 42.5, 35.7; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₃H₂₃N₄OS [M+H]⁺: 403.15871; gefunden: 403.15755.

7.2.1.4 Nukleophile Substitution an 7- und 8-Aminochinazolinen

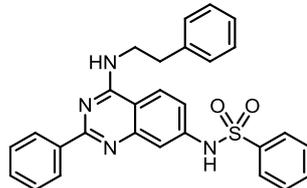
Allgemeine Vorschrift DI für die nukleophile Substitution an 7- und 8-Aminochinazolinen mit Sulfonsäurechloriden. Aminochinazoline (1 eq) wurden in Py (1.1 eq) und DCM gelöst und unter Rühren bei 0 °C das jeweilige Säurechlorid (ca. 1:1000-Verdünnung in trockenem DCM, 1.1 eq) tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei 50 °C gerührt, mit 6 M NaOH gestoppt, anschließend extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt, um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

Synthese von *N*-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)propan-1-sulfonamid (7b)



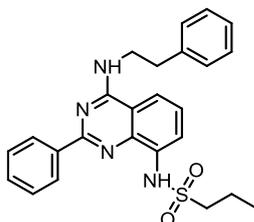
7-Aminochinazolin **3a** (75 mg, 0.22 mmol) wurde gemäß Vorschrift **D1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0.5 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **7b** (68 mg, 80 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.31 (s, 1H), 8.49 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 8.36 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.58 – 7.43 (m, 4H), 7.34 – 7.31 (m, 4H), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 3.87 (dd, *J* = 14.3, 6.1 Hz, 2H), 3.22 (m, 2H), 3.05 (m, 2H), 1.79 – 1.67 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.0, 159.3, 151.1, 142.4, 139.7, 138.6, 130.2, 128.8, 128.5, 128.3, 127.9, 126.2, 124.2, 117.0, 113.7, 109.7, 52.7, 42.4, 34.7, 17.0, 12.5; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₇N₄O₂S [M+H]⁺: 447.18492; gefunden: 447.18460.

Synthese von *N*-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)benzolsulfonamid (7c)



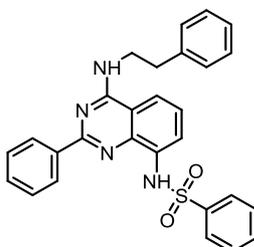
7-Aminochinazolin **3a** (75 mg, 0.22 mmol) wurde gemäß Vorschrift **D1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (30 % → 35 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **7c** (32 mg, 69 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.87 (s, 1H), 8.47 – 8.41 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.89 – 7.85 (m, 2H), 7.65 – 7.54 (m, 3H), 7.53 – 7.45 (m, 3H), 7.41 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.35 – 7.27 (m, 4H), 7.26 – 7.17 (m, 2H), 5.74 (s, 1H), 3.83 (dd, *J* = 14.5, 6.1 Hz, 2H), 3.01 (m, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.9, 159.2, 154.5, 147.2, 141.7, 139.6, 139.3, 133.3, 130.3, 129.5, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 126.7, 126.2, 124.1, 117.4, 114.6, 110.0, 42.4, 34.7; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₈H₂₅N₄O₂S [M+H]⁺: 481.16927; gefunden: 481.16906.

Synthese von *N*-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)propan-1-sulfonamid (7d)



8-Aminochinazolin **3p** (60 mg, 0.18 mmol) wurde gemäß Vorschrift **D1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (10 % → 20 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **7d** (65 mg, 83 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.24 (s, 1H), 8.63 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 2H), 8.57 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 3H), 7.45 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 4H), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 3.90 (dd, *J* = 14.3, 6.2 Hz, 2H), 3.23 – 3.15 (m, 2H), 3.10 – 3.04 (m, 2H), 1.82 – 1.71 (m, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.5, 158.8, 141.4, 139.5, 138.2, 133.5, 130.3, 128.7, 128.4, 128.2, 128.2, 126.1, 125.0, 121.0, 117.6, 113.8, 53.0, 42.5, 34.5, 16.8, 12.5; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₇N₄O₂S [M+H]⁺: 447.18492; gefunden: 447.18435.

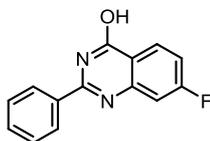
Synthese von *N*-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)benzolsulfonamid (7e)



8-Aminochinazolin **3p** (60 mg, 0.18 mmol) wurde gemäß Vorschrift **D1** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (10 % → 20 % EtOAc/PE), um Zielsubstanz **7e** (41 mg, 78 %) zu erhalten. **¹H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.87 (s, 1H), 8.60 (m, 2H), 8.50 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.95 – 7.84 (m, 3H), 7.71 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.60 – 7.46 (m, 4H), 7.47 – 7.34 (m, 3H), 7.34 – 7.24 (m, 4H), 7.24 – 7.15 (m, 1H), 3.84 (dd, *J* = 14.3, 6.1 Hz, 2H), 3.02 (m, 2H); **¹³C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.4, 158.7, 141.6, 139.6, 138.2, 133.0, 132.8, 130.4, 129.1, 128.7, 128.5, 128.4, 128.2, 126.8, 126.2, 124.8, 121.3, 118.0, 113.7, 42.5, 34.5; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₈H₂₅N₄O₂S [M+H]⁺: 481.16927; gefunden: 481.16884.

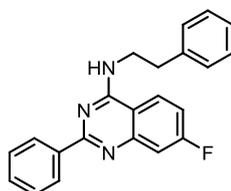
7.2.1.5 Synthese von 7-Alkylchinazolinen

Synthese von 7-Fluoro-2-phenylchinazolin-4-ol (**5f**)



Zu einer Lösung von 4-Fluoranthranilsäure **4d** (2 g, 1 eq, 12.9 mmol) in 2-Methoxyethanol (20 mL) und AcOH (drei Tropfen) wurde Benzamidin-Hydrochlorid-Hydrat (10 g, 6 eq, 77.37 mmol) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 18 h bei 130 °C gerührt. Danach wurde die nach warme Lösung filtriert und der Filterkuchen mit kaltem MeOH gewaschen, um die Zielsubstanz **5f** (1.67 g, 51 %) als hellbraunen Feststoff zu erhalten. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.68 (s, 1H), 8.38 – 8.02 (m, 3H), 7.78 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.66 – 7.41 (m, 4H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.7, 153.8, 149.9, 139.2, 132.4, 131.8, 128.7, 128.0, 128.0, 126.8, 126.6, 119.8; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₁₄H₁₀N₂OF [M+H]⁺: 241.07717; gefunden: 241.07705.

Synthese von 7-Fluoro-N-phenethyl-2-phenylchinazolin-4-amin (**6f**)



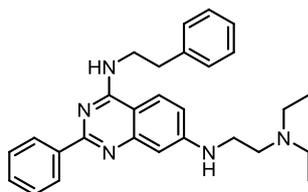
4-Hydroxychinazolin **5f** (5000 mg, 2.08 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch gereinigt (0 % → 4 % MeOH/DCM), um Zielsubstanz **6f** (680 mg, 95 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.53 (s, 1H), 8.50 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 19.0 Hz, 4H), 7.39 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.32 (s, 4H), 7.22 (s, 1H), 3.95 – 3.82 (m, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 163.3, 160.4, 159.4, 139.6, 138.4, 130.4, 128.8, 128.5, 128.3, 128.0, 126.2, 125.8 (d, *J* = 10.8 Hz), 114.5 (d, *J* = 24.1 Hz), 111.7 (d, *J* = 20.2 Hz), 111.0, 42.4, 34.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₂H₁₉N₃F [M+H]⁺: 344.15575; gefunden: 344.15581.

Synthese von *N*⁷-(4-Morpholinobutyl)-*N*⁴-phenethyl-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (**8b**)



7-Aminochinazolin **6f** (150 mg, 1 eq, 0.44 mmol), Cu(OAc)₂ (79.3 mg, 1 eq, 0.44 mmol) und K₂CO₃ (120.7 mg, 2 eq, 0.88 mmol) wurden in 2-Morpholinoethan-1-amin (57 μ L, 1 eq, 0.44 mmol) und DMF (5 mL) gelöst und für 21 h bei 150 °C gerührt. Nach Extraktion mit Wasser und EtOAc, Konzentration der vereinigten organischen Phasen und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (0 % \rightarrow 10 % MeOH/DCM) wurde die beschriebene Zielsubstanz **8f** (150 mg, 32 %) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.46 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 8.11 (s, 1H), 7.98 – 7.87 (m, *J* = 11.2, 6.1 Hz, 2H), 7.53 – 7.42 (m, 3H), 7.32 (d, *J* = 4.4 Hz, 4H), 7.25 – 7.17 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.73 – 6.67 (m, 1H), 6.42 (br, 1H), 3.86 – 3.78 (m, 2H), 3.50 – 3.41 (m, 4H), 3.08 – 3.00 (m, 2H), 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.05 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.1, 159.6, 152.6, 140.2, 139.2, 130.6, 129.2, 129.0, 128.8, 128.3, 126.7, 123.8, 116.1, 104.9, 66.5, 57.0, 53.7, 42.6, 35.5, 31.2; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₈H₃₂N₅O [M+H]⁺: 454.26014; gefunden: 454.25947.

Synthese von *N*⁷-(4-(Diethylamino)butyl)-*N*⁴-phenethyl-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (8a**)**

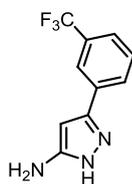


7-Aminochinazolin **6f** (300 mg, 1 eq, 0.87 mmol), Cu(OAc)₂ (kat.), I₂ (kat.) und K₂CO₃ (800 mg, 8 eq, 6.99 mmol) wurden in *N*¹,*N*¹-Diethylethan-1,2-diamin (610 μ L, 6 eq, 5.24 mmol) und NMP (3 mL) gelöst und für 3 d bei 175 °C gerührt. Nach Extraktion mit Wasser und DCM, Konzentration der vereinigten organischen Phasen und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (4 % \rightarrow 10 % MeOH/DCM) wurde die beschriebene Zielsubstanz **8a** (113 mg, 35 %) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.47 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.97 – 7.87 (m, 2H), 7.58 – 7.43 (m, 4H), 7.33 (d, *J* = 4.4 Hz, 6H), 7.27 – 7.17 (m, 2H), 6.89 – 6.79 (m, 1H), 6.72 (dd, *J* = 9.8 Hz, 1H), 6.43 (br, 1H), 3.87 – 3.78 (m, 2H), 3.45 (dd, *J* = 18.2, 10.8 Hz, 4H), 3.11 – 2.99 (m, 2H), 1.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.06 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.00 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H).

7.2.2 Synthese von 3-Arylpyrazolopyridinonen

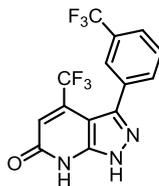
Allgemeine Vorschrift E für die Kondensation von 1H-Pyrazol-5-aminen mit Ethylacetoacetat-Derivaten. 3-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazol-5-amin **XX** (1.2 eq) wurde in dem jeweiligen Ethylacetoacetat-Derivat (1 eq) und AcOH gelöst und für 19 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf rt wurde die Reaktionsmischung mit Eiswasser versetzt und für 15 min gerührt und durch Filtration sowie Waschen des entstandenen Präzipitats mit *n*-Hexan die jeweilige beschriebene Zielsubstanz erhalten.

Synthese von 3-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazol-5-amin (**22**)



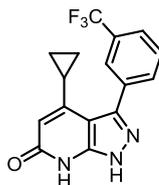
3-Oxo-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)propanenitril **21** (1.2 g, 1 eq, 5.63 mmol) wurde in EtOH (10 mL) gelöst und unter Rühren Hydrazin (141 μ L, 1.55 eq, 8.80 mmol) tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei rt und anschließend für weitere 18 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf rt erfolgte die Zugabe von Wasser (20 mL) und das entstandene Präzipitat wurde nach Filtration zur weiteren Reinigung mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und 10 % MeOH/DCM extrahiert, um die beschriebene Zielsubstanz **22** (630 mg, 50 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.89 (d, *J* = 220.0 Hz, 1H), 7.98 (s, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.59 (s, 2H), 5.85 (d, *J* = 67.9 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 218.2 Hz, 2H).

Synthese von 4-(Trifluoromethyl)-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1,7-dihydro-6H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-6-on (1)



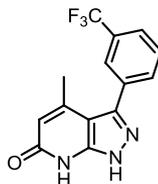
3-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin **22** (180 mg, 0.79 mmol) wurde gemäß Vorschrift **E** umgesetzt und zusätzlich säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (60 % → 100 % EtOAc/PE), um die beschriebene Zielsubstanz **1** (145 mg, 53 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.82 (s, 1H), 12.41 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.84 – 7.77 (m, 2H), 7.76 – 7.69 (m, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.61 (s, 1H); HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₄H₈N₃OF₆ [M+H]⁺: 348.05661; gefunden: 348.05715.

Synthese von 4-Cyclopropyl-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1,7-dihydro-6H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-6-on (20a)



3-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin **22** (160 mg, 0.70 mmol) wurde gemäß Vorschrift **E** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **20a** (113 mg, 51 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.36 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.71 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 1.96 – 1.91 (m, 1H), 1.14 – 1.06 (m, 2H), 1.03 – 0.96 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.3, 156.1, 151.2, 142.8, 133.6, 130.1, 129.9, 129.5, 125.2, 122.2, 90.5, 86.0, 13.0, 9.2; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₆H₁₃N₃OF₃ [M+H]⁺: 320.10052; gefunden: 320.10100.

Synthese von 4-Methyl-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1,7-dihydro-6H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-6-on (20b)

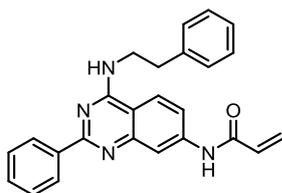


3-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazol-5-amin **22** (160 mg, 0.70 mmol) wurde gemäß Vorschrift **E** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **20b** (123 mg, 60 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.44 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 7.80 – 7.74 (m, 1H), 7.74 – 7.68 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 2.32 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 156.0, 151.3, 150.5, 142.9, 133.6, 130.1, 129.9, 125.3, 122.2, 95.4, 85.9, 18.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{OF}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 316.06682; gefunden: 316.06720.

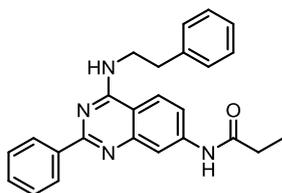
7.2.3 Synthese von kovalenten LiPoLis und Referenzsubstanzen

7.2.3.1 N-Acylamide in 7- und 8-Position

Allgemeine Vorschrift D2 für die nukleophile Substitution an 2-(3-Aminophenyl)- sowie 7- und 8-Aminochinazolinen mit Carbonsäurechloriden. Aminochinazoline (1 eq) wurden in DIPEA (2 eq) und THF gelöst und unter Rühren bei 0 °C das jeweilige Säurechlorid (ca. 1:1000-Verdünnung in trockenem THF, 1.1 eq) tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei rt gerührt, das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand mit gesättigtem $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ und DCM extrahiert. Nach Konzentration der vereinigten organischen Phasen und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel wurde die jeweilige beschriebene Zielsubstanz erhalten.

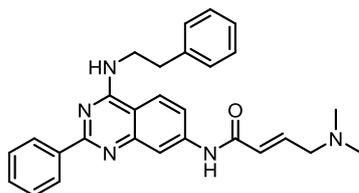
Synthese von *N*-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)acrylamid (7f)

7-Aminochinazolin **3a** wurde gemäß Vorschrift **D2** umgesetzt und die Zielsubstanz **7f** (22 mg, 44 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (1 % → 5 % MeOH/DCM) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.47 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.20 – 8.12 (m, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.56 – 7.44 (m, 3H), 7.32 (s, 4H), 7.22 (s, 1H), 6.56 – 6.46 (m, 1H), 6.35 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 5.87 – 5.80 (m, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.10 – 3.02 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.6, 159.6, 159.1, 150.9, 142.5, 139.6, 138.7, 131.6, 129.9, 128.6, 128.3, 128.1, 127.8, 127.6, 126.0, 123.3, 117.8, 115.4, 109.9, 42.3, 34.6; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₃N₄O [M+H⁺]: 395.1866, gefunden: 395.1854.

Synthese von *N*-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)propionamid (7a)

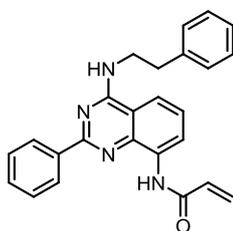
7-Aminochinazolin **3a** wurde gemäß Vorschrift **D2** umgesetzt und die Zielsubstanz **7a** (31 mg, 66 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (0 % → 1 % MeOH/DCM) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.19 (s, 1H), 8.50 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 2H), 8.29 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 5.4, 3.2 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 7.54 – 7.45 (m, 3H), 7.36 – 7.29 (m, 4H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 3.86 (dt, *J* = 14.5, 6.0 Hz, 2H), 3.06 (m, 2H), 2.41 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.6, 159.6, 159.1, 151.0, 142.9, 139.7, 138.8, 129.9, 128.7, 128.4, 128.2, 127.8, 126.1, 123.2, 117.7, 114.9, 109.5, 42.3, 34.7, 29.7, 9.5; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₅N₄O [M+H⁺]: 397.20229; gefunden: 397.20133.

Synthese von (E)-4-(Dimethylamino)-N-(4-(phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)but-2-enamid (7g)

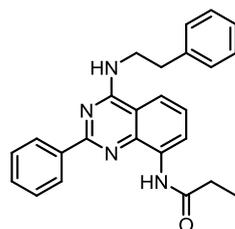


7-Aminochinazolin **3a** wurde gemäß Vorschrift **D2** umgesetzt und die Zielsubstanz **7g** (31 mg, 58 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (1 % → 5 % MeOH/DCM) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.45 (s, 1H), 8.50 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 2H), 8.34 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H), 7.58 – 7.42 (m, 3H), 7.38 – 7.27 (m, 4H), 7.27 – 7.17 (m, 1H), 6.82 (dt, $J = 15.4, 5.8$ Hz, 1H), 6.37 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 3.87 (dd, $J = 14.4, 6.1$ Hz, 2H), 3.12 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.06 (t, 2H), 2.22 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.6, 159.6, 159.1, 150.9, 142.7, 142.0, 139.6, 138.7, 129.9, 128.6, 128.3, 128.1, 127.7, 126.0, 125.7, 123.3, 117.8, 115.2, 109.7, 59.6, 45.0, 42.3, 34.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 452.2444, gefunden: 452.2449.

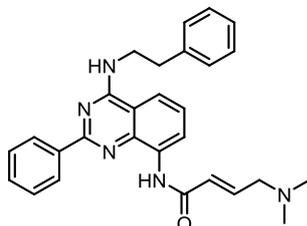
Synthese von N-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)acrylamid (7i)



8-Aminochinazolin **3p** wurde gemäß Vorschrift **D2** umgesetzt und die Zielsubstanz **7i** (39 mg, 74 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (1 % → 5 % MeOH/DCM) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.08 (s, 1H), 8.77 – 8.62 (m, 3H), 8.54 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.58 – 7.50 (m, 3H), 7.46 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.36 – 7.29 (m, 4H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 6.94 (dd, $J = 16.9, 10.2$ Hz, 1H), 6.35 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 5.85 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J = 13.5, 6.6$ Hz, 2H), 3.08 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.3, 159.4, 158.3, 140.3, 139.5, 138.1, 133.6, 132.4, 130.3, 128.6, 128.3, 128.3, 128.2, 127.1, 126.1, 125.0, 120.2, 116.7, 113.3, 42.4, 34.5; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 395.1857, gefunden: 395.1866.

Synthese von *N*-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)propionamid (7h)

8-Aminochinazolin **3p** wurde gemäß Vorschrift **D2** umgesetzt und die Zielsubstanz **7h** (39 mg, 83 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (1 % → 5 % MeOH/DCM) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.84 (s, 1H), 8.68 – 8.59 (m, 3H), 8.51 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.60 – 7.48 (m, 3H), 7.42 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 4H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 3.90 (dd, *J* = 14.1, 6.3 Hz, 2H), 3.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.64 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.9, 160.3, 159.0, 140.7, 140.4, 139.0, 134.8, 131.1, 129.5, 129.2, 129.1, 129.1, 127.0, 125.9, 120.1, 116.8, 114.1, 43.3, 35.4, 30.9, 10.4; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₅N₄O [M+H⁺]: 397.2022, gefunden: 397.2020.

Synthese von (*E*)-4-(Dimethylamino)-*N*-(4-(phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)but-2-enamid (7j)

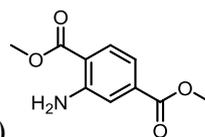
8-Aminochinazolin **3p** wurde gemäß Vorschrift **D2** umgesetzt und die Zielsubstanz **7j** (21 mg, 40 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (1 % → 5 % MeOH/DCM) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.74 – 8.65 (m, 3H), 8.53 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.60 – 7.49 (m, 3H), 7.44 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 4H), 7.25 – 7.17 (m, 1H), 6.90 – 6.79 (m, 1H), 6.75 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 14.2, 6.2 Hz, 2H), 3.14 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.07 (t, 2H), 2.22 (s, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.3, 159.7, 158., 142.0, 140.2, 139.5, 138.2, 133.9, 130.2, 128.7, 128.3, 128.2, 128.2, 126.5, 126.1, 125.0, 120.1, 116.4, 113.3, 59.6, 45.1, 42.46, 34.5; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₈H₃₀N₅O [M+H⁺]: 452.2404, gefunden: 452.2444.

7.2.3.2 Alkylketone in 7- und 8-Position

Allgemeine Vorschrift F für die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden. Alkohole (1 eq) und DMP (1.1 eq) wurden in trockenem DCM gelöst und für 1 h bei rt gerührt. Anschließend erfolgte die Extraktion mit gesättigtem $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ und DCM, Konzentration der vereinigten organischen Phasen und säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (1 % \rightarrow 5 % MeOH/DCM), um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

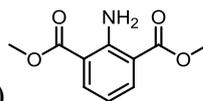
Allgemeine Vorschrift G für die Aldol-Kondensation von Aldehyden und Aceton nach Claisen-Schmidt. Aldehyde (1 eq) wurden in Aceton und 10 % NaOH gelöst und die Reaktionsmischung für 3 h bei rt gerührt. Anschließend erfolgte die Extraktion nach Zugabe von DCM, Konzentration der vereinigten organischen Phasen und säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (1 % \rightarrow 5 % MeOH/DCM), um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

Allgemeine Vorschrift H für die Grignard-Reaktion mit Carbaldehyden. Carbaldehyde (1 eq) wurden in trockenem THF gelöst und bei 0 °C unter Rühren das jeweilige Grignard-Reagenz (10 eq, als Stammlösung in THF oder PhMe) tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei rt gerührt und anschließend mit gesättigtem $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ und DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen konzentriert und nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (1 % \rightarrow 5 % MeOH/DCM) die jeweilige beschriebene Zielsubstanz erhalten.



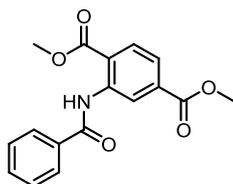
Synthese von Dimethyl 2-aminoterephthalat (64a)

2-Aminoterephthalsäure **63a** (2.0 g, 1 eq, 11.0 mmol) wurde in H₂SO₄ (4.11 mL) und MeOH (45 mL) gelöst und für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung durch Zugabe von gesättigtem NaHCO₃(aq), 1 M NaOH und NaOH-Plätzchen auf einen pH-Wert von 7 gebracht, mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen verdampft. Säulenchromatographie an Kieselgel (30 % EtOAc/PE) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **64a** (2.1 g, 99 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H), 6.85 (s, 2H), 3.91 – 3.78 (m, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.2, 165.8, 150.7, 134.1, 131.1, 117.5, 114.3, 111.8, 52.2, 51.6; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₀H₁₂NO₄ [M+H⁺]: 210.0769, gefunden: 210.0760.

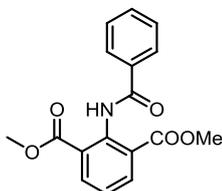


Synthese von Dimethyl 2-aminoisophthalat (64b)

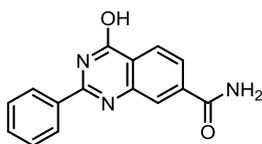
2-Aminoisophthalsäure **63b** (5.0 g, 1 eq, 27.5 mmol) wurde in H₂SO₄ (5 mL) und MeOH (50 mL) gelöst und für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung durch Zugabe von gesättigtem NaHCO₃(aq), 1 M NaOH und NaOH-Plätzchen auf einen pH-Wert von 7 gebracht, mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen verdampft. Das Rohprodukt **64b** (5.3 g) wurde nachfolgend ohne weitere Reinigung verwendet.

Synthese von Dimethyl 2-benzamidoterephthalat (65a)

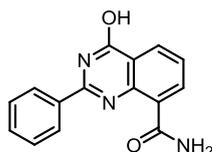
Benzoessäureanhydrid (1.5 g, 5 eq, 11.0 mmol) wurde bei 50 °C geschmolzen, bevor die Zugabe von Startmaterial **64a** (450 mg, 1 eq, 2.15 mmol) erfolgte und für 1 h bei 150 °C unter Rühren erhitzt wurde. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Eiswasser gegeben, für 15 min gerührt, das Präzipitat abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Säulenchromatographie an Kieselgel (20 % EtOAc/PE) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **65a** (455 mg, 68 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 12.00 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.20 – 8.12 (m, 1H), 8.10 – 8.01 (m, 2H), 7.83 – 7.74 (m, 1H), 7.62 – 7.50 (m, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.95 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 168.62, 166.31, 165.85, 142.00, 135.71, 134.67, 132.32, 131.14, 129.03, 127.55, 123.49, 121.62, 118.52, 52.97, 52.71; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{NO}_5$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 314.1021, gefunden: 314.1023.

Synthese von Dimethyl 2-benzamidoisophthalat (65b)

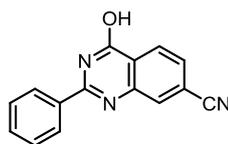
Benzoessäureanhydrid (4.6 g, 22.01 mmol) wurde bei 50 °C geschmolzen, bevor die Zugabe von Startmaterial **64b** (4.6 g, 5 eq, 22.01 mmol) erfolgte und für 1 h bei 150 °C unter Rühren erhitzt wurde. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Eiswasser gegeben und für weitere 15 min gerührt. Filtration und Waschen des Präzipitats mit kaltem Wasser lieferte Rohprodukt **65b** (3.86 g), welches ohne weitere Reinigung weiterverwendet wurde.

Synthese von 4-Hydroxy-2-phenylchinazolin-7-carboxamid (66a)

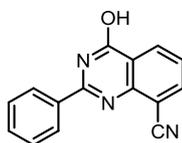
Startmaterial **65a** (490 mg, 1.57 mmol) wurde in einem *sealed tube* mit 30 % NH₃(aq) (5 mL) versetzt und für 18 h bei 120 °C erhitzt. Filtration und Waschen des Präzipitats mit Wasser lieferte die beschriebene Zielsubstanz **66a** (336 mg, 81 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.66 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 8.24 – 8.18 (m, 3H), 7.96 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 7.69 – 7.55 (m, 4H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.9, 161.8, 152.9, 148.6, 139.7, 132.5, 131.5, 128.6, 127.7, 126.4, 125.9, 125.2, 122.6; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₅H₁₂N₃O₂ [M+H⁺]: 266.0920, gefunden: 266.0924.

Synthese von 4-Hydroxy-2-phenylchinazolin-8-carboxamid (66b)

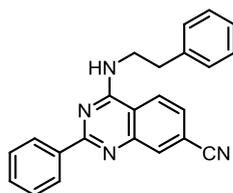
Startmaterial **65b** (3.0 g, 9.58 mmol) wurde in *sealed tubes* mit 30 % NH₃(aq) (3 × 10 mL) versetzt und für 18 h bei 120 °C erhitzt. Filtration und Waschen des Präzipitats mit Wasser lieferte die beschriebene Zielsubstanz **66b** (2.3 g, 59 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.90 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.52 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 8.34 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 8.13 – 8.06 (m, 2H), 7.88 – 7.85 (m, 1H), 7.70 – 7.55 (m, 4H).

Synthese von 4-Hydroxy-2-phenylchinazolin-7-carbonitril (67a)

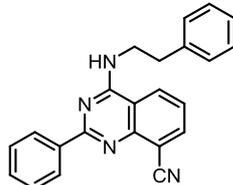
Carboxamid **66a** (570 mg, 1 eq, 2.15 mmol) wurde unter N₂-Atmosphäre bei 0 °C in Py (0.86 mL, 5 eq, 10.7 mmol) und DCM (10 mL) gelöst, anschließend TFA-Anhydrid (0.59 mL, 2 eq, 4.30 mmol) in trockenem DCM (2 mL) tropfweise hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 19 h bei rt gerührt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Koevaporation von Py mit PhMe wurde der Rückstand mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert. Das Präzipitat in DCM wurde abfiltriert und mit DCM und Wasser gewaschen, um die beschriebene Zielsubstanz **67a** (437 mg, 82 %) zu liefern. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.82 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.59 (m, *J* = 14.7, 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.44, 154.05, 148.57, 132.18, 131.81, 128.61, 128.43, 127.94, 127.28, 124.13, 117.87, 116.69; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₁₅H₁₀N₃O [M+H⁺]: 248.0827, gefunden: 248.0818.

Synthese von 4-Hydroxy-2-phenylchinazolin-8-carbonitril (67b)

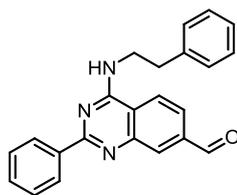
Carboxamid **66b** (1.3 mg, 1 eq, 4.90 mmol) wurde unter N₂-Atmosphäre bei 0 °C in Py (1.98 mL, 5 eq, 24.5 mmol) und DCM (20 mL) gelöst, anschließend TFA-Anhydrid (1.36 mL, 2 eq, 9.80 mmol) in trockenem DCM (5 mL) tropfweise hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 19 h bei rt gerührt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Koevaporation von Py mit PhMe wurde der Rückstand mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert. Das Präzipitat in DCM wurde abfiltriert und mit DCM und Wasser gewaschen, um die beschriebene Zielsubstanz **67b** (775 mg, 64 %) zu liefern.

Synthese von 4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-carbonitril (68a)

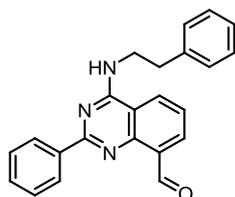
4-Hydroxychinazolin **67a** (420 mg, 1.70 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (30 % EtOAc/PE) die beschriebene Zielsubstanz **68a** (509 mg, 87 %) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.77 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.50 (dd, $J = 6.5, 3.1$ Hz, 2H), 8.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 3H), 7.35 – 7.28 (m, $J = 8.7, 5.4$ Hz, 4H), 7.21 (ddd, $J = 8.5, 5.8, 2.6$ Hz, 1H), 3.90 (dd, $J = 13.8, 6.5$ Hz, 2H), 3.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160.7, 159.3, 149.4, 139.4, 137.9, 132.9, 130.5, 128.6, 128.3, 128.3, 128.0, 126.5, 126.1, 124.4, 118.1, 116.3, 115.1, 42.5, 34.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}^+]$: 351.1607, gefunden: 351.1604.

Synthese von 4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-carbonitril (68b)

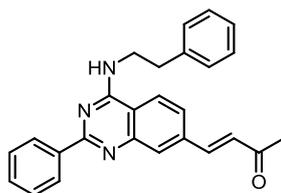
4-Hydroxychinazolin **67b** (502 mg, 2.03 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und das Rohprodukt **68b** (455 mg) nachfolgend ohne weitere Reinigung verwendet.

Synthese von 4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-carbaldehyd (69a)

Carbonitril **68a** (260 mg, 0.74 mmol) wurde in 50 % Methansäure gelöst und RaNi unter Rühren solange portionsweise hinzugegeben, bis eine vollständige Umsetzung des Startmaterials bei 60 °C unter Rückfluss erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Filtration der Reaktionsmischung über Celite® und Waschen mit EtOAc, DCM, MeOH und Wasser sowie Konzentration des Filtrats. Der Rückstand wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von ca. 9 eingestellt, mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden verdampft, um die beschriebene Zielsubstanz **69a** (74 mg, 35 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.21 (s, 1H), 8.70 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.57 – 8.52 (m, 2H), 8.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.59 – 7.50 (m, 3H), 7.37 – 7.29 (m, 4H), 7.26 – 7.19 (m, 1H), 3.92 (dd, *J* = 14.0, 6.4 Hz, 2H), 3.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.1, 161.2, 160.4, 151.1, 140.4, 140.0, 139.1, 133.2, 131.3, 129.6, 129.3, 129.2, 128.8, 127.0, 124.8, 123.1, 118.1, 43.4, 35.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₃H₂₀ON₄ [M+H⁺]: 354.16009, gefunden: 354.16022.

Synthese von 4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-carbaldehyd (69b)

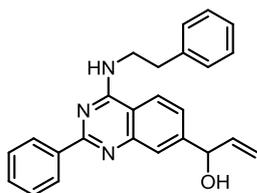
Carbonitril **68b** (500 mg, 1.42 mmol) wurde in 50 % Methansäure gelöst und RaNi unter Rühren solange portionsweise hinzugegeben, bis eine vollständige Umsetzung des Startmaterials bei 60 °C unter Rückfluss erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Filtration der Reaktionsmischung über Celite® und Waschen mit EtOAc, DCM, MeOH und Wasser sowie Konzentration des Filtrats. Der Rückstand wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von ca. 9 eingestellt, mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden verdampft, um die beschriebene Zielsubstanz **69b** (15 mg, 3 %) zu erhalten sowie den entsprechend Alkohol **70b** (353 mg, 71 %). Dieser wurde gemäß Vorschrift **F** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (15 % EtOAc/PE) gereinigt, um weitere Zielsubstanz **69b** (287 mg, 82 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.32 (s, 1H), 8.72 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.62 – 8.56 (m, 2H), 8.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.57 – 7.49 (m, 3H), 7.36 – 7.27 (m, 4H), 7.24 – 7.13 (m, 1H), 3.91 (dd, *J* = 13.7, 6.5 Hz, 2H), 3.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 191.7, 160.0, 159.7, 150.2, 139.5, 138.2, 131.1, 130.6, 130.0, 129.3, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 126.1, 124.5, 114.3, 42.4, 34.4.

Synthese von 4-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)but-3-en-2-on (73a)

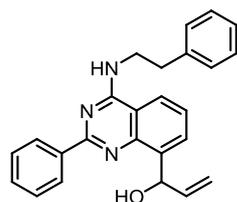
Carbaldehyd **69a** (100 mg, 0.28 mmol) wurde gemäß Vorschrift **G** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **73a** (94 mg, 86 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.51 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 3H), 8.26 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.87 (dd, $J = 8.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 7.56 – 7.45 (m, 3H), 7.36 – 7.29 (m, 4H), 7.25 – 7.17 (m, 1H), 7.04 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 3.89 (dd, $J = 13.8, 6.5$ Hz, 2H), 3.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.39 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 198.1, 159.9, 159.4, 142.0, 139.6, 138.5, 138.5, 130.2, 129.3, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 127.9, 126.1, 123.6, 123.4, 42.4, 34.5, 27.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ON}_4$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 394.19139, gefunden: 394.19303.

Synthese von 4-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)but-3-en-2-on (73b)

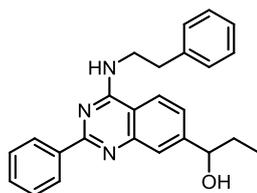
Carbaldehyd **69b** (40 mg, 0.11 mmol) wurde gemäß Vorschrift **G** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **73b** (39 mg, 88 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.76 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 8.63 – 8.52 (m, 3H), 8.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.62 – 7.48 (m, 4H), 7.38 – 7.27 (m, 5H), 7.27 – 7.17 (m, 1H), 7.14 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J = 14.2, 6.1$ Hz, 2H), 3.08 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 199.0, 160.7, 160.0, 149.0, 140.5, 139.5, 139.2, 131.7, 131.7 (d, $J = 6.7$ Hz), 131.7, 131.3, 129.6, 129.3, 129.3, 128.8, 127.0, 125.8, 115.0, 43.4, 35.4, 28.5; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ON}_4$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: 394.19139, gefunden: 394.19290.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)prop-2-en-1-ol (71b)

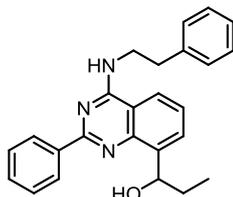
Carbaldehyd **69a** (250 mg, 0.70 mmol) wurde gemäß Vorschrift **H** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **71b** (179 mg, 67 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.63 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.53 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 2H), 8.36 – 8.29 (m, 2H), 7.93 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.58 – 7.47 (m, 3H), 7.37 – 7.27 (m, 4H), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 3.90 (dd, $J = 14.3, 6.2$ Hz, 2H), 3.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.08 (t, 2H), 1.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 200.4, 160.1, 159.4, 149.9, 139.7, 139.5, 138.4, 130.3, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 126.1, 123.3, 123.0, 116.3, 42.5, 34.4, 31.6, 8.00.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)prop-2-en-1-ol (71d)

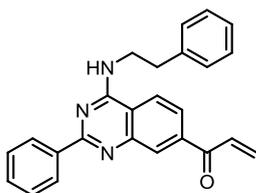
Carbaldehyd **69b** (60 mg, 0.18 mmol) wurde gemäß Vorschrift **H** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **71d** (37 mg, 57 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.49 (dt, $J = 6.0, 3.1$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.56 – 7.46 (m, 4H), 7.39 – 7.32 (m, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 6H), 6.34 (ddd, $J = 16.6, 10.3, 6.0$ Hz, 1H), 5.65 – 5.58 (m, 1H), 5.40 (dt, $J = 17.2, 1.4$ Hz, 1H), 5.21 (dt, $J = 10.3, 1.4$ Hz, 1H), 4.11 – 3.99 (m, 2H), 3.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 160.1, 140.4, 139.1, 132.9, 131.1, 130.9, 129.0, 128.9, 128.7, 128.4, 126.8, 125.4, 120.3, 115.3, 113.8.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)propan-1-ol (71a)

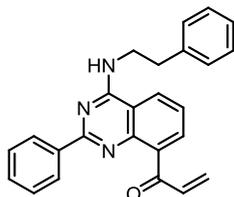
Carbaldehyd **69a** (143 mg, 0.41 mmol) wurde gemäß Vorschrift **H** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **71a** (91 mg, 59 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.52 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 2H), 8.37 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.55 – 7.46 (m, 3H), 7.44 (dd, $J = 8.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 4H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 5.33 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.63 (dd, $J = 11.0, 5.8$ Hz, 1H), 3.88 (dd, $J = 14.2, 6.2$ Hz, 2H), 3.13 – 3.04 (m, 2H), 1.78 – 1.65 (m, 2H), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160.3, 160.1, 151.8, 150.7, 140.6, 139.7, 130.8, 129.6, 129.3, 129.1, 128.6, 127.0, 125.2, 124.4, 123.1, 113.4, 74.1, 43.2, 35.5, 32.6, 10.8.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)propan-1-ol (71c)

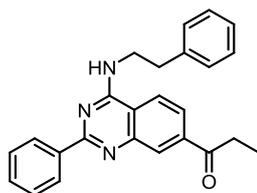
Carbaldehyd **69b** (60 mg, 0.18 mmol) wurde gemäß Vorschrift **H** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **71c** (44 mg, 68 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.55 – 8.45 (m, 2H), 7.57 – 7.48 (m, 4H), 7.45 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.32 – 7.26 (m, 4H), 6.22 (s, 1H), 4.93 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 12.9, 6.7$ Hz, 2H), 3.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.20 – 2.08 (m, 1H), 2.08 – 1.95 (m, 1H), 1.61 (s, 1H), 1.00 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 160.1, 158.5, 139.8, 139.2, 138.0, 130.8, 130.6, 129.1, 128.9, 128.6, 128.4, 126.8, 125.1, 119.7, 113.9, 42.8, 35.5, 32.1, 11.0.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)prop-2-en-1-on (72b)

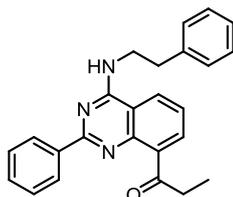
Startmaterial **71b** (80 mg, 0.21 mmol) wurde gemäß Vorschrift **F** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **72b** (58 mg, 73 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.63 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.53 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 2H), 8.36 – 8.29 (m, 2H), 7.93 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.58 – 7.47 (m, 3H), 7.37 – 7.27 (m, 4H), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 3.90 (dd, *J* = 14.3, 6.2 Hz, 2H), 3.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.08 (t, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200.4, 160.1, 159.4, 149.9, 139.7, 139.5, 138.4, 130.3, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 126.1, 123.3, 123.0, 116.3, 42.5, 34.4, 31.6, 8.00; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₂ON₃ [M+H⁺]: 380.17574, gefunden: 380.17758.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)prop-2-en-1-on (72d)

Startmaterial **71d** (50 mg, 0.13 mmol) wurde gemäß Vorschrift **F** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **72d** (45 mg, 90 %) zu erhalten. Im Zuge der weiteren Probenvorbereitung für NMR-Analyse und Ansetzen einer Stammlösung in DMSO zeigte sich rasche Zersetzung des Produktes, sodass dieses von der Charakterisierung ausgeschlossen werden musste.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)propan-1-on (72a)

Startmaterial **71a** (20 mg, 0.05 mmol) wurde gemäß Vorschrift **F** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **72a** (16 mg, 81 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 2H), 8.45 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.56 – 7.48 (m, 3H), 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.31 – 7.27 (m, 3H), 5.89 (s, 1H), 4.05 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 3.18 – 3.06 (m, 4H), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 200.7, 161.5, 159.4, 150.7, 139.9, 139.0, 138.6, 130.6, 129.7, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 126.8, 123.6, 121.1, 116.2, 42.7, 35.3, 32.2, 8.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₄ON₃ [M+H⁺]: 382.19139, gefunden: 382.19094.

Synthese von 1-(4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-8-yl)propan-1-on (72c)

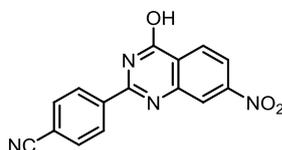
Startmaterial **71c** (25 mg, 0.06 mmol) wurde gemäß Vorschrift **F** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **72c** (21 mg, 83 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.66 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.47 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 2H), 8.37 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 7.2, 1.1$ Hz, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 4H), 7.35 – 7.29 (m, 4H), 7.25 – 7.19 (m, 1H), 3.98 – 3.84 (m, 2H), 3.38 – 3.34 (m, 2H), 3.10 – 3.04 (m, 2H), 1.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 206.1, 159.7, 159.4, 147.4, 139.6, 138.5, 138.0, 131.8, 130.5, 128.8, 128.5, 128.0, 126.2, 125.6, 124.8, 113.9, 42.5, 37.5, 34.5, 8.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₄ON₃ [M+H⁺]: 382.19139, gefunden: 382.19188.

7.2.3.3 Kovalente LiPoLis mit Elektrophil in 3- und 4-Position des 2-Phenyl-Rings

Allgemeine Vorschrift **A2** für die Kondensation von Anthranilamiden mit Benzaldehyden.

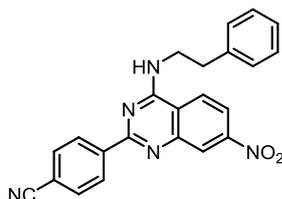
Anthranilamide (1 eq), Aldehyde (1.1 eq) und pTsOH (0.1 eq) wurden in THF gelöst und 1 h bei rt gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von PIDA (1.5 eq) und erneutes Rühren für 1 h bei rt. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit NaHCO₃ und DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (20 % → 30 % EtOAc/PE) gereinigt, um die jeweilige beschriebene Zielsubstanz zu erhalten.

Synthese von 4-(4-Hydroxy-7-nitrochinazolin-2-yl)benzonnitril (**74a**)

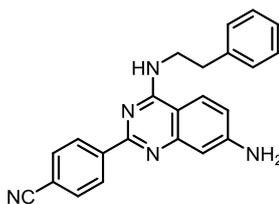


4-Nitroanthranilamid **4b** (300 mg, 1.66 mmol) wurde gemäß Vorschrift **A2** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **74a** (276 mg, 57 %) zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.11 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.37 (d, 1H), 8.34 (d, 2H), 8.25 (d, 1H), 8.06 (d, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.4, 153.4, 151.3, 148.8, 136.4, 132.6, 128.9, 128.2, 125.6, 122.5, 120.6, 118.3, 114.0.

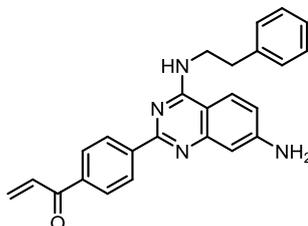
Synthese von 4-(7-Nitro-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)benzonnitril (**75a**)



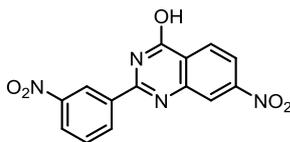
4-Hydroxychinazolin **74a** (276 mg, 0.94 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (30 % EtOAc/PE) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **75a** (309 mg, 83 %) zu erhalten. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.57 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 4.3 Hz, 4H), 7.20 (t, 1H), 3.87 (d, *J* = 12.9, 6.4 Hz, 2H), 3.04 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.0, 158.9, 149.6, 149.2, 141.5, 138.9, 132.0, 128.3, 128.0, 125.8, 124.8, 122.5, 118.8, 118.4, 117.1, 112.4, 42.2, 33.8.

Synthese von 4-(7-Amino-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)benzonitril (76a)

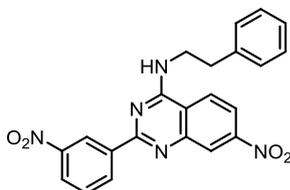
7-Nitrochinazolin **75a** (1.4 g, 3.54 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (1 % → 5 % MeOH/DCM) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **76a** (947 mg, 80 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.60 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.07 (m, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.34–7.30 (m, 4H), 7.21 (m, 1H), 6.96 (dd, $J = 15.0, 5.4$ Hz, 1H), 6.82 – 6.73 (m, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.85 – 3.74 (m, 2H), 3.01 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 158.9, 157.4, 152.6, 150.9, 143.3, 139.5, 132.0, 128.5, 128.2, 128.0, 125.9, 123.4, 118.8, 115.9, 111.6, 104.9, 104.4, 41.9, 34.7.

Synthese von 1-(4-(7-Amino-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)prop-2-en-1-on (77)

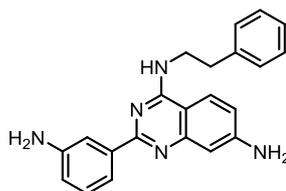
Benzonitril **76a** (560 mg, 1 eq, 1.05 mmol) wurde in trockenem THF gelöst und bei 0 °C unter Rühren Vinylmagnesiumbromid (1.05 mL (1 M in THF), 10 eq, 10.5 mmol) tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei rt gerührt und anschließend mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen konzentriert und nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (1 % → 5 % MeOH/DCM) die beschriebene Zielsubstanz **77** (83 mg, 20 %) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.62 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.38 – 7.29 (m, $J = 7.5$ Hz, 7H), 7.22 (s, 3H), 7.10 (s, 2H), 4.61 (s, 1H), 3.91 – 3.83 (m, 2H), 3.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H); **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₃N₄O [M+H]⁺: 394.1794, gefunden: 394.1668.

Synthese von 7-Nitro-2-(3-nitrophenyl)chinazolin-4-ol (74b)

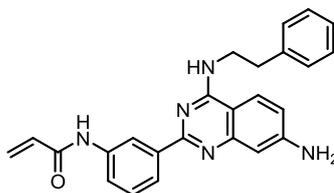
4-Nitroanthranilamid **4b** (500 mg, 2.77 mmol) wurde gemäß Vorschrift **A2** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **74b** (436 mg, 51 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13.20 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.45 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.24 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H), 7.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 181.2, 153.3, 150.9, 147.7, 134.0, 130.1, 127.9, 127.7, 125.9, 125.3, 125.2, 122.6, 122.2, 120.0.

Synthese von 7-Nitro-2-(3-nitrophenyl)-N-phenethylchinazolin-4-amin (75b)

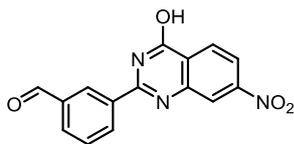
4-Hydroxychinazolin **74b** (356 mg, 1.21 mmol) wurde gemäß Vorschrift **B2** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (30 % EtOAc/PE) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **75b** (410 mg, 87 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.18 (t, $J = 32.5$ Hz, 2H), 8.81 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.44 (dd, $J = 20.8, 5.6$ Hz, 2H), 8.34 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H), 8.20 (dd, $J = 8.9, 2.2$ Hz, 1H), 7.79 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.84 (d, $J = 14.0, 6.5$ Hz, 2H), 3.04 (t, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 166.6, 159.1, 149.8, 149.4, 147.8, 139.1, 139.0, 133.8, 133.7, 129.8, 128.6, 128.2, 126.0, 125.0, 122.6, 122.0, 118.9, 117.4, 42.6, 34.2.

Synthese von 2-(3-Aminophenyl)-N⁴-phenethylchinazolin-4,7-diamin (76b)

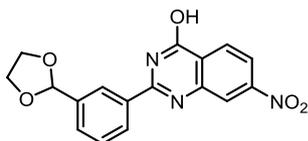
2-(3-Nitrophenyl)-chinazolin **75b** (410 g, 1.04 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (1 % → 5 % MeOH/DCM) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **76b** (325 mg, 93 %) zu erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.94 (s, 2H), 7.64 (d, *J* = 36.5 Hz, 2H), 7.36 - 7.29 (m, 4H), 7.21 (d, 1H), 7.14 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.77 (t, 2H), 6.69 (s, 1H), 5.96 (br, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.82 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.03 (t, 2H); **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.3, 158.9, 152.8, 149.9, 148.5, 139.7, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 126.0, 123.8, 121.6, 120.6, 119.6, 115.9, 115.4, 113.4, 104.2, 42.2, 35.0.

Synthese von N-(3-(7-Amino-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)acrylamid (78a)

2-(3-Aminophenyl)-chinazolin **76b** (250 mg, 0.76 mmol) wurde gemäß Vorschrift **D2** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (1 % → 5 % MeOH/DCM) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **78a** (306 mg, 49 %) zu erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.31 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 10.4, 4.8 Hz, 2H), 7.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.32 (dd, 1H), 5.91 (s, 2H), 5.79 (d, 1H), 3.82 (d, 2H), 3.03 (t, 2H); **¹³C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.61, 159.54, 153.11, 140.27, 139.34, 132.42, 129.32, 128.85, 127.27, 126.53, 124.04, 123.55, 121.16, 119.41, 115.99, 105.17, 69.92, 64.18, 50.99, 42.54, 35.59; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₄N₅O[M+H]⁺: 409.1903, gefunden: 410.1974.

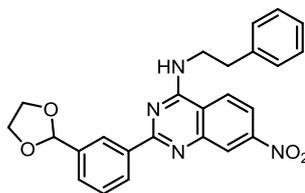
Synthese von 3-(4-Hydroxy-7-nitrochinazolin-2-yl)benzaldehyd (74c)

4-Nitroanthranilamid **4b** (2.0 g, 11.06 mmol) wurde gemäß Vorschrift **A2** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **74c** (2.9 g, 88 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13.11 (s, 1H), 10.12 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.49 (dd, $J = 4.7, 4.2$ Hz, 1H), 8.46 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.37 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.81 (t, $J = 13.7, 6.0$ Hz, 1H), 7.18 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 193.3, 172.6, 161.9, 154.3, 151.9, 149.5, 137.7, 137.0, 135.3, 134.2, 131.3, 130.3, 129.9, 128.8, 121.0.

Synthese von 2-(3-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-7-nitrochinazolin-4-ol (80)

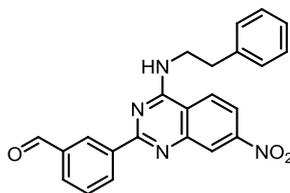
Aldehyd **74c** (1.0 g, 1 eq, 3.39 mmol) und *p*TsOH (57 mg, 0.1 eq, 0.34 mmol) wurden in Ethylenglykol (0.76 mL, 4 eq, 13.55 mmol) und PhMe (20 mL) gelöst und für 19 h unter Rückfluss und Verwendung einer DS erhitzt. Das Präzipitat wurde abfiltriert und mit PhMe und DCM gewaschen, um die beschriebene Zielsubstanz **80** (867 mg, 75 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13.01 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.23 (dd, $J = 12.7, 4.5$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.14 – 4.08 (m, 2H), 3.99 (dd, $J = 13.1, 6.1$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.1, 161.7, 154.6, 151.7, 149.5, 139.3, 132.5, 130.5, 129.1, 128.5, 126.7, 125.8, 122.8, 120.5, 102.7, 65.3.

Synthese von 2-(3-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-7-nitro-N-phenethylchinazolin-4-amin (81)



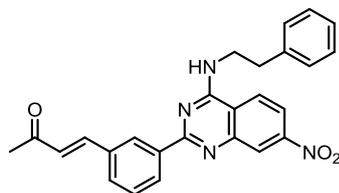
7-Nitrochinazolin **80** (867 mg, 2.56 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (305 % EtOAc/PE) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **81** (610 mg, 54 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.96 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.47 (s, 2H), 8.22 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 2H), 7.34 (m, 4H), 7.22 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.13 – 4.06 (m, 2H), 4.06 – 4.00 (m, 2H), 3.88 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H), 3.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160.9, 159.3, 150.1, 150.0, 139.4, 138.3, 137.9, 129.0, 128.8, 128.5, 128.4, 126.3, 126.2, 125.1, 122.9, 118.7, 117.5, 102.7, 64.9, 42.8, 34.4.

Synthese von 3-(7-Nitro-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)benzaldehyd (75c)



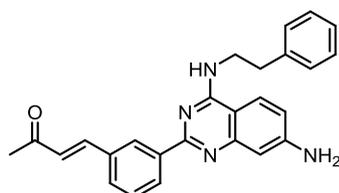
Das Acetal **81** (610 mg, 1 eq, 1.39 mmol) wurde in MeOH (10 mL) gelöst und HCl(aq) (1:2) hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde mit gesättigtem NaHCO₃(aq) ein pH von ca. 10 eingestellt, mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert, um die beschriebene Zielsubstanz **75c** (410 mg, 75 %) zu erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.14 (s, 1H), 9.39 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.66 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.77 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.93 – 3.86 (m, $J = 13.0, 5.8$ Hz, 2H), 3.10 – 3.04 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.2, 160.1, 159.4, 150.1, 149.9, 139.4, 138.8, 136.4, 133.7, 131.8, 129.4, 128.9, 128.7, 128.5, 126.2, 125.7, 122.8, 118.8, 117.7, 42.7, 34.4; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₃H₁₈N₄O₃ [M+H]⁺: 398.1379, gefunden: 399.1455.

Synthese von (E)-4-(3-(7-Nitro-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)but-3-en-2-on (82)



Benzaldehyd **75c** (70 mg, 0.18 mmol) wurde gemäß Vorschrift **G** umgesetzt, um die beschriebene Zielsubstanz **82** (50 mg, 65 %) zu erhalten, welches nachfolgend ohne weitere Reinigung benutzt wurde.

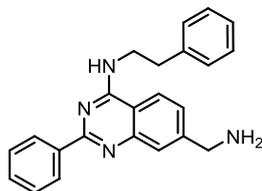
Synthese von 4-(3-(7-Amino-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)but-3-en-2-on (78b)



7-Nitrochinazolin **82** (50 mg, 0.14 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C2** umgesetzt und säulenchromatographisch an Kieselgel (1 % → 5 % MeOH/DCM) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **78b** (24 mg, 55 %) zu erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H), 8.57 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.51 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.37 – 7.32 (m, 2H), 7.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H), 7.06 (s, 1H), 6.85 (d, 1H), 6.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.82 (s, 1H), 4.22 (s, 2H), 4.01 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.08 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 198.8, 159.2, 143.9, 139.3, 135.8, 134.4, 131.0, 130.7, 129.8, 129.0, 128.8, 128.8, 128.5, 128.2, 127.9, 127.4, 126.8, 126.7, 126.0, 122.4, 116.3, 42.5, 35.6, 27.6; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₂₆H₂₅N₄O [M+H]⁺: 408.1950, gefunden: 409.2023.

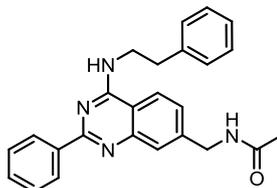
7.2.4 Synthese von Biotin-modifizierten LiPoLis

Synthese von 7-(Aminomethyl)-N-phenethyl-2-phenylchinazolin-4-amin (**8d**)

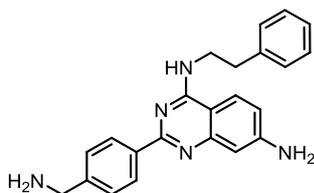


Chinazolin-7-carbonitril **68a** (120 mg, 0.34 mmol) wurde in 50 % MeOH/EtOAc gelöst und in einem H-Cube ProTM-Flussreaktor mit einer 30 × 4 mm 10 % Pd/C-Kartusche und einem H₂-Druck von 55 bar bei 70 °C und 1 mL/min umgesetzt. Säulenchromatographische Reinigung der erhaltenen Reaktionsmischung an Kieselgel (6 % → 10 % MeOH/DCM → 100 % MeOH) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **8d** (72 mg, 59 %). LCMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₃H₂₂N₄ [M+H]⁺: 355.19; gefunden: 355.44.

Synthese von N-((4-(Phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)methyl)acetamid (**8e**)

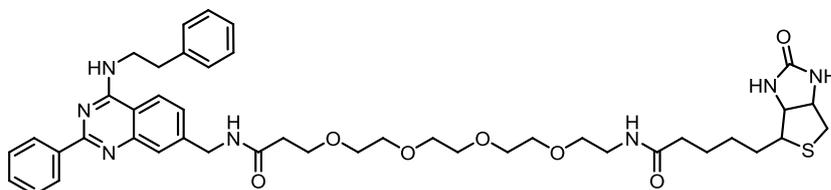


7-Aminomethylchinazolin **8d** (30 mg, 1 eq, 81.2 μmol) wurde in TEA (23 μL, 2 eq, 162 μmol) und THF (2 mL) gelöst und unter Rühren Ac₂O (23 μL, 3 eq, 244 μmol) bei rt hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei rt gerührt und nach Verdampfen des Lösungsmittels säulenchromatographisch an Kieselgel (2 % → 8 % MeOH/DCM) gereinigt, um die beschriebene Zielsubstanz **8e** (24 mg, 65 %) zu erhalten. LCMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₅H₂₄N₄O [M+2H]⁺: 398.20; gefunden: 398.72.

Synthese von 2-(4-(Aminomethyl)phenyl)-N⁴-phenethylchinazolin-4,7-diamin (3s)

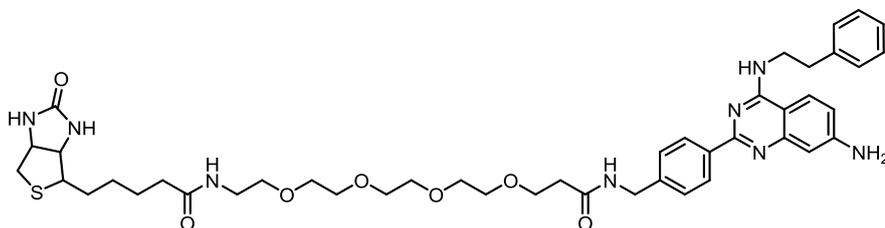
4-(7-Nitrochinazolin-2-yl)benzonnitril **75a** (370 mg, 0.94 mmol) wurde gemäß Vorschrift **C1** umgesetzt und das 4-(7-Aminochinazolin-2-yl)benzonnitril **76a** als Zwischenprodukt erhalten. Dieses wurde anschließend in 50 % MeOH/EtOAc unter Zugabe von 1 M HCl (kat.) gelöst und in einem H-Cube ProTM-Flussreaktor mit einer 30 × 4 mm 10 % Pd/C-Kartusche und einem H₂-Druck von 55 bar bei 70 °C und 1 mL/min weiter umgesetzt. Säulenchromatographische Reinigung der erhaltenen Reaktionsmischung an Kieselgel (5 % → 20 % MeOH/DCM) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **3s** (235 mg, 68 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.09 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 5H), 7.24 – 7.17 (m, 2H), 6.76 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.92 (br, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.79 (q, *J* = 14.2, 6.0 Hz, 2H), 3.01 (t, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.2, 158.7, 152.8, 152.0, 140.0, 139.4, 136.1, 128.8, 128.7, 128.5, 127.8, 126.2, 123.8, 115.6, 106.3, 104.8, 42.3, 42.1, 35.1.

Synthese von 1-(5-(2-Oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)-N-((4-(phenethylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)methyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadekan-15-amid (7f)



Zu einer Lösung aus Biotin-PEG₄-säure **19** (50.4 mg, 1 eq, 102.5 μmol) und HATU (42.9 mg, 1.1 eq, 112.8 μmol) in DIPEA (70 μL , 4 eq, 410.0 μmol) und THF (5 mL) wurde unter Rühren 7-Aminomethylchinazolin **8d** (40 mg, 1.1 eq, 112.8 μmol) in THF (1 mL) bei rt hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 2 h bei rt gerührt, anschließend mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % \rightarrow 10 % MeOH/DCM) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **7f** (49 mg, 49 %). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.57 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.51 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 8.44 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.86 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.54 – 7.46 (m, 3H), 7.36 (dd, $J = 8.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 4H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 4.45 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.32 – 4.24 (m, 1H), 4.13 – 4.06 (m, 1H), 3.87 (dd, $J = 14.3, 6.1$ Hz, 2H), 3.68 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.59 – 3.52 (m, 4H), 3.51 – 3.42 (m, 8H), 3.39 – 3.33 (m, 8H), 3.16 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.09 – 3.03 (m, 3H), 2.79 (dd, $J = 12.4, 5.1$ Hz, 1H), 2.56 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 2.46 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.2, 170.5, 162.8, 159.5, 159.4, 150.1, 144.6, 139.7, 138.8, 130.1, 128.8, 128.5, 128.3, 127.9, 126.2, 125.2, 124.7, 122.7, 112.6, 69.8, 69.8, 69.8, 69.7, 69.7, 69.6, 69.2, 66.9, 61.1, 59.2, 55.5, 42.5, 41.9, 38.5, 36.3, 35.1, 34.7, 28.3, 28.1, 25.3; **HRMS** (ESI-MS): Berechnet für C₄₄H₅₈N₇O₇S [M+H]⁺: 828.41129; gefunden: 828.41402.

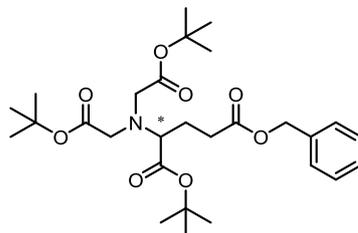
Synthese von *N*-(4-(7-Amino-4-(phenethylamino)chinazolin-2-yl)benzyl)-1-(5-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadekan-15-amid (3u**)**



Zu einer Lösung aus Biotin-PEG₄-säure **19** (84.5 mg, 1 eq, 172.0 μmol) und HATU (72 mg, 1.1 eq, 189.0 μmol) in DIPEA (120 μL, 4 eq, 688.0 μmol) und THF (5 mL) wurde unter Rühren 2-(4-(aminomethyl)phenyl)-chinazolin **3s** (70 mg, 1.1 eq, 189.0 μmol) in THF (1 mL) bei rt hinzugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 2 h bei rt gerührt, anschließend mit gesättigtem NaHCO₃(aq) und 10 % MeOH/DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % → 10 % MeOH/DCM) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **3u** (64 mg, 40 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.56 – 8.46 (m, 2H), 8.40 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 4.2, 1.4 Hz, 1H), 8.05 – 7.96 (m, 2H), 7.94 – 7.85 (m, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.33 – 7.29 (m, 4H), 7.21 (ddd, *J* = 8.6, 6.2, 2.7 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.3, 4.2 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 28.0 Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.34 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 4.30 – 4.25 (m, 1H), 4.12 – 4.07 (m, 1H), 3.78 (dd, *J* = 14.7, 6.0 Hz, 1H), 3.65 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.50 (s, 2H), 3.50 – 3.44 (m, 8H), 3.38 (s, 8H), 3.36 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.18 – 3.13 (m, 1H), 3.09 – 3.03 (m, 1H), 3.03 – 2.98 (m, 1H), 2.79 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 2.42 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 1.62 (s, 1H), 1.61 – 1.54 (m, 1H), 1.53 – 1.38 (m, 3H), 1.36 – 1.20 (m, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.6, 170.7, 166.9, 163.2, 159.5, 153.1, 152.4, 144.8, 141.5, 140.4, 139.6, 134.8, 129.2, 128.9, 128.1, 127.3, 126.9, 126.6, 118.5, 106.7, 105.2, 70.2 (d, *J* = 4.6 Hz), 70.2 (d, *J* = 4.6 Hz), 70.0 (d, *J* = 5.0 Hz), 69.6, 67.4, 61.5, 59.6, 55.9, 42.7, 42.3, 38.9, 36.6, 35.5, 28.7, 28.5, 25.7; HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₄₄H₅₉N₈O₇S [M+H]⁺: 843.42219; gefunden: 843.42400.

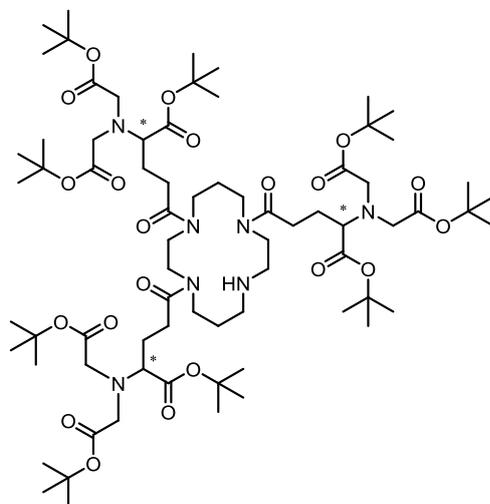
7.2.5 Synthese von trisNTA

Synthese von 5-Benzyl 1-(*tert*-butyl) 2-(bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-213-pentandioat (26)



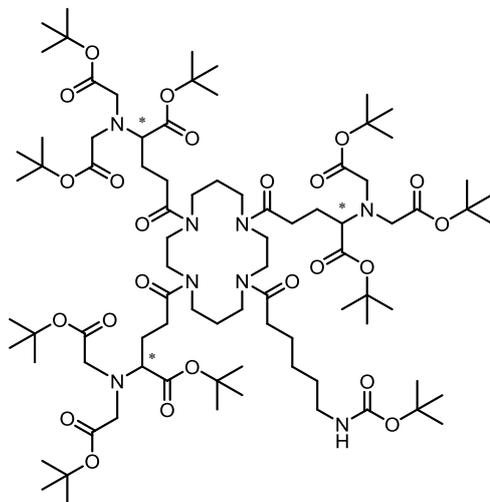
5-Benzyl-1-(*tert*-butyl)-2-amino-2 λ^3 -pentandioat-Hydrochlorid **24** (2.2 g, 1 eq, 6.67 mmol) wurde in *tert*-Butyl 2-bromoacetat **25** (5.2 g, 4 eq, 29.99 mmol), DIPEA (5.67 mL, 5 eq, 37.49 mmol) und DMF (20 mL) in einem mit N₂ gespültem Reaktionsgefäß gelöst und für 20 h bei 55 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand in EtOAc aufgenommen, die filtriert und mit 25 % EtOAc/Cy gewaschen. Säulenchromatographische Reinigung des Filtrats an Kieselgel (5 % → 20 % EtOAc/PE) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **26** (2.1 g, 60 %) als gelbes Öl. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.44 – 7.23 (m, 5H), 5.07 (s, 2H), 3.37 (s, 4H), 3.33 (s, 1H), 2.72 – 2.52 (m, 2H), 1.92 – 1.66 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.37 (s, 18H); HRMS (ESI-MS): Berechnet für C₂₈H₄₄NO₈ [M+H]⁺: 522.30614; gefunden: 522.30626.

Synthese von Hexa-tert-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan-1,4,8-triyl)tris(1-(tert-butoxy)-1,5-dioxo-2λ³-pentan-5,2-diyl))tris(azantriyl))hexaacetat (29)



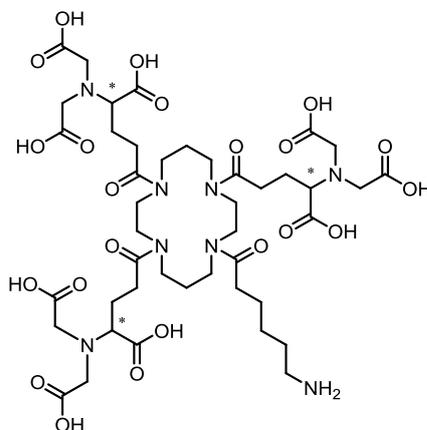
Startmaterial **27** (1.7 g, 3 eq, 3.94 mmol) wurde in 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradekan **28** (264 mg, 1 eq, 1.31 mmol) und trockenem DCM (10 mL) gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von TBTU (1.7 g, 4 eq, 5.25 mmol) und DIPEA (1.34 mL, 6 eq, 7.88 mmol) und Rühren der Reaktionsmischung für 19 h bei rt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Extraktion mit Wasser und DCM sowie Waschen mit gesättigter NaCl(aq) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (100 % EtOAc → 10 % MeOH/DCM) die beschriebene Zielsubstanz **29** (1.52 g, 81 %) erhalten werden. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 3.58 – 3.31 (m, 27H), 2.84 (s, $J = 15.4$ Hz, 2H), 2.79 (s, 8H), 2.15 – 1.78 (m, 11H), 1.45 (s, 27H), 1.41 (s, 54H).

Synthese von **Hexa-tert-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(6-((tert-butoxycarbonyl)amino)hexanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan-1,4,8-triyl)tris(1-(tert-butoxy)-1,5-dioxo-2 λ^3 -pentan-5,2-diyl))tris(azantriyl))hexaacetat (31)**



Startmaterial **29** (1.5 g, 1 eq, 1.04 mmol) und 6-((tert-Butoxycarbonyl)amino)hexansäure **30** (266 mg, 1.1 eq, 1.15 mmol) wurden in trockenem DCM (10 mL) gelöst bevor TBTU (468 mg, 1.4 eq, 1.46 mmol) und DIPEA (355 μ L, 2 eq, 2.08 mmol) hinzugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde 12 h bei rt gerührt, nach Beendigung das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand mit Wasser und DCM extrahiert. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (80 % EtOAc/PE) lieferte die beschriebene Zielsubstanz **31** (1.43 g, 83 %). R_f (100 % EtOAc) = 0.3; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 5.28 (s, 2H), 3.68 (q, $J = 7.0$ Hz, 6H), 3.51 – 3.35 (m, 32H), 2.78 (s, 6H), 2.13 (s, 8H), 1.67 – 1.55 (m, 9H), 1.43 (s, $J = 6.9$ Hz, 27H), 1.40 (s, 54H), 1.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H).

Synthese von 2,2',2'',2'''-(((4-(6-Aminohexanoyl)-8-(4-(bis(carboxymethyl)amino)-5-(tert-butoxy)-5-oxo-4l3-pentanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan-1,11-diyl)bis(1-carboxy-4-oxo-1l3-butan-4,1-diyl))bis(azantriyl))tetraessigsäure (23)



Startmaterial **31** (500 mg, 1 eq, 3.05 mmol) wurde in TFA (5 mL) gelöst und unter Rühren bei rt eine Lösung aus 5 % v/v H₂O und 5 % v/v TIS in TFA (500 µL) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 4 h bei rt gerührt und das Lösungsmittel mit DCM (20 mL) koevaporiert, der Rückstand in einem kleinen Volumen TFA aufgenommen und mit kaltem Et₂O versetzt. Das Präzipitat wurde abfiltriert und mit kaltem Et₂O gewaschen, um die beschriebene Zielsubstanz **23** (251 mg, 50 %) als weißes TFA-Salz zu erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.98 (s, 9H), 3.64 – 3.24 (m, 33H), 2.78 (s, 2H), 2.39 – 2.21 (m, 2H), 1.97 – 1.63 (m, 9H), 1.53 (dd, *J* = 13.1, 7.8 Hz, 4H), 1.44 – 1.35 (m, 4H), 1.36 – 1.22 (m, 2H), 1.09 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H).

7.3 Mutagenese, Proteinexpression und -reinigung

Mutagenese, Expression und Reinigung der verwendeten Proteine wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.^[36] Kurz dargestellt wurden die mit N-terminalem His₆-tag versehenen p38 α -Konstrukte (WT, K249C, S251C, S252C und D294C) mittels ortsgerichteter Mutagenese basierend auf dem WT-Konstrukt erzeugt. Konstrukte für p38 α WT sowie der Mutanten wurden anschließend in chemisch kompetente BL21(DE3) *Escherichia coli* transformiert, exprimiert und gereinigt.^[36] Überexpression wurde über Nacht (20 h) bei 18 °C unter Schütteln bei 160 rpm durchgeführt. Danach wurde das jeweilige Zielprotein über Ni-Affinitäts-, Anionenaustausch- und schließlich Größenausschlusschromatographie gereinigt, nachdem eine proteolytische Spaltung des His₆-tags stattfand. Anschließend wurde das Protein auf ca. 20 mg/mL konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Für die spätere Verwendung von p38 α WT in SPR-Messungen fand während der Reinigung keine Abspaltung des Affinitäts-tags statt.

7.3.1 Aminosäuresequenzen der verwendeten p38 α -Konstrukte

In den aufgeführten Sequenzen sind Mutationspositionen gelb unterlegt, der His₆-tag rot und die Thrombin-Spaltstelle blau markiert. Für p38 α WT ist die komplette Sequenz angegeben, während für die Mutanten lediglich der Abschnitt mit der veränderten Aminosäuresequenz gezeigt ist. Zählung der Aminosäuren beginnt jeweils nach der Thrombin-Spaltstelle.

p38 α WT

		MGSS	HHHH	HHSFITSLYK	KAGF	LVPRGS
<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>		
HSQERPTFYR	QELNKTIWEV	PERYQNLSPV	GSGAYGSVCA	AFDTKTGLRV		
<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>		
AVKKLSRPFQ	SIIHAKRTYR	ELRLLKHKMH	ENVIGLLDVF	TPARSLEEFN		
<u>110</u>	<u>120</u>	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>		
DVYLVTHLMG	ADLNNIVKCQ	KLTDDHVQFL	IYQILRGLKY	IHSADIIHRD		
<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>	<u>190</u>	<u>200</u>		
LKPSNLAVNE	DCELKILDFG	LARHTDDEMT	GYVATRKYRA	PEIMLNWMHY		
<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>		
NQTVDIWSVG	CIMAELLTGR	TLFPGTDHID	QLKLILRLVG	TPGAELLKKI		
<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>		
SSESARNYIQ	SLTQMPKMNF	ANVFIGANPL	AVDLLEKMLV	LDSDKRITAA		
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>		
QALAHAYFAQ	YHDPDDEPVA	DPYDQSFESR	DLLIDEWKSL	TYDEVISFVP		
<u>360</u>						
PPLDQEEMES						

p38 α K249C

<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>
NQTVDIWSVG	CIMAELLTGR	TLFPGTDHID	QLKLILRLVG	TPGAELLKCI
<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
SSESARNYIQ	SLTQMPKMNF	ANVFIGANPL	AVDLLEKMLV	LDSDKRITAA

p38 α S251C

<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>
NQTVDIWSVG	CIMAELLTGR	TLFPGTDHID	QLKLILRLVG	TPGAELLKKI
<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
CSSESARNYIQ	SLTQMPKMNF	ANVFIGANPL	AVDLLEKMLV	LDSDKRITAA

p38 α S25C

<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>
NQTVDIWSVG	CIMAELLTGR	TLFPGTDHID	QLKLILRLVG	TPGAELLKKI
<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
SCSESARNYIQ	SLTQMPKMNF	ANVFIGANPL	AVDLLEKMLV	LDSDKRITAA

p38 α D294C

<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>
NQTVDIWSVG	CIMAELLTGR	TLFPGTDHID	QLKLILRLVG	TPGAELLKKI
<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
SSESARNYIQ	SLTQMPKMNF	ANVFIGANPL	AVDLLEKMLV	LDSCKRITAA

7.4 Phosphorylierung von p38 α und Kinase-Titration

Folgende Pufferlösungen wurden für die Aktivierung und Aktivitätsbestimmung der hergestellten p38 α -Konstrukte verwendet:

Aktivierungspuffer

50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.001 % Tween[®] 20, pH 7.4

Lagerpuffer

20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 5 % Glycerol, pH 7.1

5x HTRF[®]-Puffer

250 mM HEPES, 0.1 % NaN₃, 0.05 % BSA, 0.5 mM Orthovanadat, pH 7.0

Assaypuffer

1x HTRF[®]-Puffer, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 0.01 % Tween[®] 20, 1 mM DTT

Detektionspuffer

50 mM HEPES, 0.1 % BSA, 0.8 M KF, 20 mM EDTA, pH 7.0

7.4.1 Phosphorylierung von p38 α mit MKK6

Die Aktivierung von p38 α WT und -Mutanten erfolgte durch Inkubation mit konstitutiv aktiver MKK6 S207E/T211E. Hierzu wurden jeweils 20 μ M jedes p38 α -Variante und 50 nM MKK6 in Aktivierungspuffer mit 1 mM ATP für 90 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde eine Dialyse gegen Lagerpuffer über Nacht (21 h) bei 4 °C durchgeführt, um restliches ATP zu entfernen. Die erhaltenen Stammlösungen betragen eine Proteinkonzentration von ca. 0.2 mg/mL und wurden bis zum weiteren Gebrauch für die Aktivitäts-basierten Messungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

7.4.2 Kinase-Titration mit HTRF®-Assay

Jeweils für p38 α WT, K249C, S251C, S252C und D294C wurden 0.1 – 10 ng/*well* in Mikrotiterplatten gegeben (inklusive je einem *well* ohne Kinase), wobei jeweils 5 μ L einer 2 μ g/mL Kinase-Lösung in Assaypuffer für die höchste Konzentration der Verdünnungsreihe benutzt wurden. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 5 μ L ATP/Substrat-Lösung in Assaypuffer (100 μ M ATP, 1 μ M ATF2-GST-Substratpeptid gestartet und der Ansatz für 30 min bei rt in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurden 10 μ L Detektionslösung in Detektionspuffer (1 nM anti-GST-XL665 Ab, 125 nM anti-phospho-ATF2 Ab) hinzugegeben und für weitere 60 min inkubiert. Schließlich erfolgte das Auslesen der Platten durch Messung der Fluoreszenz bei Emissionswellenlängen von 620 nm (anti-phospho-ATF2 Ab) und 665 nm (anti-GST-XL665) 60 μ s nach Anregung bei 317 nm. Das Verhältnis beider Intensitäten wurde berechnet und gegen die jeweilige Kinasekonzentration aufgetragen.

7.5 Biophysikalische Methoden

7.5.1 *Microscale*-Thermophorese

Zunächst wurde eine Fluoreszenzmarkierung von p38 α WT durchgeführt. Hierfür wurden 20 μ M Protein mit 10 μ M NT-647-Maleimid in PBS-T für 1 h auf Eis inkubiert und die Kinase anschließend mit der Säule B des Markierungskits gereinigt, wobei der zuvor verwendete Puffer als Elutionspuffer genutzt wurde.

Eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Analyten in PBST (+ 3 % DMSO) 9.16 nM bis 300 μ M wurde angesetzt, wobei zuvor eine entsprechende Vorverdünnung der zu testenden Substanzen (10 mM in DMSO) in DMSO hergestellt wurde, um eine Endkonzentration von 3 % DMSO in den finalen Proben nicht zu überschreiten. Anschließend wurden 10 μ L NT-167-p38 α WT in PBS-T zu den Proben gegeben, sodass bei einem Endvolumen von jeweils 20 μ L eine finale Analytkonzentrationen von 4.58 nM - 150 μ M und eine finale Proteinkonzentration von 50 nM erreicht wurden. Vor der Messung wurden die Proben für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die MST-Kapillaren mit insgesamt 16 Proben pro Analyt beladen.

Die Messung der Proben erfolgte durch Erhitzen innerhalb von 5 s (von 20 nach 23 °C) und MST-Monitoring über 30 s (MST Anregungsleistung: 40 %, rt). Analyse der Daten erfolgte mit der MO.Affinity Analysis Software (v2.1.2030, NanoTemper).

7.5.2 Bio-Layer-Interferometrie

Zunächst wurde eine Biotinylierung von p38 α WT durchgeführt. Hierfür wurde gemäß Vorschrift des Herstellers (Thermo) p38 α WT in PBS-T entsprechend verdünnt, mit Sulfo-NHS-Biotin inkubiert und anschließend entsalzt und gereinigt.

Die nach einem *loading scout* bestimmte optimale Beladung der Sensoren mit Biotin-p38 α WT betrug 100 μ g/mL und ergab nach Blocken der freien Streptavidin-Bindungsstellen mit Biocytin (Pall ForteBio) ein Immobilisierungslevel von ca. 9 nm. Analyten (10 mM in DMSO) wurden in einer Verdünnungsreihe von 125 nM - 1 μ M für SB203580, bzw. 1.25 – 10 μ M für LiPoLi, in PBS-T angesetzt, sodass eine finale Konzentration von 2 % DMSO erhalten wurde, und anschließend jeweils 200 μ L der Lösungen in 96-well-Messplatten vorgelegt.

Für die Messung der Proben wurden 16 Sensoren beladen, acht davon dienten als „aktive“ Sensoren: Auf sieben Oberflächen wurde Biotin-p38 α WT immobilisiert, während ein Sensor lediglich mit Biocytin geblockt wurde, um als Referenzoberfläche (Driftkontrolle) zu dienen. Acht weitere Sensoren wurden mit Biotin geblockt und parallel zu den „aktiven“ Sensoren gemessen, um eine Doppelreferenzierung zu ermöglichen (NSB-Kontrolle). Zur Messung der Assoziation wurden die Sensoren für jeweils 2 min in die Analyt-Proben getaucht und anschließend zur Bestimmung der Dissoziation für 5 min in PBS-T (+ 3 % DMSO) getaucht.

Im Rahmen der Analyse der Daten erfolgten die Doppelreferenzierung des erhaltenen Signals auf den „aktiven“ Sensoren, Korrektur der Basislinie, *inter-step*-Korrektur, Angleichen an Dissoziation und schließlich das Anlegen eines globalen 1:1-Langmuir Fit-Modells.

Für die *vice versa*-Charakterisierung mit dem biotinylierten LiPoLi **3u** wurde ein Immobilisierungslevel von 0.5 nm erreicht und die Biosensoren für die Messung analog zu der obigen Vorschrift beladen. p38 α WT wurde als Analyt in Konzentrationen von 1.56 - 50 μ M in PBS-T eingesetzt. Messung und Analyse der Daten erfolgte wie oben beschrieben.

7.5.3 Thermal-Shift-Assay

Schmelzkurven von p38 α WT wurden bei jeweils zwei Analyt-Konzentrationen (10, 50 μ M) gemessen. Hierfür wurden die Analyten (10 mM Stammlösungen in DMSO) auf 0.5 mM, bzw. 2.5 mM, verdünnt und jeweils 0.8 μ L auf eine Messplatte gegeben. Zusätzlich zu den Analyten wurden Kavitäten mit DMSO und Wasser als Negativkontrollen belegt. p38 α WT wurde in Probenpuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5x SYPRO[®] Orange, pH 7.5) auf 1 μ M verdünnt und fortan vor Licht geschützt. Jeweils 39 μ L Kinase wurden in die Kavitäten der Messplatte gegeben und die Proben gemischt. Nachdem die Platten mit optischer Folie verschlossen und zentrifugiert wurden, erfolgte die Messung in einem *Real-Time* Thermocycler. Bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge bei 610 nm wurden während einer Temperaturerhöhung von 25 °C bis 95 °C (1 °C/min) die Schmelzkurven aufgenommen. Der jeweilige Thermal-Shift ΔT_m wurde nach Abzug des Schmelzpunktes der Proben in Gegenwart von DMSO bestimmt.

7.5.4 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Für sämtliche Experimente wurden PBS-T (+ 2 % DMSO) als SPR-Assaypuffer und *High Capacity Amine* (HCA)-Sensoren (Sierra Sensors) verwendet.

7.5.4.1 Immobilisierungsstrategie mit NeutrAvidin

Zunächst wurde eine Vorbehandlung der unmodifizierten Sensoren mit alternierenden Injektionen von 1 M HCl und Elutionspuffer (1 M NaCl, 10 mM NaOH) für jeweils 5 min bei 20 μ L/min durchgeführt. Aktivierung der Sensoren erfolgte mit 0.05 M EDC/0.4 M NHS, anschließende Modifizierung mit 5 μ g/mL NAv in 10 mM NaOAc (pH 5.0) und Blocken der Oberfläche mit 1 M Ethanolamin (pH 8.5) für jeweils 7 min bei 20 μ L/min. Auf diese Weise wurde bzgl. NAv ein Immobilisierungslevel von 4000 - 6000 RU erzielt.

Immobilisierung von 5 μ g/mL Biotin-p38 α WT (Herstellung siehe Kapitel 7.5.2) in PBS-T erfolgte durch schrittweise Injektion des Liganden für jeweils 30 s bei 20 μ L/min bis ein Immobilisierungslevel von ca. 4000 RU erreicht wurde.

Analog wurde für die Immobilisierung des biotinylierten LiPoLi **3u** verfahren, indem schrittweise 20 μM **3u** in PBS-T für 30 s bei 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert und ein Immobilisierungslevel von ca. 10 - 20 RU erzielt wurden.

7.5.4.2 Immobilisierungsstrategie mit trisNTA

Die Synthese von trisNTA wurde gemäß Vorschrift in Kapitel 7.2.5 durchgeführt. Herstellung von trisNTA-Sensoren geschah außerhalb des Geräts in separaten Petrischalen, indem die Sensoroberfläche zunächst mit 0.05 M EDC/0.4 M NHS, mit 100 mM trisNTA in K_2CO_3 (pH 9.0) modifiziert und anschließend zum Blocken mit 1 M Ethanolamin (pH 8.5) für jeweils 8 min inkubiert wurde. Zwischen diesen Schritten wurde die Sensoroberfläche mit ddH₂O gespült.

Für die Immobilisierung der Liganden erfolgte zunächst die Injektion von 200 μM $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ für 7 min bei 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ und darauffolgend von 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ His₆-p38 α WT in PBS-T (wenn nötig schrittweise) bis ein Immobilisierungslevel von ca. 3000 - 4000 RU erreicht wurde. Analog wurde (wenn nötig) auf die Referenzoberfläche 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ His₆-Peptid injiziert, bis ein Immobilisierungslevel von ca. 20 - 100 RU erreicht wurde. Mit der Injektion der Analyten wurde fortgefahren, sobald die modifizierten Oberflächen einen konstanten Drift von maximal 2 RU/min aufwiesen.

Nach Beendigung des Assays wurde durch (mehrfache) Injektion von 0.5 M EDTA für 2 min bei 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ die trisNTA-Oberfläche der Sensoren regeneriert werden

7.5.4.3 Allgemeines Assayprotokoll

Eine Verdünnungsreihe von LiPoLis (200 nM - 6 μ M, bzw. 1 - 30 μ M) und SB203580 als Referenzverbindung (0.1 nM - 2.5 μ M) wurden angesetzt, wobei jeweils eine Konzentration von 2 % DMSO (entspricht der Konzentration im SPR-Assaypuffer) in den Proben erreicht wurde. Analytinjektionen für LiPoLis erfolgten für 150 s, gefolgt von 300 s Dissoziation, für SB203580 für 240 s Injektion, gefolgt von 360 s Dissoziation. Pufferinjektionen zur späteren Referenzierung erfolgten zwischen den Analytinjektionen. Eine DMSO-Kalibrierung wurde mit 10 μ L Injektionen von 1.8 - 2.2 % DMSO in SPR-Assaypuffer durchgeführt. Analyse und Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit Analyser R2 (v0.2.3.8, Sierra Sensors) und umfasste Doppelreferenzierung der erhaltenen Sensorgramme der „aktiven“ Sensoren, *inter-step*-Korrektur, Kalibrierung gegen das Ko-Solvent und schließlich das Anlegen eines globalen 1:1-Langmuir Fit-Modells.

7.6 Proteinkristallisation

Reversibel und kovalent bindende LiPoLis sowie diverse p38 α -Kinaseinhibitoren wurden mit entsprechenden p38 α -Konstrukten unter ähnlichen Bedingungen ko-kristallisiert, wie zuvor andernorts beschrieben.^[268] Zunächst wurden 40 μ L p38 α (10 mg/mL, WT oder Mutanten) mit 1 μ L LiPoLi (50 mM in DMSO) für 60 min auf Eis inkubiert, um die jeweiligen Protein-Liganden-Komplexe herzustellen. Die Proben wurden für 10 min zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C), um überschüssigen und/oder präzipitierten Liganden zu entfernen. Auf 15-*well*-Kristallisationsplatten wurden Kristalle nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen angesetzt, indem 1.5 μ L Protein-Ligand-Lösung mit 0.5 μ L Reservoir-Lösung (100 mM MES, 20 - 30 % PEG4000, 50 mM BOG, pH 5.7 - 6.6) gemischt wurden. In einigen Fällen wurden Kristalle erhalten, wenn BOG nicht in der Reservoir-Lösung enthalten war²³ oder beim Ansetzen der Tropfen durch 0.1 μ L BIRB 796²⁴ (10 mM in DMSO) ersetzt wurde. Kristalle wurden mit 25 % PEG400 kryogeschützt bevor sie in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden.

²³ Protein-Liganden-Komplex p38 α WT-3f

²⁴ Protein-Liganden-Komplex p38 α WT-3l

Diffractions-Datensätze der p38 α -Liganden-Komplexe wurden an der PXII X10SA *beamline* der Swiss Light Source (PSI, Villigen, Schweiz) mit Pilatus 6MF-Detektor bei 90 K und Wellenlängen nahe 1 Å gemessen.²⁵ Die Datensätze wurden mit XDS^[269], bzw. iMOSFLM^[270], integriert und mit XSCALE^[269], bzw. SCALA^[271], skaliert. Die Komplex-Strukturen wurden mittels molekularem Ersatz mit PHASER^[272] gelöst, indem die veröffentlichte Struktur von p38 α WT-3b (PDB: 4DLI)^[103] als Templat genutzt wurde. Moleküle der asymmetrischen Einheit wurden mit Hilfe von COOT^[273] manuell modifiziert. Die finale Verfeinerung erfolgte mit Hilfe von REFMAC^[274] und PHENIX.REFINE^[275]. Dateien mit den Topologie-Informationen der Liganden wurden unter Verwendung des Dundee PRODRG-Servers^[276] erstellt. Die verfeinerten Strukturen wurden über Analyse des Ramachandran-Plots mittels RAMPAGE^[277] validiert. Pymol^[278] wurde zur Darstellung der verfeinerten Modelle in den Abbildungen in dieser Thesis verwendet.

7.7 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden Stammlösungen der jeweiligen p38 α -Konstrukte (WT und Mutanten) in 1x PBS auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. Die entsprechenden Protein-Lösungen wurden mit dreifachem Überschuss der beschriebenen, zu testenden Substanzen (10 mM in DMSO), bzw. mit gleichen Volumina DMSO als Negativkontrolle, für 1 h auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend mittels ESI-MS analysiert (Velos Pro Ionenfallen-Massenspektrometer, Thermo Scientific). Die säulenchromatographische Auftrennung der Proben erfolgte an einer C18-Säule (EC 50/3 Nucleodur 1.8 μ m, Macherey-Nagel) (20 % \rightarrow 90 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % HCOOH)). Ein Massenbereich von 700 - 2000 m/z wurde analysiert und die Rohdaten unter Verwendung von MAGTRAN^[279] und PROMASS DECONVOLUTIONTM (Thermo) dekonvolutiert.

ESI-MS/MS-Proben wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte SDS-PAGE, Bearbeitung des Gels (Waschen, Reduktion, Alkylierung) und tryptischer Verdau.^[280] Die weitere Probenbearbeitung und Charakterisierung der Peptidfragmente mittels Tandem-MS wurde von Petra Janning durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit MAXQUANT.^[281]

²⁵ Ausnahme: Die Kristalle im Komplex mit **100h** wurde an der P11 *beamline* der PETRA III in Hamburg gemessen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, "The protein kinase complement of the human genome", *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
- [2] M. Rabiller, M. Getlik, S. Klüter, A. Richters, S. Tückmantel, J. R. Simard, D. Rauh, "Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases", *Archiv der Pharmazie* **2010**, 343, 193-206.
- [3] T. Hunter, "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling", *Cell* **1995**, 80, 225-236.
- [4] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, "Cell signaling by receptor tyrosine kinases", *Cell* **2010**, 141, 1117-1134.
- [5] L. Chang, M. Karin, "Mammalian MAP kinase signalling cascades", *Nature* **2001**, 410, 37-40.
- [6] P. Blume-Jensen, T. Hunter, "Oncogenic kinase signalling", *Nature* **2001**, 411, 355-365.
- [7] D. S. Krause, R. A. Van Etten, "Tyrosine kinases as targets for cancer therapy", *The New England journal of medicine* **2005**, 353, 172-187.
- [8] S. Lapenna, A. Giordano, "Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer", *Nature reviews. Drug discovery* **2009**, 8, 547-566.
- [9] A. Bellacosa, C. C. Kumar, A. Di Cristofano, J. R. Testa, "Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting", *Advances in cancer research* **2005**, 94, 29-86.
- [10] D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase", *Science* **1991**, 253, 407-414.
- [11] S. B. Hari, E. A. Merritt, D. J. Maly, "Sequence determinants of a specific inactive protein kinase conformation", *Chemistry & biology* **2013**, 20, 806-815.
- [12] L. M. Toledo, N. B. Lydon, D. Elbaum, "The structure-based design of ATP-site directed protein kinase inhibitors", *Current medicinal chemistry* **1999**, 6, 775-805.
- [13] Y. Liu, N. S. Gray, "Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations", *Nature chemical biology* **2006**, 2, 358-364.
- [14] L. N. Johnson, R. J. Lewis, "Structural basis for control by phosphorylation", *Chemical reviews* **2001**, 101, 2209-2242.
- [15] D. K. Treiber, N. P. Shah, "Ins and outs of kinase DFG motifs", *Chemistry & biology* **2013**, 20, 745-746.
- [16] M. Huse, J. Kuriyan, "The conformational plasticity of protein kinases", *Cell* **2002**, 109, 275-282.
- [17] S. S. Taylor, A. P. Kornev, "Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins", *Trends Biochem. Sci.* **2011**, 36, 65-77.
- [18] J. A. Endicott, M. E. Noble, L. N. Johnson, "The structural basis for control of eukaryotic protein kinases", *Annual review of biochemistry* **2012**, 81, 587-613.
- [19] A. P. Kornev, N. M. Haste, S. S. Taylor, L. F. Eyck, "Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 17783-17788.
- [20] A. P. Kornev, S. S. Taylor, L. F. Ten Eyck, "A helix scaffold for the assembly of active protein kinases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 14377-14382.
- [21] V. Rusch, J. Baselga, C. Cordon-Cardo, J. Orazem, M. Zaman, S. Hoda, J. McIntosh, J. Kurie, E. Dmitrovsky, "Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung", *Cancer research* **1993**, 53, 2379-2385.
- [22] C. R. Bartram, A. de Klein, A. Hagemeyer, T. van Agthoven, A. Geurts van Kessel, D. Bootsma, G. Grosveld, M. A. Ferguson-Smith, T. Davies, M. Stone, et al., "Translocation

- of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia", *Nature* **1983**, *306*, 277-280.
- [23] S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G. Muhammad Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, Y. Kitamura, "Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors", *Science* **1998**, *279*, 577-580.
- [24] D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, W. L. McGuire, "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene", *Science* **1987**, *235*, 177-182.
- [25] S. Kumar, J. Boehm, J. C. Lee, "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases", *Nature reviews. Drug discovery* **2003**, *2*, 717-726.
- [26] J. L. Adams, A. M. Badger, S. Kumar, J. C. Lee, "p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines", *Progress in medicinal chemistry* **2001**, *38*, 1-60.
- [27] Z. Han, D. L. Boyle, K. R. Aupperle, B. Bennett, A. M. Manning, G. S. Firestein, "Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1999**, *291*, 124-130.
- [28] M. Funayama, K. Hasegawa, E. Ohta, N. Kawashima, M. Komiyama, H. Kowa, S. Tsuji, F. Obata, "An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family", *Annals of neurology* **2005**, *57*, 918-921.
- [29] M. J. Lindhurst, J. C. Sapp, J. K. Teer, J. J. Johnston, E. M. Finn, K. Peters, J. Turner, J. L. Cannons, D. Bick, L. Blakemore, C. Blumhorst, K. Brockmann, P. Calder, N. Cherman, M. A. Deardorff, D. B. Everman, G. Golas, R. M. Greenstein, B. M. Kato, K. M. Keppler-Noreuil, S. A. Kuznetsov, R. T. Miyamoto, K. Newman, D. Ng, K. O'Brien, S. Rothenberg, D. J. Schwartzentruber, V. Singhal, R. Tirabosco, J. Upton, S. Wientroub, E. H. Zackai, K. Hoag, T. Whitewood-Neal, P. G. Robey, P. L. Schwartzberg, T. N. Darling, L. L. Tosi, J. C. Mullikin, L. G. Biesecker, "A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome", *The New England journal of medicine* **2011**, *365*, 611-619.
- [30] S. Müller, A. Chaikuad, N. S. Gray, S. Knapp, "The ins and outs of selective kinase inhibitor development", *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 818-821.
- [31] F. Filomia, F. De Rienzo, M. C. Menziani, "Insights into MAPK p38alpha DFG flip mechanism by accelerated molecular dynamics", *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*, 6805-6812.
- [32] M. Getlik, C. Grütter, J. R. Simard, H. D. Nguyen, A. Robubi, B. Aust, W. A. van Otterlo, D. Rauh, "Structure-based design, synthesis and biological evaluation of N-pyrazole, N'-thiazole urea inhibitors of MAP kinase p38alpha", *European journal of medicinal chemistry* **2012**, *48*, 1-15.
- [33] J. Zhang, F. J. Adrian, W. Jahnke, S. W. Cowan-Jacob, A. G. Li, R. E. Iacob, T. Sim, J. Powers, C. Dierks, F. Sun, G. R. Guo, Q. Ding, B. Okram, Y. Choi, A. Wojciechowski, X. Deng, G. Liu, G. Fendrich, A. Strauss, N. Vajpai, S. Grzesiek, T. Tuntland, Y. Liu, B. Bursulaya, M. Azam, P. W. Manley, J. R. Engen, G. Q. Daley, M. Warmuth, N. S. Gray, "Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors", *Nature* **2010**, *463*, 501-506.
- [34] H. Daub, K. Godl, D. Brehmer, B. Klebl, G. Müller, "Evaluation of kinase inhibitor selectivity by chemical proteomics", *Assay and drug development technologies* **2004**, *2*, 215-224.
- [35] R. A. Norman, D. Toader, A. D. Ferguson, "Structural approaches to obtain kinase selectivity", *Trends in pharmacological sciences* **2012**, *33*, 273-278.
- [36] J. R. Simard, S. Klüter, C. Grütter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh, "A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc", *Nature chemical biology* **2009**, *5*, 394-396.
- [37] R. Roskoski, Jr., "Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes", *Pharmacological research* **2016**, *103*, 26-48.

- [38] F. Solca, G. Dahl, A. Zoephel, G. Bader, M. Sanderson, C. Klein, O. Kraemer, F. Himmelsbach, E. Haaksma, G. R. Adolf, "Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2012**, *343*, 342-350.
- [39] T. Pawson, J. D. Scott, "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins", *Science* **1997**, *278*, 2075-2080.
- [40] M. C. Good, J. G. Zalatan, W. A. Lim, "Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information", *Science* **2011**, *332*, 680-686.
- [41] W. Kolch, "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors", *Nature reviews. Molecular cell biology* **2005**, *6*, 827-837.
- [42] D. D. Stuart, W. R. Sellers, "Targeting RAF-MEK-ERK kinase-scaffold interactions in cancer", *Nature medicine* **2013**, *19*, 538-540.
- [43] J. Rauch, N. Volinsky, D. Romano, W. Kolch, "The secret life of kinases: functions beyond catalysis", *Cell communication and signaling : CCS* **2011**, *9*, 23.
- [44] Z. Weihua, R. Tsan, W. C. Huang, Q. Wu, C. H. Chiu, I. J. Fidler, M. C. Hung, "Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity", *Cancer cell* **2008**, *13*, 385-393.
- [45] H. Zhu, X. Cao, F. Ali-Osman, S. Keir, H. W. Lo, "EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity", *Cancer letters* **2010**, *294*, 101-110.
- [46] S. Lim, Y. Zou, E. Friedman, "The transcriptional activator Mirk/Dyrk1B is sequestered by p38alpha/beta MAP kinase", *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49438-49445.
- [47] T. Igishi, S. Fukuhara, V. Patel, B. Z. Katz, K. M. Yamada, J. S. Gutkind, "Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen-activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c-Jun NH(2)-terminal kinase activation", *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 30738-30746.
- [48] S. T. Lim, X. L. Chen, Y. Lim, D. A. Hanson, T. T. Vo, K. Howerton, N. Larocque, S. J. Fisher, D. D. Schlaepfer, D. Ilic, "Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation", *Molecular cell* **2008**, *29*, 9-22.
- [49] E. Cano, L. C. Mahadevan, "Parallel signal processing among mammalian MAPKs", *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 117-122.
- [50] A. Cuenda, S. Rousseau, "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases", *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1773*, 1358-1375.
- [51] N. Gerits, S. Kostenko, U. Moens, "In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice", *Transgenic research* **2007**, *16*, 281-314.
- [52] I. Corre, F. Paris, J. Huot, "The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells", *Oncotarget* **2017**.
- [53] M. Ito, K. Miyado, K. Nakagawa, M. Muraki, M. Imai, N. Yamakawa, J. Qin, Y. Hosoi, H. Saito, Y. Takahashi, "Age-associated changes in the subcellular localization of phosphorylated p38 MAPK in human granulosa cells", *Molecular human reproduction* **2010**, *16*, 928-937.
- [54] R. Pfundt, I. van Vlijmen-Willems, M. Bergers, M. Wingens, W. Cloin, J. Schalkwijk, "In situ demonstration of phosphorylated c-jun and p38 MAP kinase in epidermal keratinocytes following ultraviolet B irradiation of human skin", *The Journal of pathology* **2001**, *193*, 248-255.
- [55] E. Nishida, Y. Gotoh, "The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways", *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 128-131.
- [56] A. Clerk, A. Michael, P. H. Sugden, "Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes", *The Biochemical journal* **1998**, *333 (Pt 3)*, 581-589.
- [57] K. Ono, J. Han, "The p38 signal transduction pathway: activation and function", *Cellular signalling* **2000**, *12*, 1-13.

- [58] C. A. Hazzalin, E. Cano, A. Cuenda, M. J. Barratt, P. Cohen, L. C. Mahadevan, "p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient", *Current biology : CB* **1996**, *6*, 1028-1031.
- [59] D. M. Ouwens, N. D. de Ruiter, G. C. van der Zon, A. P. Carter, J. Schouten, C. van der Burgt, K. Kooistra, J. L. Bos, J. A. Maassen, H. van Dam, "Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38", *The EMBO journal* **2002**, *21*, 3782-3793.
- [60] A. Cuadrado, A. R. Nebreda, "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling", *The Biochemical journal* **2010**, *429*, 403-417.
- [61] J. Raingeaud, A. J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard, R. J. Davis, "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway", *Molecular and cellular biology* **1996**, *16*, 1247-1255.
- [62] J. Raingeaud, S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, R. J. Davis, "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine", *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 7420-7426.
- [63] T. Boutros, A. Nantel, A. Emadali, G. Tzimas, S. Conzen, E. Chevet, P. P. Metrakos, "The MAP kinase phosphatase-1 MKP-1/DUSP1 is a regulator of human liver response to transplantation", *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2008**, *8*, 2558-2568.
- [64] S. Jonas, E. Izaurralde, "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing", *Nature reviews. Genetics* **2015**, *16*, 421-433.
- [65] N. Trempolec, N. Dave-Coll, A. R. Nebreda, "SnapShot: p38 MAPK substrates", *Cell* **2013**, *152*, 924-924 e921.
- [66] N. Trempolec, N. Dave-Coll, A. R. Nebreda, "SnapShot: p38 MAPK signaling", *Cell* **2013**, *152*, 656-656 e651.
- [67] J. Rouse, P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, A. R. Nebreda, "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins", *Cell* **1994**, *78*, 1027-1037.
- [68] C. A. Dinarello, "Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases", *Current opinion in immunology* **1991**, *3*, 941-948.
- [69] G. Landskron, M. De la Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, M. A. Hermoso, "Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment", *Journal of immunology research* **2014**, *2014*, 149185.
- [70] L. Liaudet, G. Vassalli, P. Pacher, "Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways", *Frontiers in bioscience* **2009**, *14*, 4809-4814.
- [71] P. Huang, J. Han, L. Hui, "MAPK signaling in inflammation-associated cancer development", *Protein & cell* **2010**, *1*, 218-226.
- [72] J. C. Lee, J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, J. E. Strickler, M. M. McLaughlin, I. R. Siemens, S. M. Fisher, G. P. Livi, J. R. White, J. L. Adams, P. R. Young, "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis", *Nature* **1994**, *372*, 739-746.
- [73] C. Pargellis, L. Tong, L. Churchill, P. F. Cirillo, T. Gilmore, A. G. Graham, P. M. Grob, E. R. Hickey, N. Moss, S. Pav, J. Regan, "Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site", *Nature structural biology* **2002**, *9*, 268-272.
- [74] S. C. Koeberle, J. Romir, S. Fischer, A. Koeberle, V. Schattel, W. Albrecht, C. Grütter, O. Werz, D. Rauh, T. Stehle, S. A. Laufer, "Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor", *Nature chemical biology* **2011**, *8*, 141-143.
- [75] Y. J. Kang, A. Seit-Nebi, R. J. Davis, J. Han, "Multiple activation mechanisms of p38 α mitogen-activated protein kinase", *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281*, 26225-26234.

- [76] G. F. De Nicola, E. D. Martin, A. Chaikuad, R. Bassi, J. Clark, L. Martino, S. Verma, P. Sicard, R. Tata, R. A. Atkinson, S. Knapp, M. R. Conte, M. S. Marber, "Mechanism and consequence of the autoactivation of p38alpha mitogen-activated protein kinase promoted by TAB1", *Nature structural & molecular biology* **2013**, *20*, 1182-1190.
- [77] J. M. Salvador, P. R. Mittelstadt, T. Guszczynski, T. D. Copeland, H. Yamaguchi, E. Appella, A. J. Fornace, Jr., J. D. Ashwell, "Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases", *Nature immunology* **2005**, *6*, 390-395.
- [78] P. Gomez-Gutierrez, P. M. Campos, M. Vega, J. J. Perez, "Identification of a Novel Inhibitory Allosteric Site in p38alpha", *PloS one* **2016**, *11*, e0167379.
- [79] M. N. Yazicioglu, D. L. Goad, A. Ranganathan, A. W. Whitehurst, E. J. Goldsmith, M. H. Cobb, "Mutations in ERK2 binding sites affect nuclear entry", *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282*, 28759-28767.
- [80] R. Diskin, M. Lebendiker, D. Engelberg, O. Livnah, "Structures of p38alpha active mutants reveal conformational changes in L16 loop that induce autophosphorylation and activation", *Journal of molecular biology* **2007**, *365*, 66-76.
- [81] R. Diskin, D. Engelberg, O. Livnah, "A novel lipid binding site formed by the MAP kinase insert in p38 alpha", *Journal of molecular biology* **2008**, *375*, 70-79.
- [82] J. M. Sowadski, C. A. Ellis, Madhusudan, "Detergent binding to unmyristylated protein kinase A--structural implications for the role of myristate", *Journal of bioenergetics and biomembranes* **1996**, *28*, 7-12.
- [83] M. S. Kumar, M. Carson, M. M. Hussain, H. M. Murthy, "Structures of apolipoprotein A-II and a lipid-surrogate complex provide insights into apolipoprotein-lipid interactions", *Biochemistry* **2002**, *41*, 11681-11691.
- [84] M. A. Reddy, P. R. Thimmalapura, L. Lanting, J. L. Nadler, S. Fatima, R. Natarajan, "The oxidized lipid and lipoxygenase product 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces hypertrophy and fibronectin transcription in vascular smooth muscle cells via p38 MAPK and cAMP response element-binding protein activation. Mediation of angiotensin II effects", *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 9920-9928.
- [85] P. A. Nony, S. B. Kennett, W. C. Glasgow, K. Olden, J. D. Roberts, "15S-Lipoxygenase-2 mediates arachidonic acid-stimulated adhesion of human breast carcinoma cells through the activation of TAK1, MKK6, and p38 MAPK", *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 31413-31419.
- [86] B. Nolen, S. Taylor, G. Ghosh, "Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation", *Molecular cell* **2004**, *15*, 661-675.
- [87] J. J. Perry, R. M. Harris, D. Moiani, A. J. Olson, J. A. Tainer, "p38alpha MAP kinase C-terminal domain binding pocket characterized by crystallographic and computational analyses", *Journal of molecular biology* **2009**, *391*, 1-11.
- [88] "Substituted pyrazoles as p38 kinase inhibitors", *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **1999**, *9*, 975-979.
- [89] L. Tong, S. Pav, D. M. White, S. Rogers, K. M. Crane, C. L. Cywin, M. L. Brown, C. A. Pargellis, "A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket", *Nature structural biology* **1997**, *4*, 311-316.
- [90] A. Galanis, S. H. Yang, A. D. Sharrocks, "Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1", *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 965-973.
- [91] R. M. Biondi, A. R. Nebreda, "Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions", *The Biochemical journal* **2003**, *372*, 1-13.
- [92] R. Dajani, E. Fraser, S. M. Roe, M. Yeo, V. M. Good, V. Thompson, T. C. Dale, L. H. Pearl, "Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex", *The EMBO journal* **2003**, *22*, 494-501.
- [93] V. P. Yu, C. Baskerville, B. Grünenfelder, S. I. Reed, "A kinase-independent function of Cks1 and Cdk1 in regulation of transcription", *Molecular cell* **2005**, *17*, 145-151.
- [94] K. M. Comess, C. Sun, C. Abad-Zapatero, E. R. Goedken, R. J. Gum, D. W. Borhani, M. Argiriadi, D. R. Groebe, Y. Jia, J. E. Clampit, D. L. Haasch, H. T. Smith, S. Wang, D. Song, M. L. Coen, T. E. Cloutier, H. Tang, X. Cheng, C. Quinn, B. Liu, Z. Xin, G. Liu, E. H. Fry, V. Stoll, T. I. Ng, D. Banach, D. Marcotte, D. J. Burns, D. J. Calderwood, P.

- J. Hajduk, "Discovery and characterization of non-ATP site inhibitors of the mitogen activated protein (MAP) kinases", *ACS chemical biology* **2011**, *6*, 234-244.
- [95] O. Hantschel, B. Nagar, S. Guettler, J. Kretschmar, K. Dorey, J. Kuriyan, G. Superti-Furga, "A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl", *Cell* **2003**, *112*, 845-857.
- [96] S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, S. Fu, P. J. Hancock, K. M. Haskell, R. E. Jones, J. A. Kahana, A. M. Kral, K. Leander, L. L. Lee, J. Malinowski, E. M. McAvoy, D. D. Nahas, R. G. Robinson, H. E. Huber, "Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors", *The Biochemical journal* **2005**, *385*, 399-408.
- [97] N. Kannan, A. F. Neuwald, "Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha", *Protein science : a publication of the Protein Society* **2004**, *13*, 2059-2077.
- [98] S. J. Pollack, K. S. Beyer, C. Lock, I. Müller, D. Sheppard, M. Lipkin, D. Hardick, P. Blurton, P. M. Leonard, P. A. Hubbard, D. Todd, C. M. Richardson, T. Ahrens, M. Baader, D. O. Hafenbradl, K. Hilyard, R. W. Burli, "A comparative study of fragment screening methods on the p38alpha kinase: new methods, new insights", *Journal of computer-aided molecular design* **2011**, *25*, 677-687.
- [99] N. Tzarum, Y. Eisenberg-Domovich, J. J. Gills, P. A. Dennis, O. Livnah, "Lipid molecules induce p38alpha activation via a novel molecular switch", *Journal of molecular biology* **2012**, *424*, 339-353.
- [100] A. P. Kozikowski, H. Sun, J. Brognard, P. A. Dennis, "Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase Akt", *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 1144-1145.
- [101] J. J. Gills, S. S. Castillo, C. Zhang, P. A. Petukhov, R. M. Memmott, M. Hollingshead, N. Warfel, J. Han, A. P. Kozikowski, P. A. Dennis, "Phosphatidylinositol ether lipid analogues that inhibit AKT also independently activate the stress kinase, p38alpha, through MKK3/6-independent and -dependent mechanisms", *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282*, 27020-27029.
- [102] J. J. Gills, P. A. Dennis, "Perifosine: update on a novel Akt inhibitor", *Current oncology reports* **2009**, *11*, 102-110.
- [103] M. Getlik, J. R. Simard, M. Termathe, C. Grütter, M. Rabiller, W. A. van Otterlo, D. Rauh, "Fluorophore labeled kinase detects ligands that bind within the MAPK insert of p38alpha kinase", *PloS one* **2012**, *7*, e39713.
- [104] M. Getlik, "Strukturasierte Entwicklung und Synthese von Enzyminhibitoren", Dissertation, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2011**.
- [105] M. Thermate, "Rationales Design, Synthese und biochemische Charakterisierung niedermolekularer Interaktionspartner der Serin-Threonin Kinase p38", Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2010**.
- [106] "Voices of chemical biology", *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 378-379.
- [107] "Voices of chemical biology", *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 446-447.
- [108] D. J. Brennan, D. P. O'Connor, E. Rexhepaj, F. Ponten, W. M. Gallagher, "Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology", *Nature reviews. Cancer* **2010**, *10*, 605-617.
- [109] A. Wolf-Yadlin, M. Sevecka, G. MacBeath, "Dissecting protein function and signaling using protein microarrays", *Current opinion in chemical biology* **2009**, *13*, 398-405.
- [110] K. R. Schulz, E. A. Danna, P. O. Krutzik, G. P. Nolan, "Single-cell phospho-protein analysis by flow cytometry", *Current protocols in immunology* **2012**, *Chapter 8*, Unit 8 17 11-20.
- [111] F. Fournier, R. Guo, E. M. Gardner, P. M. Donaldson, C. Loeffeld, I. R. Gould, K. R. Willison, D. R. Klug, "Biological and biomedical applications of two-dimensional vibrational spectroscopy: proteomics, imaging, and structural analysis", *Accounts of chemical research* **2009**, *42*, 1322-1331.
- [112] L. Martens, H. Hermjakob, P. Jones, M. Adamski, C. Taylor, D. States, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, R. Apweiler, "PRIDE: the proteomics identifications database", *Proteomics* **2005**, *5*, 3537-3545.

- [113] M. Vidal, M. E. Cusick, A. L. Barabasi, "Interactome networks and human disease", *Cell* **2011**, *144*, 986-998.
- [114] M. Christian, T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, D. F. Voytas, "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases", *Genetics* **2010**, *186*, 757-761.
- [115] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science* **2012**, *337*, 816-821.
- [116] A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants", *Science* **1999**, *286*, 950-952.
- [117] J. P. Manis, "Knock out, knock in, knock down--genetically manipulated mice and the Nobel Prize", *The New England journal of medicine* **2007**, *357*, 2426-2429.
- [118] A. D. Ellington, J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
- [119] P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, "Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways", *Current opinion in chemical biology* **2001**, *5*, 360-367.
- [120] C. J. Porter, N. L. Trevaskis, W. N. Charman, "Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs", *Nature reviews. Drug discovery* **2007**, *6*, 231-248.
- [121] H. K. Han, G. L. Amidon, "Targeted prodrug design to optimize drug delivery", *AAPS pharmSci* **2000**, *2*, E6.
- [122] K. M. Specht, K. M. Shokat, "The emerging power of chemical genetics", *Current opinion in cell biology* **2002**, *14*, 155-159.
- [123] H. Habelhah, K. Shah, L. Huang, A. Ostareck-Lederer, A. L. Burlingame, K. M. Shokat, M. W. Hentze, Z. Ronai, "ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation", *Nature cell biology* **2001**, *3*, 325-330.
- [124] A. G. Polson, L. Huang, D. M. Lukac, J. D. Blethrow, D. O. Morgan, A. L. Burlingame, D. Ganem, "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP protein is phosphorylated by cyclin-dependent kinases", *Journal of virology* **2001**, *75*, 3175-3184.
- [125] K. Shah, K. M. Shokat, "A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway", *Chemistry & biology* **2002**, *9*, 35-47.
- [126] M. A. Shogren-Knaak, P. J. Alaimo, K. M. Shokat, "Recent advances in chemical approaches to the study of biological systems", *Annual review of cell and developmental biology* **2001**, *17*, 405-433.
- [127] A. C. Bishop, C. Y. Kung, K. Shah, L. Witucki, K. M. Shokat, Y. Liu, "Generation of monospecific nanomolar tyrosine kinase inhibitors via a chemical genetic approach", *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 627-631.
- [128] Y. W. Hwang, D. L. Miller, "A mutation that alters the nucleotide specificity of elongation factor Tu, a GTP regulatory protein", *The Journal of biological chemistry* **1987**, *262*, 13081-13085.
- [129] A. C. Bishop, J. A. Ubersax, D. T. Petsch, D. P. Matheos, N. S. Gray, J. Blethrow, E. Shimizu, J. Z. Tsien, P. G. Schultz, M. D. Rose, J. L. Wood, D. O. Morgan, K. M. Shokat, "A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase", *Nature* **2000**, *407*, 395-401.
- [130] J. A. Blair, D. Rauh, C. Kung, C. H. Yun, Q. W. Fan, H. Rode, C. Zhang, M. J. Eck, W. A. Weiss, K. M. Shokat, "Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics", *Nature chemical biology* **2007**, *3*, 229-238.
- [131] M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton, "Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors", *Science* **2005**, *308*, 1318-1321.
- [132] W. Zhou, D. Ercan, L. Chen, C. H. Yun, D. Li, M. Capelletti, A. B. Cortot, L. Chirieac, R. E. Iacob, R. Padera, J. R. Engen, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne, "Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M", *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.

- [133] A. Kung, M. Schimpl, A. Ekanayake, Y. C. Chen, R. Overman, C. Zhang, "A Chemical-Genetic Approach to Generate Selective Covalent Inhibitors of Protein Kinases", *ACS chemical biology* **2017**, *12*, 1499-1503.
- [134] J. P. Brown, P. W. Wright, C. E. Hart, R. G. Woodbury, K. E. Hellstrom, I. Hellstrom, "Protein antigens of normal and malignant human cells identified by immunoprecipitation with monoclonal antibodies", *The Journal of biological chemistry* **1980**, *255*, 4980-4983.
- [135] E. M. Phizicky, S. Fields, "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis", *Microbiological reviews* **1995**, *59*, 94-123.
- [136] R. A. Hall, "Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot", *Methods in molecular biology* **2004**, *261*, 167-174.
- [137] I. M. Nooren, J. M. Thornton, "Diversity of protein-protein interactions", *The EMBO journal* **2003**, *22*, 3486-3492.
- [138] S. E. Acuner Ozbabacan, H. B. Engin, A. Gursoy, O. Keskin, "Transient protein-protein interactions", *Protein engineering, design & selection : PEDS* **2011**, *24*, 635-648.
- [139] A. A. Yakovlev, "Crosslinkers and their utilization for studies of intermolecular interactions", *Neurochem J+* **2009**, *3*, 139-144.
- [140] K. E. Neely, A. H. Hassan, C. E. Brown, L. Howe, J. L. Workman, "Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits", *Molecular and cellular biology* **2002**, *22*, 1615-1625.
- [141] S. Fields, O. Song, "A novel genetic system to detect protein-protein interactions", *Nature* **1989**, *340*, 245-246.
- [142] A. Bauer, B. Kuster, "Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes", *European journal of biochemistry* **2003**, *270*, 570-578.
- [143] R. E. March, "An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry", *J Mass Spectrom* **1997**, *32*, 351-369.
- [144] W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 5011-5015.
- [145] G. Rigaut, A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, B. Seraphin, "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration", *Nature biotechnology* **1999**, *17*, 1030-1032.
- [146] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson, D. J. Pappin, "Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents", *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2004**, *3*, 1154-1169.
- [147] Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, B. T. Chait, "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 6591-6596.
- [148] D. K. Nomura, M. M. Dix, B. F. Cravatt, "Activity-based protein profiling for biochemical pathway discovery in cancer", *Nature reviews. Cancer* **2010**, *10*, 630-638.
- [149] U. Rix, G. Superti-Furga, "Target profiling of small molecules by chemical proteomics", *Nature chemical biology* **2009**, *5*, 616-624.
- [150] D. M. Lawson, <https://www.jic.ac.uk/staff/david-lawson/xtallog/summary.htm>, 16.08.2017.
- [151] G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*, Third ed., Elsevier Inc., **2006**.
- [152] G. Taylor, "The phase problem", *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2003**, *59*, 1881-1890.
- [153] A. McPherson, "Introduction to protein crystallization", *Methods* **2004**, *34*, 254-265.
- [154] C. Nave, "Protein crystallography on a synchrotron", *Synchrotron Radiation News* **1989**, *2*, 24-28.

- [155] M. G. Rossmann, D. M. Blow, "Detection of Sub-Units within Crystallographic Asymmetric Unit", *Acta Crystallogr* **1962**, *15*, 24-&.
- [156] M. F. Perutz, "Isomorphous Replacement and Phase Determination in Non-Centrosymmetric Space Groups", *Acta Crystallogr* **1956**, *9*, 867-873.
- [157] W. A. Hendrickson, "Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation", *Science* **1991**, *254*, 51-58.
- [158] R. J. Read, "Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors", *Acta Crystallographica Section A* **1986**, *42*, 140-149.
- [159] A. Wlodawer, W. Minor, Z. Dauter, M. Jaskolski, "Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures", *The FEBS journal* **2008**, *275*, 1-21.
- [160] K. Diederichs, P. A. Karplus, "Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography", *Nature structural biology* **1997**, *4*, 269-275.
- [161] A. T. Brunger, "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures", *Nature* **1992**, *355*, 472-475.
- [162] C. Ramakrishnan, G. N. Ramachandran, "Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units", *Biophysical journal* **1965**, *5*, 909-933.
- [163] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, "The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures", *Journal of molecular biology* **1977**, *112*, 535-542.
- [164] H. M. Berman, T. N. Bhat, P. E. Bourne, Z. Feng, G. Gilliland, H. Weissig, J. Westbrook, "The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics", *Nature structural biology* **2000**, *7 Suppl*, 957-959.
- [165] M. R. Kilbourn, "Thiophenes as phenyl bio-isosteres: application in radiopharmaceutical design--I. Dopamine uptake antagonists", *International journal of radiation applications and instrumentation. Part B, Nuclear medicine and biology* **1989**, *16*, 681-686.
- [166] B. E. Smart, "Fluorine substituent effects (on bioactivity)", *J Fluorine Chem* **2001**, *109*, 3-11.
- [167] J. A. Olsen, D. W. Banner, P. Seiler, B. Wagner, T. Tschopp, U. Obst-Sander, M. Kansy, K. Müller, F. Diederich, "Fluorine interactions at the thrombin active site: protein backbone fragments H-C(alpha)-C=O comprise a favorable C-F environment and interactions of C-F with electrophiles", *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2004**, *5*, 666-675.
- [168] S. B. Rosenblum, T. Huynh, A. Afonso, H. R. Davis, Jr., N. Yumibe, J. W. Clader, D. A. Burnett, "Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): a designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption", *Journal of medicinal chemistry* **1998**, *41*, 973-980.
- [169] D. J. Richard, J. C. Verheijen, K. Curran, J. Kaplan, L. Toral-Barza, I. Hollander, J. Lucas, K. Yu, A. Zask, "Incorporation of water-solubilizing groups in pyrazolopyrimidine mTOR inhibitors: discovery of highly potent and selective analogs with improved human microsomal stability", *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, *19*, 6830-6835.
- [170] I. Nouria, I. K. Kostakis, C. Dubouilh, E. Chosson, M. Iannelli, T. Besson, "Decomposition of formamide assisted by microwaves, a tool for synthesis of nitrogen-containing heterocycles", *Tetrahedron Lett* **2008**, *49*, 7033-7036.
- [171] R. Cheng, T. J. Guo, D. Zhang-Negrerie, Y. F. Du, K. Zhao, "One-Pot Synthesis of Quinazolinones from Anthranilamides and Aldehydes via p-Toluenesulfonic Acid Catalyzed Cyclocondensation and Phenyliodine Diacetate Mediated Oxidative Dehydrogenation", *Synthesis* **2013**, *45*, 2998-3006.
- [172] Z. L. Shen, X. F. He, J. L. Dai, W. M. Mo, B. X. Hu, N. Sun, X. Q. Hu, "An efficient HCCP-mediated direct amination of quinazolin-4(3H)-ones", *Tetrahedron* **2011**, *67*, 1665-1672.

- [173] G. Wang, X. Chen, Y. Deng, Z. Li, X. Xu, "Synthesis and Nematicidal Activities of 1,2,3-Benzotriazin-4-one Derivatives against *Meloidogyne incognita*", *Journal of agricultural and food chemistry* **2015**, *63*, 6883-6889.
- [174] J. F. Hartwig, "Palladium-catalyzed amination of aryl halides: Mechanism and rational catalyst design", *Synlett* **1997**, 329-+.
- [175] H. B. Goodbrand, N. X. Hu, "Ligand-accelerated catalysis of the Ullmann condensation: Application to hole conducting triaryl amines", *J Org Chem* **1999**, *64*, 670-674.
- [176] P. P. Vachali, B. Li, A. Bartschi, P. S. Bernstein, "Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor technology for the quantitative characterization of protein-carotenoid interactions", *Archives of biochemistry and biophysics* **2015**, *572*, 66-72.
- [177] E. Kretschmann, H. Raether, "Plasma Resonance Emission in Solids", *Z Naturforsch Pt A* **1968**, *A 23*, 615-623.
- [178] J. Homola, "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species", *Chemical reviews* **2008**, *108*, 462-493.
- [179] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, "Quantitative-Determination of Surface Concentration of Protein with Surface-Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins", *J Colloid Interf Sci* **1991**, *143*, 513-526.
- [180] M. A. Cooper, "Optical biosensors in drug discovery", *Nature reviews. Drug discovery* **2002**, *1*, 515-528.
- [181] D. Casper, M. Bukhtiyarova, E. B. Springman, "A Biacore biosensor method for detailed kinetic binding analysis of small molecule inhibitors of p38alpha mitogen-activated protein kinase", *Analytical biochemistry* **2004**, *325*, 126-136.
- [182] J. R. Simard, M. Getlik, C. Grütter, R. Schneider, S. Wulfert, D. Rauh, "Fluorophore labeling of the glycine-rich loop as a method of identifying inhibitors that bind to active and inactive kinase conformations", *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 4152-4160.
- [183] W. X. Zhang, R. Wang, D. Wisniewski, A. I. Marcy, P. LoGrasso, J. M. Lisnock, R. T. Cummings, J. E. Thompson, "Time-resolved Forster resonance energy transfer assays for the binding of nucleotide and protein substrates to p38alpha protein kinase", *Analytical biochemistry* **2005**, *343*, 76-83.
- [184] T. L. Lasseter, B. H. Clare, N. L. Abbott, R. J. Hamers, "Covalently modified silicon and diamond surfaces: resistance to nonspecific protein adsorption and optimization for biosensing", *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10220-10221.
- [185] R. Karlsson, A. Michaelsson, L. Mattsson, "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system", *Journal of immunological methods* **1991**, *145*, 229-240.
- [186] S. Lata, M. Gavutis, R. Tampe, J. Piehler, "Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation", *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2365-2372.
- [187] F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, "The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability", *Nature protocols* **2007**, *2*, 2212-2221.
- [188] T. H. Steinberg, L. J. Jones, R. P. Haugland, V. L. Singer, "SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein", *Analytical biochemistry* **1996**, *239*, 223-237.
- [189] C. N. Pace, T. McGrath, "Substrate stabilization of lysozyme to thermal and guanidine hydrochloride denaturation", *The Journal of biological chemistry* **1980**, *255*, 3862-3865.
- [190] J. F. Brandts, L. N. Lin, "Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry", *Biochemistry* **1990**, *29*, 6927-6940.
- [191] D. Matulis, J. K. Kranz, F. R. Salemme, M. J. Todd, "Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor", *Biochemistry* **2005**, *44*, 5258-5266.
- [192] M. Vedadi, F. H. Niesen, A. Allali-Hassani, O. Y. Fedorov, P. J. Finerty, Jr., G. A. Wasney, R. Yeung, C. Arrowsmith, L. J. Ball, H. Berglund, R. Hui, B. D. Marsden, P. Nordlund, M. Sundstrom, J. Weigelt, A. M. Edwards, "Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure

- determination", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 15835-15840.
- [193] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, "Molecular interaction studies using microscale thermophoresis", *Assay and drug development technologies* **2011**, *9*, 342-353.
- [194] S. Duhr, D. Braun, "Thermophoretic depletion follows Boltzmann distribution", *Physical review letters* **2006**, *96*, 168301.
- [195] S. Duhr, D. Braun, "Why molecules move along a temperature gradient", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 19678-19682.
- [196] S. A. Seidel, C. J. Wienken, S. Geissler, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, A. Reiter, D. Trauner, D. Braun, P. Baaske, "Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein-ligand binding", *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 10656-10659.
- [197] J. L. Wilson, I. M. Scott, J. L. McMurry, "Optical biosensing: Kinetics of protein A-IGG binding using biolayer interferometry", *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, *38*, 400-407.
- [198] M. C. Wiener, "A pedestrian guide to membrane protein crystallization", *Methods* **2004**, *34*, 364-372.
- [199] P. L. Ferrarini, C. Mori, M. Badawneh, V. Calderone, L. Calzolari, T. Loffredo, E. Martinotti, G. Saccomanni, "Synthesis of 1,8-naphthyridine derivatives: Potential antihypertensive agents - Part VII", *European journal of medicinal chemistry* **1998**, *33*, 383-397.
- [200] F. Kilchmann, M. J. Marcaida, S. Kotak, T. Schick, S. D. Boss, M. Awale, P. Gonczy, J. L. Reymond, "Discovery of a Selective Aurora A Kinase Inhibitor by Virtual Screening", *Journal of medicinal chemistry* **2016**, *59*, 7188-7211.
- [201] C. E. Fitzgerald, S. B. Patel, J. W. Becker, P. M. Cameron, D. Zaller, V. B. Pikounis, S. J. O'Keefe, G. Scapin, "Structural basis for p38alpha MAP kinase quinazolinone and pyridol-pyrimidine inhibitor specificity", *Nature structural biology* **2003**, *10*, 764-769.
- [202] M. F. Perutz, G. Fermi, D. J. Abraham, C. Poyart, E. Bursaux, "Hemoglobin as a Receptor of Drugs and Peptides - X-Ray Studies of the Stereochemistry of Binding", *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1064-1078.
- [203] H. K. Wentsch, N. M. Walter, M. Bührmann, S. Mayer-Wrangowski, D. Rauh, G. J. R. Zaman, N. Willemsen-Seegers, R. C. Buijsman, M. Henning, D. Dauch, L. Zender, S. Laufer, "Optimized Target Residence Time: Type II/2 Inhibitors for p38alpha MAP Kinase with Improved Binding Kinetics through Direct Interaction with the R-Spine", *Angewandte Chemie* **2017**, *56*, 5363-5367.
- [204] N. M. Walter, H. K. Wentsch, M. Bührmann, S. M. Bauer, E. Döring, S. Mayer-Wrangowski, A. Sievers-Engler, N. Willemsen-Seegers, G. Zaman, R. Buijsman, M. Lämmerhofer, D. Rauh, S. A. Laufer, "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Type II/2 p38alpha MAP Kinase Inhibitors with Excellent Selectivity, High Potency, and Prolonged Target Residence Time by Interfering with the R-Spine", *Journal of medicinal chemistry* **2017**.
- [205] C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, "Aromatic interactions", *J Chem Soc Perk T 2* **2001**, 651-669.
- [206] Y. Tu, Y. OuYang, S. Xu, Y. Zhu, G. Li, C. Sun, P. Zheng, W. Zhu, "Design, synthesis, and docking studies of afatinib analogs bearing cinnamide moiety as potent EGFR inhibitors", *Bioorganic & medicinal chemistry* **2016**, *24*, 1495-1503.
- [207] R. L. Mackman, B. A. Katz, J. G. Breitenbucher, H. C. Hui, E. Verner, C. Luong, L. Liu, P. A. Sprengeler, "Exploiting subsite S1 of trypsin-like serine proteases for selectivity: potent and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator", *Journal of medicinal chemistry* **2001**, *44*, 3856-3871.
- [208] J. Mestres, "Computational chemogenomics approaches to systematic knowledge-based drug discovery", *Current opinion in drug discovery & development* **2004**, *7*, 304-313.

- [209] T. Kortemme, T. E. Creighton, "Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family", *Journal of molecular biology* **1995**, 253, 799-812.
- [210] A. S. Kalgutkar, D. K. Dalvie, "Drug discovery for a new generation of covalent drugs", *Expert opinion on drug discovery* **2012**, 7, 561-581.
- [211] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, "The resurgence of covalent drugs", *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, 10, 307-317.
- [212] R. E. Iacob, J. Zhang, N. S. Gray, J. R. Engen, "Allosteric interactions between the myristate- and ATP-site of the Abl kinase", *PloS one* **2011**, 6, e15929.
- [213] R. Schneider, C. Becker, J. R. Simard, M. Getlik, N. Bohlke, P. Janning, D. Rauh, "Direct binding assay for the detection of type IV allosteric inhibitors of Abl", *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 9138-9141.
- [214] S. C. Mayer-Wrangowski, D. Rauh, "Monitoring ligand-induced conformational changes for the identification of estrogen receptor agonists and antagonists", *Angewandte Chemie* **2015**, 54, 4379-4382.
- [215] T. Förster, "Energiewanderung Und Fluoreszenz", *Naturwissenschaften* **1946**, 33, 166-175.
- [216] M. Azarkh, O. Okle, P. Eyring, D. R. Dietrich, M. Drescher, "Evaluation of spin labels for in-cell EPR by analysis of nitroxide reduction in cell extract of *Xenopus laevis* oocytes", *Journal of magnetic resonance* **2011**, 212, 450-454.
- [217] M. Drescher, M. Huber, V. Subramaniam, "Hunting the chameleon: structural conformations of the intrinsically disordered protein alpha-synuclein", *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2012**, 13, 761-768.
- [218] D. E. Fahrney, A. M. Gold, "Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases .1. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, Alpha-Chymotrypsin, and Trypsin", *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 997-1000.
- [219] G. Godlewski, S. O. Alapafuja, S. Batkai, S. P. Nikas, R. Cinar, L. Offertaler, D. Osei-Hyiaman, J. Liu, B. Mukhopadhyay, J. Harvey-White, J. Tam, K. Pacak, J. L. Blankman, B. F. Cravatt, A. Makriyannis, G. Kunos, "Inhibitor of fatty acid amide hydrolase normalizes cardiovascular function in hypertension without adverse metabolic effects", *Chemistry & biology* **2010**, 17, 1256-1266.
- [220] P. K. Pal, W. J. Wechter, R. F. Colman, "Affinity labeling of the inhibitory DPNH site of bovine liver glutamate dehydrogenase by 5'-fluorosulfonylbenzoyl adenosine", *The Journal of biological chemistry* **1975**, 250, 8140-8147.
- [221] N. N. Gushwa, S. Kang, J. Chen, J. Taunton, "Selective targeting of distinct active site nucleophiles by irreversible SRC-family kinase inhibitors", *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 20214-20217.
- [222] P. Martin-Gago, E. K. Fansa, M. Winzker, S. Murarka, P. Janning, C. Schultz-Fademrecht, M. Baumann, A. Wittinghofer, H. Waldmann, "Covalent Protein Labeling at Glutamic Acids", *Cell chemical biology* **2017**, 24, 589-597 e585.
- [223] C. J. Smedley, A. S. Barrow, C. Spiteri, M. C. Giel, P. Sharma, J. E. Moses, "Sulfur-Fluoride Exchange (SuFEx)-Mediated Synthesis of Sterically Hindered and Electron-Deficient Secondary and Tertiary Amides via Acyl Fluoride Intermediates", *Chemistry* **2017**, 23, 9990-9995.
- [224] R. T. Wagey, C. Krieger, "Abnormalities of protein kinases in neurodegenerative diseases", *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques* **1998**, 51, 133-183.
- [225] C. J. Tsai, R. Nussinov, "The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics", *Seminars in cancer biology* **2013**, 23, 235-242.
- [226] G. Schett, J. Zwerina, G. Firestein, "The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis", *Annals of the rheumatic diseases* **2008**, 67, 909-916.
- [227] D. M. Dambach, "Potential adverse effects associated with inhibition of p38alpha/beta MAP kinases", *Current topics in medicinal chemistry* **2005**, 5, 929-939.
- [228] S. Schreiber, B. Feagan, G. D'Haens, J. F. Colombel, K. Geboes, M. Yurcov, V. Isakov, O. Golovenko, C. N. Bernstein, D. Ludwig, T. Winter, U. Meier, C. Yong, J. Steffgen, B. S. Group, "Oral p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with BIRB 796 for

- active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **2006**, *4*, 325-334.
- [229] K. E. Martz, A. Dorn, B. Baur, V. Schattel, M. I. Goettert, S. C. Mayer-Wrangowski, D. Rauh, S. A. Laufer, "Targeting the hinge glycine flip and the activation loop: novel approach to potent p38alpha inhibitors", *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 7862-7874.
- [230] S. Fischer, H. K. Wentsch, S. C. Mayer-Wrangowski, M. Zimmermann, S. M. Bauer, K. Storch, R. Niess, S. C. Koeberle, C. Grütter, F. M. Böckler, D. Rauh, S. A. Laufer, "Dibenzosuberones as p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors with low ATP competitiveness and outstanding whole blood activity", *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56*, 241-253.
- [231] B. Baur, K. Storch, K. E. Martz, M. I. Goettert, A. Richters, D. Rauh, S. A. Laufer, "Metabolically stable dibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ones as highly selective p38 MAP kinase inhibitors: optimizing anti-cytokine activity in human whole blood", *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56*, 8561-8578.
- [232] A. Unzue, J. Dong, K. Lafleur, H. Zhao, E. Frugier, A. Cafilisch, C. Nevado, "Pyrrolo[3,2-b]quinoxaline derivatives as types I1/2 and II Eph tyrosine kinase inhibitors: structure-based design, synthesis, and in vivo validation", *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57*, 6834-6844.
- [233] R. A. Copeland, D. L. Pompliano, T. D. Meek, "Drug-target residence time and its implications for lead optimization", *Nature reviews. Drug discovery* **2006**, *5*, 730-739.
- [234] P. J. Tummino, R. A. Copeland, "Residence time of receptor-ligand complexes and its effect on biological function", *Biochemistry* **2008**, *47*, 5481-5492.
- [235] H. S. Meharena, P. Chang, M. M. Keshwani, K. Oruganty, A. K. Nene, N. Kannan, S. S. Taylor, A. P. Kornev, "Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation", *PLoS biology* **2013**, *11*, e1001680.
- [236] Z. Yurtsever, S. M. Scheaffer, A. G. Romero, M. J. Holtzman, T. J. Brett, "The crystal structure of phosphorylated MAPK13 reveals common structural features and differences in p38 MAPK family activation", *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2015**, *71*, 790-799.
- [237] R. J. Doerksen, A. J. Thakkar, "Quadrupole and octopole moments of heteroaromatic rings", *J Phys Chem A* **1999**, *103*, 10009-10014.
- [238] R. Wilcken, M. O. Zimmermann, A. Lange, S. Zahn, B. Kirchner, F. M. Boeckler, "Addressing Methionine in Molecular Design through Directed Sulfur-Halogen Bonds", *Journal of chemical theory and computation* **2011**, *7*, 2307-2315.
- [239] S. Sirimulla, J. B. Bailey, R. Vegesna, M. Narayan, "Halogen interactions in protein-ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design", *Journal of chemical information and modeling* **2013**, *53*, 2781-2791.
- [240] R. Wilcken, M. O. Zimmermann, A. Lange, S. Zahn, F. M. Boeckler, "Using halogen bonds to address the protein backbone: a systematic evaluation", *Journal of computer-aided molecular design* **2012**, *26*, 935-945.
- [241] Y. X. Lu, J. W. Zou, Y. H. Wang, Y. J. Jiang, Q. S. Yu, "Ab initio investigation of the complexes between bromobenzene and several electron donors: some insights into the magnitude and nature of halogen bonding interactions", *J Phys Chem A* **2007**, *111*, 10781-10788.
- [242] M. O. Zimmermann, A. Lange, F. M. Boeckler, "Evaluating the potential of halogen bonding in molecular design: automated scaffold decoration using the new scoring function XBScore", *Journal of chemical information and modeling* **2015**, *55*, 687-699.
- [243] A. Lange, M. Günther, F. M. Büttner, M. O. Zimmermann, J. Heidrich, S. Hennig, S. Zahn, C. Schall, A. Sievers-Engler, F. Ansideri, P. Koch, M. Lämmerhofer, T. Stehle, S. A. Laufer, F. M. Böckler, "Targeting the Gatekeeper MET146 of C-Jun N-Terminal Kinase 3 Induces a Bivalent Halogen/Chalcogen Bond", *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 14640-14652.
- [244] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, S. Wang, "Development and optimization of a

- binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization", *Analytical biochemistry* **2004**, 332, 261-273.
- [245] S. Wilhelm, T. Housley, N. Kennure, H. Rong, R. Carlson, M. McHugh, B. Hibner, B. Riedl, J. Lyons, R. Taylor, in *Proc. Am. Assoc. Cancer Res, Vol. 42*, **2001**, p. 923.
- [246] S. M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag, P. A. Trail, "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis", *Cancer research* **2004**, 64, 7099-7109.
- [247] H. V. Namboodiri, M. Bukhtiyarova, J. Ramcharan, M. Karpusas, Y. Lee, E. B. Springman, "Analysis of imatinib and sorafenib binding to p38alpha compared with c-Abl and b-Raf provides structural insights for understanding the selectivity of inhibitors targeting the DFG-out form of protein kinases", *Biochemistry* **2010**, 49, 3611-3618.
- [248] J. R. Simard, M. Getlik, C. Grütter, V. Pawar, S. Wulfert, M. Rabiller, D. Rauh, "Development of a fluorescent-tagged kinase assay system for the detection and characterization of allosteric kinase inhibitors", *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 13286-13296.
- [249] S. M. Wilhelm, J. Dumas, L. Adnane, M. Lynch, C. A. Carter, G. Schütz, K. H. Thierauch, D. Zopf, "Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity", *International journal of cancer* **2011**, 129, 245-255.
- [250] J. W. Clader, "The discovery of ezetimibe: a view from outside the receptor", *Journal of medicinal chemistry* **2004**, 47, 1-9.
- [251] A. G. Myers, J. K. Barbay, B. Zhong, "Asymmetric synthesis of chiral organofluorine compounds: use of nonracemic fluoriodoacetic acid as a practical electrophile and its application to the synthesis of monofluoro hydroxyethylene dipeptide isosteres within a novel series of HIV protease inhibitors", *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 7207-7219.
- [252] C. S. Chang, M. Negishi, T. Nakano, Y. Morizawa, Y. Matsumura, A. Ichikawa, "7,7-Difluoroprostacyclin derivative, AFP-07, a highly selective and potent agonist for the prostacyclin receptor", *Prostaglandins* **1997**, 53, 83-90.
- [253] K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, "Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition", *Science* **2007**, 317, 1881-1886.
- [254] C. R. Briggs, M. J. Allen, D. O'Hagan, D. J. Tozer, A. M. Slawin, A. E. Goeta, J. A. Howard, "The observation of a large gauche preference when 2-fluoroethylamine and 2-fluoroethanol become protonated", *Organic & biomolecular chemistry* **2004**, 2, 732-740.
- [255] Y. Alber, "Fluor-Substitutionseffekt auf Protein-Ligand-Bindungsaffinitäten", Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2016**.
- [256] C. Drexler, "HTRF® KinEASE™: a new solution for screening serine-threonine kinases", *Nature Methods. Application Notes* **2006**.
- [257] K. Yasojima, J. Kuret, A. J. DeMaggio, E. McGeer, P. L. McGeer, "Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain", *Brain research* **2000**, 865, 116-120.
- [258] I. G. Salado, M. Redondo, M. L. Bello, C. Perez, N. F. Liachko, B. C. Kraemer, L. Miguel, M. Lecourtois, C. Gil, A. Martinez, D. I. Perez, "Protein kinase CK-1 inhibitors as new potential drugs for amyotrophic lateral sclerosis", *Journal of medicinal chemistry* **2014**, 57, 2755-2772.
- [259] J. Richter, K. Ullah, P. Xu, V. Alscher, A. Blatz, C. Peifer, J. Halekotte, J. Leban, D. Vitt, K. Holzmann, V. Bakulev, L. A. Pinna, D. Henne-Bruns, A. Hillenbrand, M. Kornmann, F. Leithauser, J. Bischof, U. Knippschild, "Effects of altered expression and activity levels of CK1delta and varepsilon on tumor growth and survival of colorectal cancer patients", *International journal of cancer* **2015**, 136, 2799-2810.
- [260] B. Schitteck, T. Sinnberg, "Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis", *Molecular cancer* **2014**, 13, 231.
- [261] C. Brockschmidt, H. Hirner, N. Huber, T. Eismann, A. Hillenbrand, G. Giamas, B. Radunsky, O. Ammerpohl, B. Bohm, D. Henne-Bruns, H. Kalthoff, F. Leithauser, A.

- Trauzold, U. Knippschild, "Anti-apoptotic and growth-stimulatory functions of CK1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo", *Gut* **2008**, *57*, 799-806.
- [262] A. Venerando, M. Ruzzene, L. A. Pinna, "Casein kinase: the triple meaning of a misnomer", *The Biochemical journal* **2014**, *460*, 141-156.
- [263] J. K. Cheong, T. H. Nguyen, H. Wang, P. Tan, P. M. Voorhoeve, S. H. Lee, D. M. Virshup, "IC261 induces cell cycle arrest and apoptosis of human cancer cells via CK1delta/varepsilon and Wnt/beta-catenin independent inhibition of mitotic spindle formation", *Oncogene* **2011**, *30*, 2558-2569.
- [264] K. J. Föhr, U. Knippschild, A. Herkommer, M. Fauler, C. Peifer, M. Georgieff, O. Adolph, "State-dependent block of voltage-gated sodium channels by the casein-kinase 1 inhibitor IC261", *Investigational new drugs* **2017**, *35*, 277-289.
- [265] M. Krüger, H. Kalbacher, P. L. Kastiris, J. Bischof, H. Barth, D. Henne-Bruns, C. Vorgias, S. Sarno, L. A. Pinna, U. Knippschild, "New potential peptide therapeutics perturbing CK1delta/alpha-tubulin interaction", *Cancer letters* **2016**, *375*, 375-383.
- [266] C. Peifer, M. Abadleh, J. Bischof, D. Hauser, V. Schattel, H. Hirner, U. Knippschild, S. Laufer, "3,4-Diaryl-isoxazoles and -imidazoles as potent dual inhibitors of p38alpha mitogen activated protein kinase and casein kinase 1delta", *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, 7618-7630.
- [267] S. Sabatini, G. Manfroni, M. L. Barreca, S. M. Bauer, M. Gargaro, R. Cannalire, A. Astolfi, J. Brea, C. Vacca, M. Pirro, S. Massari, O. Tabarrini, M. I. Loza, F. Fallarino, S. A. Laufer, V. Cecchetti, "The Pyrazolobenzothiazine Core as a New Chemotype of p38 Alpha Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors", *Chemical biology & drug design* **2015**, *86*, 531-545.
- [268] M. Bukhtiyarova, K. Northrop, X. M. Chai, D. Casper, M. Karpusas, E. Springman, "Improved expression, purification, and crystallization of p38 alpha MAP kinase", *Protein Expr. Purif.* **2004**, *37*, 154-161.
- [269] W. Kabsch, "Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants", *Journal of Applied Crystallography* **1993**, *26*, 795-800.
- [270] T. G. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell, A. G. W. Leslie, "iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM", *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2011**, *67*, 271-281.
- [271] P. Evans, "Scaling and assessment of data quality", *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2006**, *62*, 72-82.
- [272] R. J. Read, "Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood", *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2001**, *57*, 1373-1382.
- [273] P. Emsley, K. Cowtan, "Coot: model-building tools for molecular graphics", *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [274] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method", *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **1997**, *53*, 240-255.
- [275] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution", *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, *66*, 213-221.
- [276] A. W. Schüttelkopf, D. M. F. van Aalten, "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes", *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2004**, *60*, 1355-1363.
- [277] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Adrendall, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, D. C. Richardson, "Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation", *Proteins-Structure Function and Genetics* **2003**, *50*, 437-450.
- [278] W. L. DeLano, <http://www.pymol.org>,

- [279] Z. Zhang, A. G. Marshall, "A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 225-233.
- [280] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, M. Mann, "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes", *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2856-2860.
- [281] J. Cox, M. Mann, "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification", *Nature biotechnology* **2008**, *26*, 1367-1372.

9 Anhang

9.1 Sensorgramme

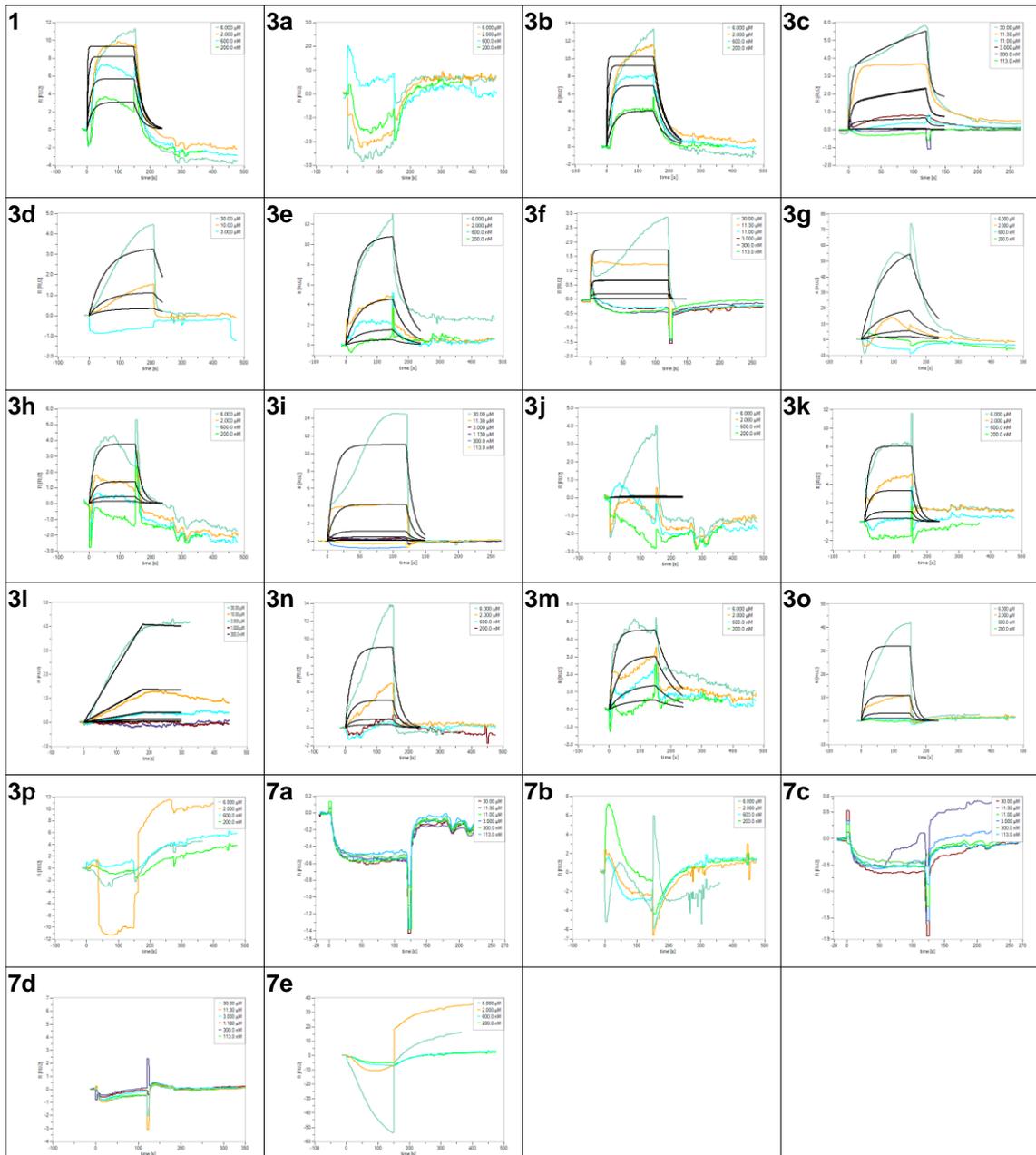


Abb. A1: Sensorgramme der Interaktion von reversiblen LiPoLis mittels trisNTA-vermittelter Immobilisierung von p38 α WT.

9.2 Aktivierung von p38 α

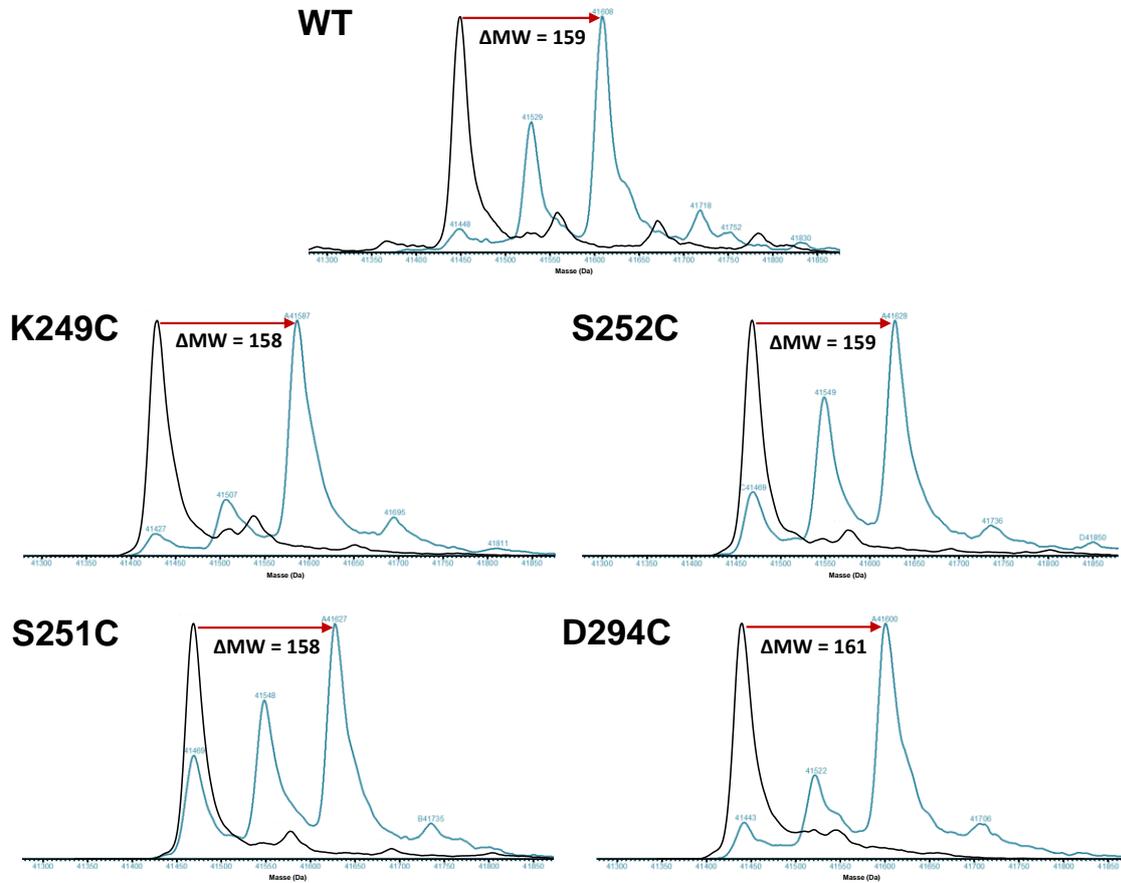


Abb. A2: Massenspektren von p38 α WT und den Mutanten K249C, S251C, S252C und D294C vor (schwarz) und nach Aktivierung (blau) mit MKK6. $\Delta MW = 160$ Da entspricht der theoretischen Massenzunahme bei doppelter Phosphorylierung.

9.3 Massenspektren

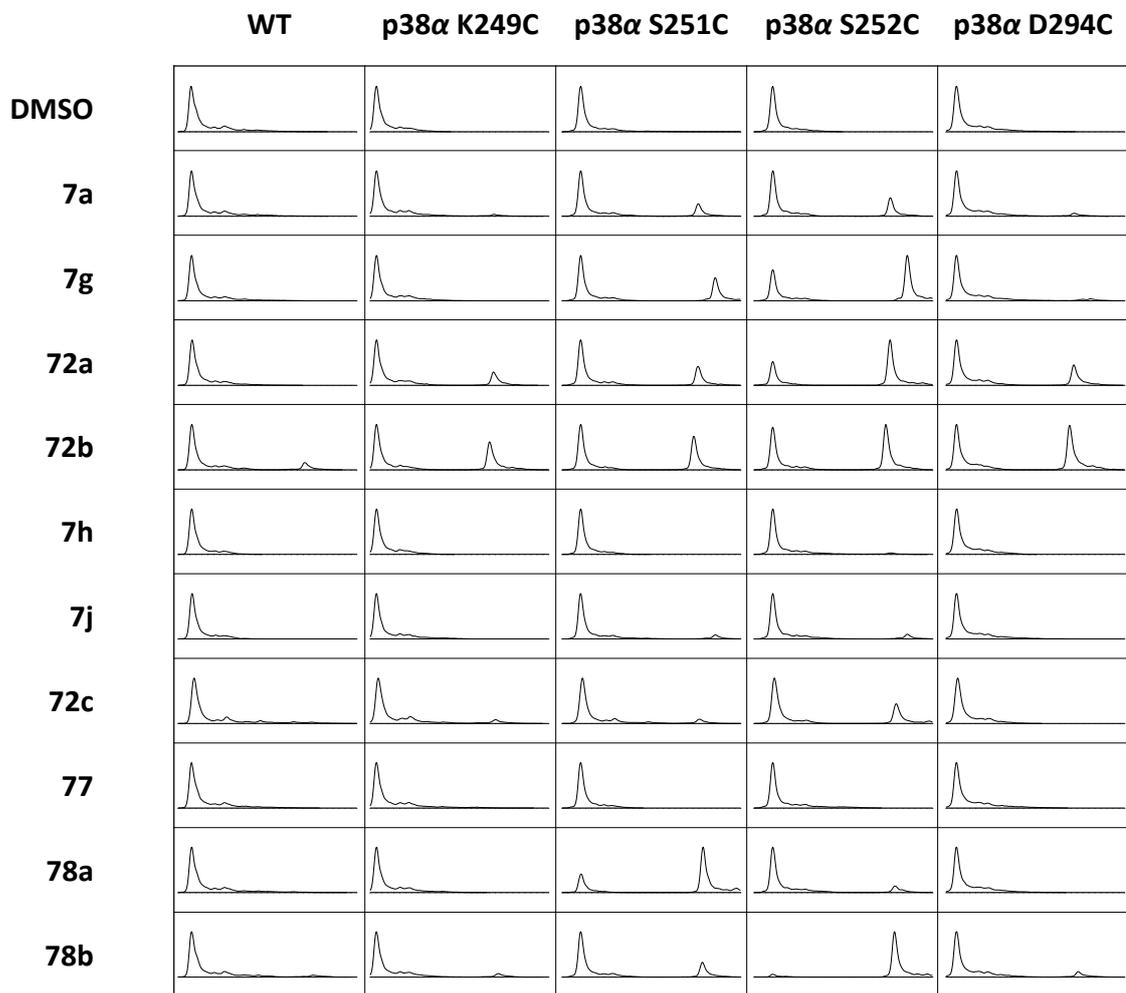


Abb. A3: Massenspektren von p38 α WT und den Mutanten K249C, S251C, S252C und D294C nach Inkubation mit kovalenten LiPoLis (und DMSO als Kontrolle).

9.4 Kristallographische Statistiken

Tab. A1: Kristallographische Statistiken der reversiblen LiPoLi-Derivate **3h,d,e** im Komplex mit p38 α (PDB: 5N63, 5N64, 5N65). Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	3h	3d	3e
Datensatz			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter			
a, b, c, (Å)	65.39, 74.90, 78.32	67.05, 74.77, 78.41	68.95, 69.74, 74.20
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.0 – 2.40 (2.50 – 2.40)	50.00 – 2.40 (2.50 – 2.40)	50.00 – 2.00 (2.10 – 2.00)
R _{meas} (%)	8.1 (114.2)	8.3 (115.3)	12.6 (105.6)
I/ σ I	21.50 (2.76)	17.36 (1.92)	15.76 (2.65)
CC _{1/2}	100 (99.9)	99.9 (70.6)	99.9 (85.5)
Vollständigkeit (%)	100 (99.9)	99.9 (100)	100 (100)
Redundanz	13.0 (13.6)	6.5 (6.8)	13.0 (13.5)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	49.26 – 2.40	42.11 – 2.40	40.91 – 2.00
Anzahl der Reflexe	15592	15944	24783
R _{work} /R _{free}	19.46/22.82 (27.0/28.8)	20.43/24.07 (28.3/32.5)	19.21/21.63 (24.1/26.7)
Anzahl der Atome			
Protein	2638	2662	2689
Ligand	26	24	50
Wasser	32	44	175
B-Faktoren			
Protein	64.77	64.03	38.20
Ligand	66.77	72.47	55.16
Wasser	56.89	55.58	43.05
r.m.s.-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.008	0.003	0.004
Bindungswinkel (°)	0.912	0.638	0.675
Ramachandran-Plot			
Reste in			
bevorzugten Regionen	98.1 %	97.8 %	97.3 %
erlaubten Regionen	1.9 %	2.2 %	2.7 %
Ausreißer-Regionen	0 %	0 %	0 %

Tab. A2: Kristallographische Statistiken der reversiblen LiPoLi-Derivate **3l, o, n** im Komplex mit p38 α (PDB: 5N66, 5N67, 5N68). Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	3l	3o	3n
Datensatz			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter			
a, b, c, (Å)	66.75, 74.00, 79.23	66.12, 75.18, 78.35	66.24, 74.98, 78.86
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.00 – 2.40 (2.50 – 2.40)	50.0 – 1.90 (2.00 – 1.90)	50.0 – 1.85 (1.95 – 1.85)
R _{meas} (%)	13.9 (125.6)	8.6 (66.2)	5.0 (86.0)
I/ σ I	11.41 (1.95)	19.50 (3.86)	26.89 (3.05)
CC _{1/2}	99.6 (74.0)	99.9 (94.8)	100 (91.1)
Vollständigkeit (%)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
Redundanz	13.0 (13.7)	13.1 (12.7)	13.1 (13.2)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	49.57 – 2.40	41.94 – 1.90	42.01 – 1.85
Anzahl der Reflexe	15879	31410	34201
R _{work} /R _{free}	20.62/23.77 (28.0/32.5)	18.95/22.20 (29.1/32.1)	19.77/22.03 (34.7/38.9)
Anzahl der Atome			
Protein	2683	2653	2661
Ligand	67	35	32
Wasser	20	198	161
B-Faktoren			
Protein	67.65	41.49	52.45
Ligand	90.20	49.10	49.13
Wasser	56.10	44.96	50.75
r.m.s.-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.003	0.008	0.008
Bindungswinkel (°)	0.540	0.884	0.904
Ramachandran-Plot			
Reste in			
bevorzugten Regionen	97.5 %	97.2 %	97.8 %
erlaubten Regionen	2.5 %	2.8 %	2.2 %
Ausreißer-Regionen	0 %	0 %	0 %

Tab. A3: Kristallographische Statistiken der reversiblen LiPoLi-Derivate **3t,u** im Komplex mit p38 α (PDB: unveröffentlicht). Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	3t	3u
Datensatz		
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter		
a, b, c, (Å)	65.80, 74.79, 78.90	64.59, 74.93, 77.61
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.0 – 2.0 (2.05 – 2.00)	50.0 – 2.1 (2.15 – 2.10)
R _{meas} (%)	7.4 (64.6)	11.7 (92.0)
I/ σ I	22.5 (4.3)	18.9 (2.9)
Vollständigkeit (%)	99.6 (99.2)	100 (100)
Redundanz	12.9 (13.5)	12.7 (13.3)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	49.40 – 2.00	48.92 – 2.10
Anzahl der Reflexe	26860	22580
R _{work} /R _{free}	20.9/23.4	20.4/23.9
Anzahl der Atome		
Protein	2669	2651
Ligand	31	31
Wasser	88	75
B-Faktoren		
Protein	48.96	49.49
Ligand	51.47	56.67
Wasser	46.67	45.52
r.m.s.-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.004	0.003
Bindungswinkel (°)	0.673	0.641
Ramachandran-Plot		
Reste in		
bevorzugten Regionen	97.8 %	98.1 %
erlaubten Regionen	2.2 %	1.9 %
Ausreißer-Regionen	0 %	0 %

Tab. A4: Kristallographische Statistiken der kovalenten LiPoLi-Derivate **78a** im Komplex mit p38 α S251C (PDB: 5O8U) und **78b** im Komplex mit p38 α S252C (PDB: 5O8V). Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	p38 α S251C- 78a	p38 α S252C- 78b
Datensatz		
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter		
a, b, c, (Å)	65.20, 74.25, 77.82	67.58, 74.05, 76.71
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.0 – 2.0 (2.05 – 2.0)	50.0 – 2.0 (2.05 – 2.0)
R _{meas} (%)	9.4 (104.9)	15.4 (90.8)
I/ σ I	21.36 (2.78)	14.42 (2.64)
Vollständigkeit (%)	100 (100)	100 (99.7)
Redundanz	13.2 (13.7)	12.9 (11.2)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	48.99 – 2.00 (2.052 – 2.0)	41.84 – 2.00 (2.052 – 2.0)
Anzahl der Reflexe	24856	25307
R _{work} /R _{free}	20.61/26.88 (31.0/35.8)	20.25/25.21 (35.9/36.4)
Anzahl der Atome		
Protein	2598	2615
Ligand	31	31
Wasser	79	79
B-Faktoren		
Protein	44.32	35.37
Ligand	48.96	29.86
Wasser	41.31	36.94
r.m.s.-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.017	0.016
Bindungswinkel (°)	1.768	1.679
Ramachandran-Plot		
Reste in		
bevorzugten Regionen	97.5 %	97.8 %
erlaubten Regionen	2.5 %	2.2 %
Ausreißer-Regionen	0 %	0 %

Tab. A5: Kristallographische Statistiken der *R-Spine*-interagierenden Inhibitoren **100h,g,j** im Komplex mit p38 α (PDB: 5MTX, 5MTY, 5TBE). Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	100h	100g	100j
Datensatz			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter			
a, b, c, (Å)	66.30, 69.10, 70.40	67.65, 70.21, 74.57	67.12, 70.18, 74.86
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	47.84 – 2.30 (2.36 – 2.30)	50.00 – 1.80 (1.85 – 1.80)	40.71 – 2.31 (2.44 – 2.31)
R _{meas} (%)	10.1 (42.4)	6.2 (157.0)	20.0 (116.8)
I/ σ I	10.1 (2.3)	24.88 (1.76)	10.1 (2.7)
Vollständigkeit (%)	99.9 (99.8)	100 (99.9)	99.9 (100)
Redundanz	5.1 (5.0)	12.9 (12.3)	11.7 (12.3)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	47.8 – 2.3 (2.36 – 2.30)	48.72 – 1.80	51.20 – 2.31
Anzahl der Reflexe	13840	31220	15191
R _{work} /R _{free}	20.1/27.1 (30.7/30.9)	19.1/23.3	22.1/27.1
Anzahl der Atome			
Protein	2703	2674	2618
Ligand	44	84	79
Wasser	37	134	36
B-Faktoren			
Protein	42.52	34.96	41.29
Ligand	35.58	38.75	46.05
Wasser	35.23	37.57	32.10
r.m.s.-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.015	0.020	0.013
Bindungswinkel (°)	1.712	1.958	1.675
Ramachandran-Plot			
Reste in			
bevorzugten Regionen	96.0 %	97.8 %	96.6 %
erlaubten Regionen	4.0 %	2.2 %	3.4 %
Ausreißer-Regionen	0 %	0 %	0 %

Tab. A6: Kristallographische Statistiken der *R-Spine*-interagierenden Inhibitoren **101a-c** im Komplex mit p38 α (PDB: unveröffentlicht). Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	101a	101b	101c
Datensatz			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter			
a, b, c, (Å)	67.03, 70.90, 75.50	66.78, 70.82, 75.48	66.61, 74.28, 79.98
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.0 – 2.30 (2.36 – 2.30)	66.87 – 1.81 (1.91 – 1.81)	50 – 2.85 (2.92 – 2.85)
R _{meas} (%)	13.1 (78.6)	26.0 (161.9)	13.9 (141.0)
I/ σ I	13.5 (3.4)	6.1 (1.7)	15.6 (2.1)
Vollständigkeit (%)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
Redundanz	12.8 (13.2)	10.8 (11.2)	12.8 (12.8)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	40.93 – 2.30	51.65 – 1.81	49.59 – 2.85
Anzahl der Reflexe	16521	31594	9698
R _{work} /R _{free}	21.9/25.0	23.9/28.3	21.4/24.1
Anzahl der Atome			
Protein	2685	2632	2725
Ligand	75	75	48
Wasser	35	106	0
B-Faktoren			
Protein	43.09	33.90	76.43
Ligand	41.78	33.04	82.32
Wasser	38.45	33.00	-
r.m.s.-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.007	0.016	0.009
Bindungswinkel (°)	1.284	1.811	1.650
Ramachandran-Plot			
Reste in			
bevorzugten Regionen	96.9 %	98.5 %	98.5 %
erlaubten Regionen	2.8 %	1.5 %	1.5 %
Ausreißer-Regionen	0.3 %	0 %	0 %

Tab. A7: Kristallographische Statistiken der Halogen-modifizierten Inhibitoren **103b-d** im Komplex mit p38 α (PDB: 5MYZ, 5MZ0, 5MZ1; unveröffentlicht). Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	103b	103c	103d
Datensatz			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter			
a, b, c, (Å)	66.24, 74.19, 79.69	66.37, 74.14, 79.49	66.05, 74.40, 78.36
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.00 – 2.30 (2.36 – 2.30)	50.00 – 2.30 (2.40 – 2.30)	50.00 – 2.55 (2.62 – 2.55)
R _{meas} (%)	9.4 (56.4)	14.4 (91.6)	17.1 (73.0)
I/ σ I	21.2 (5.1)	15.3 (3.2)	16.1 (3.3)
Vollständigkeit (%)	99.6 (100.0)	99.9 (99.8)	99.9 (99.5)
Redundanz	11.8 (12.1)	13.1 (13.5)	12.7 (10.8)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	49.41 – 2.30	49.45 – 2.30	49.39 – 2.55
Anzahl der Reflexe	17927	17984	13071
R _{work} /R _{free}	23.0/27.0	19.1/23.6	19.3/23.4
Anzahl der Atome			
Protein	2765	2749	2720
Ligand	23	43	63
Wasser	31	170	19
B-Faktoren			
Protein	45.33	34.55	47.37
Ligand	38.50	29.00	42.00
Wasser	38.88	36.98	38.50
r.m.s.-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.004	0.007	0.009
Bindungswinkel (°)	0.740	0.999	1.240
Ramachandran-Plot			
Reste in			
bevorzugten Regionen	98.5 %	98.8 %	98.2 %
erlaubten Regionen	1.5 %	1.2 %	1.8 %
Ausreißer-Regionen	0 %	0 %	0 %

Tab. A8: Kristallographische Statistiken der Kinaseinhibitoren Regorafenib und Sorafenib im Komplex mit p38 α (PDB: unveröffentlicht).

	Regorafenib 1	Regorafenib 2	Sorafenib 1	Sorafenib 2
Datensatz				
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
Zellparameter				
a, b, c, (Å)	66.92, 74.47, 77.96	66.87, 74.61, 77.89	66.20, 74.86, 78.07	66.11, 74.79, 77.72
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.0 – 2.50 (2.57 – 2.50)	50.0 – 2.60 (2.67 – 2.60)	50.0 – 1.90 (1.95 – 1.90)	50.0 – 2.00 (2.05 – 2.00)
R _{meas} (%)	15.8 (72.2)	13.3 (62.6)	8.4 (72.4)	11.7 (88.0)
I/ σ I	15.15 (3.01)	17.58 (3.31)	25.73 (3.00)	18.29 (3.07)
Vollständigkeit (%)	100.0 (100.0)	99.9 (99.0)	99.9 (99.0)	100 (99.9)
Redundanz	12.5 (9.2)	11.9 (7.0)	12.6 (9.1)	12.9 (12.3)
Verfeinerung				
Auflösung (Å)	41.95 – 2.50	41.96 – 2.60	41.86 – 1.80	41.77 – 2.00
Anzahl der Reflexe	13292	11849	34797	25334
R _{work} /R _{free}	20.6/27.6	19.9/26.7	18.8/21.5	20.6/25.6
Anzahl der Atome				
Protein	2632	2618	2628	2634
Ligand	53	49	52	52
Wasser	9	7	143	60
B-Faktoren (Å ²)				
Protein	42.62	42.68	34.57	37.98
Ligand	45.70	42.50	30.91	37.20
Wasser	31.86	35.24	36.13	34.82
r.m.s.-Abweichungen				
Bindungslängen(Å)	0.013	0.013	0.020	0.017
Bindungswinkel (°)	1.699	1.629	1.949	1.815
Ramachandran-Plot				
Reste in				
bevorzugten Regionen	97.2 %	97.2 %	98.1 %	98.1 %
erlaubten Regionen	2.8 %	2.8 %	1.9 %	1.9 %
Ausreißer-Regionen	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %

Tab. A9: Kristallographische Statistiken der Kinaseinhibitoren **104d** (PDB: 5ML5) und **107a,b** (PDB: unveröffentlicht) im Komplex mit p38 α . Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

	104d	107a	107b
Datensatz			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter			
a, b, c, (Å)	66.50, 69.39, 74.14	66.82, 74.96, 78.74	64.42, 74.98, 77.71
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	50.0 – 1.90 (1.95 – 1.90)	50.0 – 2.00 (2.05 – 2.00)	50.0 – 2.50 (2.56 – 2.50)
R _{meas} (%)	9.0 (82.0)	8.9 (94.2)	6.3 (96.0)
I/ σ I	22.69 (3.38)	20.71 (3.12)	26.78 (3.44)
Vollständigkeit (%)	100 (100)	100 (100)	99.1 (99.5)
Redundanz	12.7 (12.9)	13.1 (13.5)	12.6 (13.5)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	48.01 – 1.90	42.14 – 2.00	48.86 – 2.50
Anzahl der Reflexe	26280	26010	12754
R _{work} /R _{free}	19.5/23.9	18.6/24.5	21.8/27.7
Anzahl der Atome			
Protein	2623	2727	2518
Ligand	95	43	32
Wasser	103	172	7
B-Faktoren			
Protein	26.63	34.57	66.64
Ligand	36.87	30.78	83.19
Wasser	26.63	38.38	51.37
r.m.s.-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.019	0.019	0.013
Bindungswinkel (°)	2.029	1.885	1.545
Ramachandran-Plot			
Reste in			
bevorzugten Regionen	97.8 %	98.2 %	96.8 %
erlaubten Regionen	2.2 %	1.8 %	3.2 %
Ausreißer-Regionen	0 %	0 %	0 %

9.5 Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Matrikel-Nr.

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, §63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW. Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar. Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, §156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, §161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Ort, Datum

Unterschrift

Titel der Dissertation:

Strukturbiologische Untersuchungen von Kinaseinhibitoren: Entwicklung, Synthese und biophysikalische Charakterisierung von Liganden zur Adressierung einer lipophilen Bindetasche in der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 α

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

9.6 Lebenslauf

Mike Bührmann
Leibnizstraße 30
44147 Dortmund

Ausbildung

03/2013 – 2017

Promotion an der Technischen Universität Dortmund
Dissertation: “Strukturbiologische Untersuchungen von Kinaseinhibitoren: Entwicklung, Synthese und biophysikalische Charakterisierung von Liganden zur Adressierung einer lipophilen Bindetasche in der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 α ”

04/2010 – 12/2012

Master of Science in Chemischer Biologie an der Technischen Universität Dortmund
Abschlussnote: 1.9
Master-Arbeit: “Struktur-basiertes Design, Synthese und Biochemische Evaluierung von potentiell irreversiblen Liganden der Myristoyl-Bindungstasche in *c-Abl*”

10/2006 – 09/2009

Bachelor of Science in Chemie Hauptfach, Biologie Nebenfach an der Universität Bremen
Abschlussnote: 1.9
Bachelor-Arbeit: “Analyse der Reaktivität von Eisen(III)oxid-Nanopartikeln”

08/1999 – 06/2006

Abitur am Gymnasium Horn, Bremen
Abschlussnote: 1.8
Hauptfächer: Biologie, Mathematik
Weitere Prüfungsfächer: Deutsch, Philosophie

Fähigkeiten

Sprache

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Geschäftssicher
Spanisch	Grundkenntnisse

IT-Kenntnisse

MS Office	Sehr gut
PyMOL	Sehr gut