

Strukturbasierte Entwicklung und Synthese von Enzyminhibitoren

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Der Fakultät Chemie
der Technischen Universität Dortmund
vorgelegt

von

Matthäus Getlik

Dortmund 2011

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2007 bis Dezember 2010 unter der Anleitung von Prof. Dr. Daniel Rauh am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Allgemeiner Teil.....	1
1.1 Proteinkinasen.....	1
1.2 Die Struktur von Proteinkinasen.....	2
1.3 Kinaseinhibitoren.....	4
1.4 Personalisierte Medizin.....	7
1.5 Kinaseinhibitoren in der zielgerichteten Therapie.....	9
2 <i>N</i>-Aryl-<i>N'</i>-Pyrazolharnstoffe.....	15
2.1 Einleitung.....	15
2.2 Zielsetzung.....	15
2.3 Ergebnisse.....	16
2.3.1 Strukturbasiertes Design einer fokussierten Substanzbibliothek.....	16
2.3.2 Syntheseroute.....	17
2.3.3 Synthese der <i>N</i> -Aryl- <i>N'</i> -Pyrazolharnstoffe.....	19
2.3.4 Strukturbiologische Validierung.....	22
2.4 Diskussion.....	22
2.4.1 p38 α -FLiK-Assay.....	23
2.4.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Pyrazolharnstoffe.....	24
2.4.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Typ-II-Hybridinhibitoren.....	26
2.5 Zusammenfassung.....	30
2.6 Publikationen/Patent.....	30
3 Design und Synthese von Typ-II-Hybridinhibitoren.....	31
3.1 Einleitung.....	31
3.2 Zielsetzung.....	31

3.3	Ergebnisse	32
3.3.1	Typ-III-Inhibitoren hemmen die wirkstoffresistente cSrcT338M-Mutant.....	32
3.3.2	Design potenter Typ-II-Hybridinhibitoren für die cSrc Kinase.....	34
3.3.3	Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek neuartiger Typ-II-Inhibitoren	36
3.3.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung der neuen Typ-II-Hybridinhibitoren.....	38
3.3.5	Strukturbiologische Untersuchung der Hybridinhibitoren.....	40
3.3.6	Typ-II-Inhibitoren unterdrücken Zell-Zell-Kontakte in Tumorzelllinien.....	42
3.3.7	Zusammenfassung.....	45
3.4	Publikationen	47
4	<i>N</i>-Pyrazol-<i>N'</i>-Thiazolharnstoffe als p38α-Inhibitoren	49
4.1	Einleitung.....	49
4.2	Motivation und Zielsetzung	50
4.3	Ergebnisse	51
4.3.1	Strukturbasierte Entwicklung von Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren für p38 α	51
4.3.2	Biochemische Validierung.....	58
4.3.3	Zelluläre Validierung von 4.5c	59
4.3.4	Synthese der <i>N</i> -Pyrazol- <i>N'</i> -Thiazolharnstoffe.....	61
4.4	Diskussion.....	65
4.5	Zusammenfassung.....	67
4.6	Publikation	67
5	Allosterische Modulatoren von p38α und Bcr-Abl.....	69
5.1	Einleitung.....	69
5.2	2-Phenylchinazoline als p38 α -Modulatoren	71
5.3	Zielsetzung	73
5.4	Ergebnisse	74
5.4.1	Synthese	74
5.4.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	75

5.4.3	Strukturbiologische Validierung der p38 α -Liganden	77
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	80
5.6	Publikationen	81
5.7	Aminoarylpyrimidine als allosterische Inhibitoren der Abl Kinase	83
5.8	Zielsetzung	84
5.9	Ergebnisse	84
5.9.1	Syntheseroute für GNF-2 und einige Analoga.....	86
5.9.2	Synthese von GNF-2 und weiterer Analoga	86
5.9.3	Verwendung der synthetisierten Verbindungen.....	88
5.10	Zusammenfassung.....	88
6	Entwicklung kovalenter EGFR-Inhibitoren	89
6.1	Einleitung	89
6.2	Motivation und Zielsetzung	93
6.3	Ergebnisse	95
6.3.1	Strukturbasiertes Design kovalenter EGFR-Inhibitoren.....	95
6.3.2	Synthese der 2-Phenylchinazoline	99
6.4	Diskussion.....	103
6.5	Zusammenfassung.....	110
7	PIK-75.....	113
7.1	Einleitung	113
7.2	Zielsetzung	113
7.3	Ergebnisse	114
7.3.1	Synthese	114
7.3.2	Zelluläre Validierung von PIK-75	114
7.4	Zusammenfassung.....	115
7.5	Publikation	116
8	Zusammenfassung	117
9	Experimenteller Teil.....	123
9.1	Vorbemerkungen.....	123
9.2	Herstellung der Pyrazolharnstoffe	124

9.2.2	Expression und Aufreinigung von p38 α	145
9.2.3	Kristallisation der p38 α -Inhibitor-Komplexe	146
9.3	Herstellung der Typ-II-Hybridinhibitoren	146
9.3.2	Zellkultur und Immunoblots	153
9.4	Herstellung der Thiazolharnstoffe	154
9.5	Herstellung der Aminoarylpyrimidine	175
9.6	Herstellung der 2-Phenylchinazoline als Lipid-Binder	179
9.7	Herstellung der kovalenten EGFR-Inhibitoren	185
9.8	Herstellung PIK-75	199
9.9	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	200
9.9.1	IC ₅₀ -Werte für EGFR	200
9.9.2	IC ₅₀ -Werte für p38 α	202
Literaturverzeichnis		205

Abkürzungsverzeichnis

Abl	Abelson Kinase
Äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
Bcr-Abl	Bruchpunkt-Cluster-Region Abelson Kinase
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BSA	Rinderserumalbumin
CAMK1D	Calmodulin-abhängige Protein Kinase 1
CDK2	Cyclin-abhängige Kinase 2
cKit	Stammzellfaktor-Rezeptor
cSrc	Zelluläre Sarkoma Kinase
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFC	Enzym-Fragment-Komplementierung

EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FDA	Amerikanische Zulassungsbehörde
FLiK	Fluoreszente Label in Kinasen
ges.	Gesättigt
GI ₅₀	Mittlere Konzentration der Wachstumshemmung
GSK3	Glykogen Synthase Kinase-3
HeLa Zellen	Henrietta Lacks Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HTRF	Homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
JIP	JNK-interagierendes Protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K _D	Dissoziationskonstante
konz.	Konzentriert
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeCN	Acetonitril

MeOH	Methanol
Min.	Minute(n)
MK2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase 2
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NSCLC	Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
OD	Optische Dichte
PDB	Proteindatenbank
PDGFR α	Blutplättchen abstammender Wachstumsfaktor-Rezeptor α
PDK1	Phosphoinositol-abhängige Proteinkinase-1
PE	Petrolether
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	cAMP-abhängige Protein Kinase A
RSK1/2	Risbosomale S6 Kinase 1/2
RT	Raumtemperatur
SBWD	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign
SILAC	Markierung von Aminosäuren mit stabilen Isotopen in Zellkultur
Std.	Stunde(n)
SWB	Struktur-Wirkungs-Beziehung
TFA	Trifluoressigsäure
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor

VIII Abkürzungsverzeichnis

TrocCl	2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat
U	Einheit
wässr.	Wässrig
WT	Wildtyp

1 Allgemeiner Teil

1.1 Proteinkinasen

Zellen stellen überaus komplexe Systeme dar und werden durch eine Vielzahl feiner Regulierungsmechanismen gesteuert. Eine wichtige Rolle spielen dabei die posttranslationalen Modifikationen von Proteinen. Eine der bedeutendsten Modifikationen ist die Phosphorylierung. Durch die Übertragung einer Phosphatgruppe wird die Aktivität verschiedenster Funktionsträger wie Enzymen, Ionenkanälen oder Transkriptionsfaktoren gesteuert.¹ Für die Übertragung der Phosphatgruppe ist die Enzymfamilie der Kinasen verantwortlich. Sie gehört zur Klasse der Transferasen und zählt mit ca. 518 Vertretern zu einer der größten Proteinfamilien im menschlichen Genom. Kinasen katalysieren die Übertragung des γ -Phosphats von Adenosintriphosphat (ATP) vornehmlich auf die Hydroxyl-Seitenketten der Aminosäuren Serin, Threonin sowie Tyrosin verschiedenster Substrate, die häufig selbst Kinasen sind.² In Prokaryoten werden auch Kinasen beobachtet, die die Seitenketten von Histidin, Glutamat, Aspartat oder auch Asparagin phosphorylieren.³⁻⁵ Die Übertragung eines Phosphatrestes auf ein Protein kann zu Konformationsänderungen führen, wodurch Protein-Protein Wechselwirkungen oder die Enzymaktivität reguliert werden können. Darüber hinaus können Signalübertragungen z. B. in Form von weiteren Phosphorylierungen induziert werden. So entstehen für die intrazelluläre Signalübertragung sehr komplexe Signaltransduktionskaskaden, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Überleben, Migration und Transkription steuern.^{2,6} Phosphatasen sind die Gegenspieler der Kinasen. Diese Enzyme greifen in die Regulation der Signalübertragungen ein, indem sie Phosphatgruppen hydrolytisch entfernen. Nur ein genau ausbalanciertes Zusammenspiel beider Enzymklassen gewährleistet eine kontrollierte Signalübertragung. Störungen dieses dynamischen Gleichgewichts zwischen Phosphatasen und Kinasen können die Signaltransduktionskaskaden verändern und in verschiedenen Erkrankungen wie z. B. Arthritis, Diabetes, Autoimmunerkrankungen oder Krebs resultieren.⁷ Aufgrund des immer detaillierteren Wissens über zelluläre Signalwege, in denen Kinasen zentrale

Funktionen übernehmen, gelten diese Enzyme als eine besonders interessante Klasse therapeutischer Zielproteine in der Wirkstoffforschung.

1.2 Die Struktur von Proteinkinasen

Proteinkinasen lassen sich nach ihrer phylogenetischen Beziehung sowie nach ihrer Substratspezifität klassifizieren. Dabei wird zwischen Tyrosinkinasen und Serin/Threonin-Kinasen unterschieden. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit besitzen alle Proteinkinasen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit.² Insbesondere die ATP-Bindungstasche ist stark konserviert, da alle Kinasen ATP als Kosubstrat nutzen und die Übertragung des γ -Phosphatrestes katalysieren. Die Kinasedomäne von Proteinkinasen ist aus zwei Subdomänen aufgebaut – der N-terminalen Subdomäne, die überwiegend aus β -Faltblättern besteht, und der C-terminalen Subdomäne, welche mehrheitlich aus α -Helices aufgebaut ist. Die beiden Subdomänen werden durch die Scharnierregion – einen kurzen Strang von bis zu 8 Aminosäuren – miteinander verknüpft. Diese gewährleistet eine gewisse Flexibilität im Hinblick auf die relative Orientierung der beiden Domänen zueinander, welche eine wichtige Rolle bei der katalysierten Phosphat-Übertragung spielt.⁶ Die beiden Subdomänen formen gemeinsam mit der Scharnierregion das katalytisch aktive Zentrum des Proteins, wo die Übertragung des γ -Phosphatrestes von ATP auf ein spezifisches Substrat katalysiert wird (Abb. 1.1).

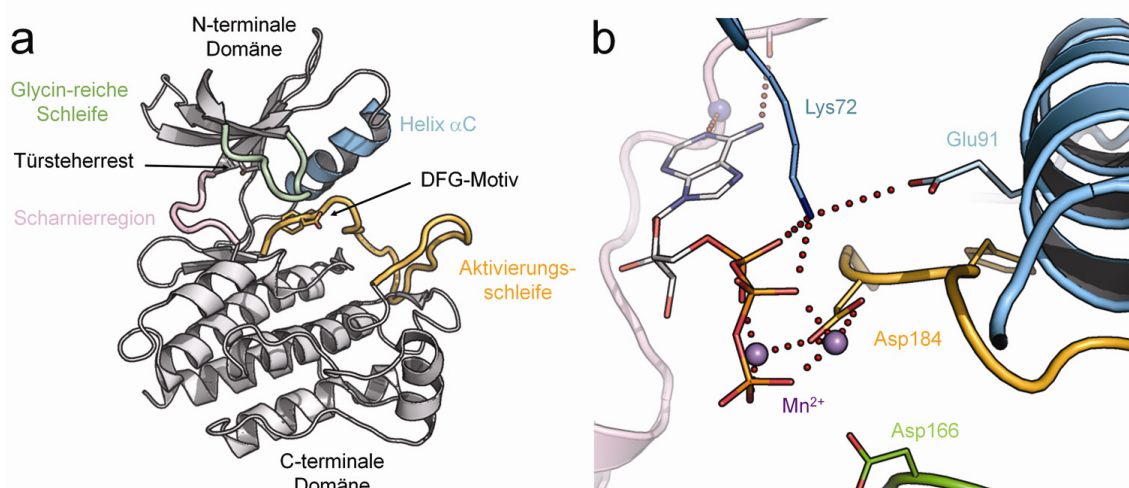


Abb. 1.1: a) Wichtige Strukturelemente einer Proteinkinase (PDB-Code: 3G5D). b) Detaillierte Darstellung der ATP-Bindungstasche der PKA (PDB-Code: 1ATP).⁸ Der Adeninkern bindet über zwei Wasserstoffbrücken (rote gepunktete Linien) an die Scharnierregion. Die Phosphatgruppen werden durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen für die Übertragung des γ -Phosphatrestes positioniert.

ATP bindet dabei über zwei konservierte Wasserstoffbrücken an den Peptidstrang der Scharnierregion.* Der Triphosphatrest wird durch ein Netzwerk zahlreicher Wechselwirkungen für den katalytischen Vorgang optimal ausgerichtet, und durch zwei Mn^{2+} -Ionen und Lys72, die ihrerseits vom Glu91 der Helix C koordiniert werden, sowie der Glycin-reichen Schleife, die sich in der N-terminalen Domäne befindet, stabilisiert. Die Glycin-reiche Schleife ist zudem eine wichtige Selektivitätsdeterminante für die Bindung von Kinaseinhibitoren.^{9,10} Weiterhin koordiniert Asp184 des DFG-Motivs (Asp-Phe-Gly) eines der zwei Mn^{2+} -Ionen. Asp166 fungiert als katalytische Base bei der Phosphatübertragung (Abb. 1.1).⁶ Die Position der Helix C und der Glycin-reichen Schleife wird von der Konformation der Aktivierungsschleife beeinflusst. Diese kann durch Phosphorylierung verschiedene räumliche Anordnungen annehmen, wodurch die Aktivität der Kinase reguliert wird. Die äußerst flexible Aktivierungsschleife beginnt mit dem konservierten DFG-Motiv, das an der Positionierung des Triphosphatrestes von ATP beteiligt ist und größere konformelle Änderungen bei dem Übergang zwischen aktivem und inaktivem Zustand einer Kinase durchläuft. Dabei bewegt sich das Phenylalanin um etwa 10 Å in Richtung der ATP-Bindungstasche und öffnet dadurch den Zugang zu einem hydrophoben Bereich, der allosterischen Tasche.⁶ Bestimmte Inhibitoren binden in dieser Region und stabilisieren so die enzymatisch inaktive DFG-*out*-Konformation. Beim Übergang von der N-terminalen Subdomäne zur Scharnierregion befindet sich der sogenannte Türsteherrest. Größe und Polarität dieser konservierten Aminosäure kontrollieren den Zugang zu einer benachbarten hydrophoben Tasche und üben dadurch einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität und Affinität von Kinaseinhibitoren aus. Gerade an dieser Position werden häufig Mutationen beobachtet, die zu Wirkstoffresistenzen gegen Kinaseinhibitoren führen. Dabei kommt es vielfach zum Austausch von kleineren Aminosäuren (Thr) durch hydrophobe und sterisch anspruchsvollere Reste (Ile, Met). Infolge dieser Mutationen werden erhöhte enzymatische Aktivitäten bei Kinasen beobachtet.¹¹ Größere, hydrophobe Reste an der Türsteherposition bewirken eine zusätzliche Stabilisierung des sogenannten hydrophoben Rückgrats, das von vier Aminosäuren ausgebildet wird. Dieses verbindet die C- und N-terminale Domäne im Bereich des

* Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich im weiteren Verlauf dieses Abschnitts auf die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA), die erste Kinase deren Struktur gelöst werden konnte (PDB-Code: 1ATP).

katalytischen Zentrums miteinander, stabilisiert dabei die aktive Konformation und resultiert letztlich in einer Aktivierung der Kinase.^{11,12} Darüber hinaus erschweren sperrige Türsteherreste die Bindung von ATP-kompetitiven Inhibitoren^{13,14} und erhöhen zudem die Affinität der Kinase zu ATP.¹⁵ Das Zusammenspiel dieser Faktoren verhindert bisher die Entwicklung von Wirkstoffen, die Resistenzmutationen des Türsteherrestes effektiv umgehen können.

1.3 Kinaseinhibitoren

Kinaseinhibitoren werden häufig als Typ-I-, Typ-II-, Typ-III-, Typ-IV- und kovalente Inhibitoren klassifiziert. Letztere basieren überwiegend auf den Grundgerüsten der Typ-I-Inhibitoren, besitzen jedoch zusätzlich die Fähigkeit, Aminosäureseitenketten zu alkylieren. Substratmimetika repräsentieren eine weitere Inhibitor-Klasse. Die Grundlage für die Unterscheidung der einzelnen Inhibitoren bieten der jeweilige Bindungsmodus und die Wirkungsweise einer Verbindung.

Typ-I-Inhibitoren binden ähnlich dem ATP in die ATP-Bindungstasche und bilden Wasserstoffbrücken zu der Scharnierregion aus. Dabei hemmen sie die Kinaseaktivität ATP-kompetitiv und binden an die enzymatisch aktive DFG-*in*-Konformation der Kinase. Ein marktzugelassener Typ-I-Inhibitor ist Dasatinib,¹⁶ der zusätzlich zu den Wasserstoffbrücken mit der Scharnierregion eine direkte Wasserstoffbrücke zu dem Türsteherrest ausbildet (Abb. 1.2).

Typ-II-Inhibitoren verhalten sich ebenfalls ATP-kompetitiv, allerdings unterscheiden sie sich maßgeblich in ihrem Bindungsmodus von Typ-I-Inhibitoren. Sie stabilisieren die inaktive DFG-*out*-Konformation, bei der sich das DFG-Motiv in einer auswärts gerichteten Konformation befindet. Dadurch wird eine Bindung in die allosterische Tasche zusätzlich zur ATP-Region ermöglicht, wobei häufig Wasserstoffbrückenbindungen zur Helix C sowie zum Peptidrückgrat des DFG-Motivs ausgebildet werden.

Typ-III-Inhibitoren binden ausschließlich in die allosterische Tasche von Kinasen, die sich in der inaktiven DFG-*out*-Konformation befinden. Sie gehen ähnlich den Typ-II-Inhibitoren Wechselwirkungen mit der Helix C sowie dem DFG-Motiv ein, bilden

jedoch keinen Kontakt zur Scharnierregion aus. Prominente Vertreter dieser Klasse sind die Pyrazolharnstoffe (Abb. 1.2).

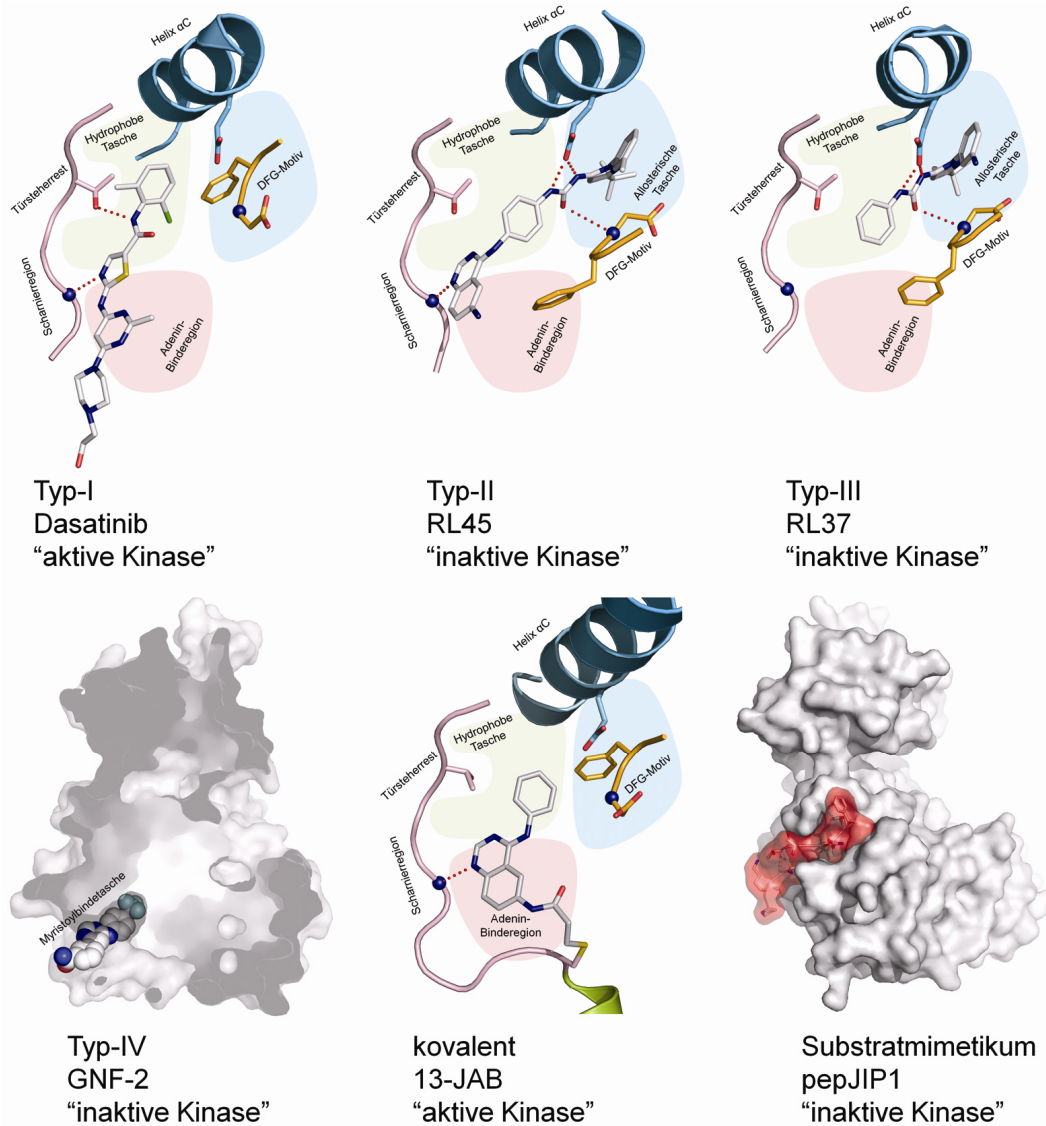


Abb. 1.2: Bindungsmodi verschiedener Kinaseinhibitoren. a) Der Typ-I-Inhibitor Dasatinib bindet an die Scharnierregion der Tyrosinkinase cSrc (PDB-Code: 3G5D). b) RL45, ein Typ-II-Inhibitor, im Komplex mit cSrc (PDB-Code: 3F3V). Der Inhibitor erstreckt sich von der ATP- bis hin in die allosterische Bindungsstelle. c) RL37 belegt lediglich die allosterische Tasche von cSrc (PDB-Code: 3F3U). d) Das Pyrimidin GNF-2 bindet in die Myristoyl-Tasche der Tyrosinkinase Abl (PDB-Code: 3K5V). e) 13-JAB bildet eine kovalente Bindung mit der Kinasedomäne von EGFR aus (PDB-Code: 2J5F). f) Das Substratmimetikum pepJIP1 im Komplex mit JNK1 (PDB-Code: 1UKH).

Typ-IV-Inhibitoren sind rein allosterische Modulatoren, die in einiger Entfernung zum aktiven Zentrum der Kinase binden, wie z. B. GNF-2, ein von Novartis entwickelter Inhibitor, der die Myristoyl-Bindungstasche der Abelson Kinase (Abl) adressiert (Abb. 1.2).¹⁷ Studien mit diesem allosterischen Inhibitor haben gezeigt, dass in Kombination

mit einem Typ-II-Inhibitor (Nilotinib, Imatinib) Wirkstoffresistenzen umgangen werden können – auch die mit der Mutation des Türsteherrestes (T315I) assoziierte Resistenz. Die verschiedenen Wirkorte und Bindungsmechanismen der kombinierten Inhibitoren unterdrücken zudem die Entstehung solcher Resistenzen.¹⁸ Eine zentrale Herausforderung für die Entwicklung von Typ-IV-Inhibitoren ist der Mangel an Systemen, die eine Detektion allosterischer Inhibitoren erlauben. Letztere können über klassische aktivitätsbasierte Systeme zwar erkannt, aber nur selten von ATP-kompetitiven Inhibitoren unterschieden werden. Hinzu kommt, dass nur wenige strukturbiochemische Informationen über neue potentielle Bindungsstellen existieren. Die klinische Relevanz und der wenig erforschte chemische Raum neuer Inhibitor-Grundgerüste machen Typ-IV-Inhibitoren zu einer äußerst attraktiven Klasse von Kinaseinhibitoren.¹⁹

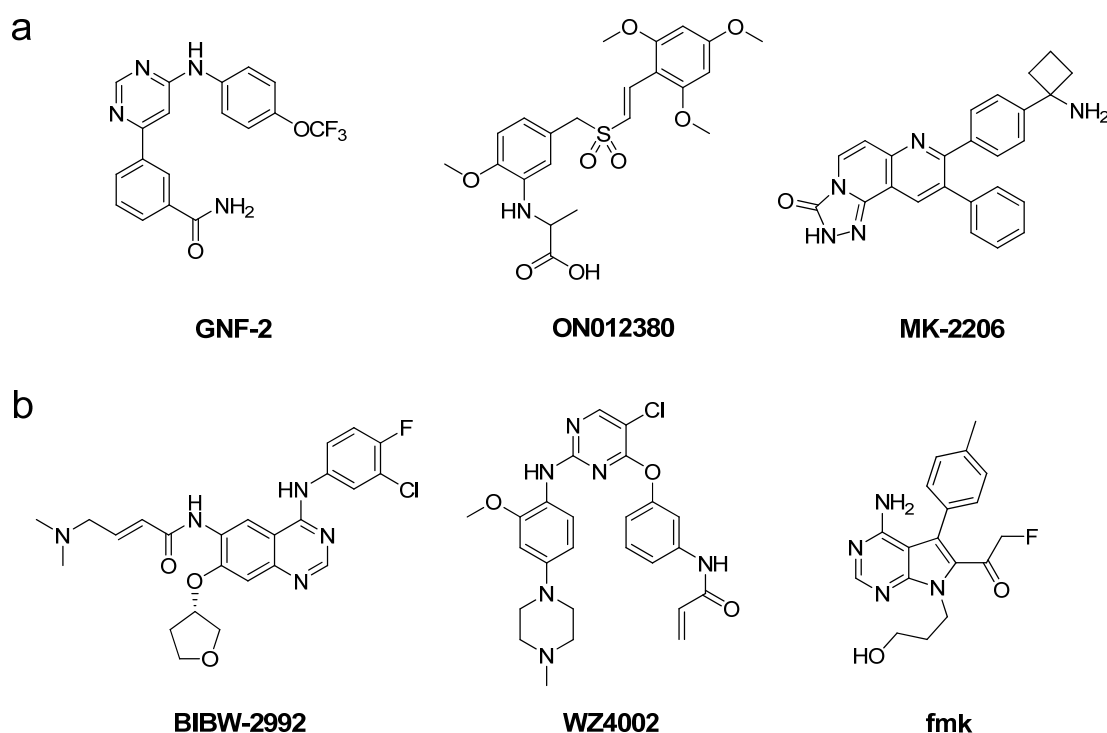


Abb. 1.3: Allosterische a) und kovalente b) Kinaseinhibitoren. a) Studien mit GNF-2¹⁸ und ON012380²⁰ haben gezeigt, dass die mit dem Türsteherrest (T315) assoziierte Wirkstoffresistenz in Bcr-Abl mit diesen Inhibitoren effektiv umgangen werden kann. MK-2206 bindet an die Pleckstrin-Homologie Domäne der Akt Kinasen und ist hochselektiv gegenüber verwandten Kinasen.²⁰ b) BIBW-2992 ist ein EGFR und HER2 Inhibitor und befindet sich in Phase III der klinischen Erprobung. Er scheint Medikamenten der ersten Generation dieser Klasse überlegen zu sein. WZ4002 wurde gegen die Wirkstoffresistente Variante EGFR T790M entwickelt und zeigt hervorragende Resultate in T790Mausmodellen.²¹ fmk ist ein selektiver RSK1/RSK2 Inhibitor.²²

Kovalente Inhibitoren basieren häufig auf bekannten Kinaseinhibitor-Grundgerüsten, die zusätzlich mit einem Elektrophil dekoriert sind. Diese reaktiven Gruppen können nukleophile Aminosäureseitenketten (z. B. Cystein) alkylieren und somit eine kovalente Bindung zu dem Protein ausbilden (Abb. 1.2). Voraussetzung für eine kovalente Modifikation ist die räumliche Nähe zwischen Elektrophil und Seitenkette, wobei auch eine ideale Ausrichtung der Gruppen zueinander essentiell ist. Die unmittelbare Umgebung kann zudem zur Aktivierung der nukleophilen Seitenketten führen.^{23,24} Derzeit befinden sich einige kovalente Kinaseinhibitoren in der klinischen Erprobung.²⁵ Von ihnen erhofft man sich, dass sie insbesondere auftretende Wirkstoffresistenzen umgehen und effizient inhibieren können. Kovalente Inhibitoren, die speziell gegen die wirkstoffresistente Variante EGFR T790M entwickelt wurden, zeigen bereits in Mausmodellen hervorragende Resultate (Abb. 1.3).²¹

Eine weitere, deutlich weniger erforschte Klasse von Kinaseinhibitoren, sind die Substratmimetika. Diese Verbindungen können kleine organische Moleküle sein (z. B. ON012380²⁰ (Abb. 1.3)), aber auch peptidischen Charakter besitzen und so klassische Substrate von Kinasen nachahmen, wie z. B. ein Peptid des Gerüstproteins JIP (JNK-interagierendes Protein), welches die JNK-Aktivität hemmt (Abb. 1.2).²⁶ Da solche Verbindungen weniger konservierte Substratbindungsstellen adressieren, können sie zu selektiveren Inhibitoren führen, die zudem intrazellulär nicht mit den hohen ATP-Konzentrationen konkurrieren müssen, und somit in geringeren und weniger toxischen Konzentrationen angewendet werden können.²⁷

1.4 Personalisierte Medizin

Mit der Entschlüsselung des humanen Genoms im Jahre 2001 brach eine neue Ära in der biomedizinischen Forschung an.^{28,29} Die Fortschritte des Humangenomprojektes legten zusammen mit der rasanten Weiterentwicklung der Sequenziertechnologien³⁰ die Grundlage für die genaue Untersuchung einzelner Gendefekte sowie des Zusammenspiels des gesamten Genoms und auch epigenomischer Faktoren. Diese Erkenntnisse liefern die Grundlage für den neuen Ansatz der personalisierten Medizin, die ihr Augenmerk auf die Diagnostik der einzelnen, für die Erkrankung verantwortlichen Gene, und die zielgerichtete Therapie des Individuums legt.³¹

Ein solcher Ansatz ist insbesondere bei der Krebstherapie erfolgreich, da vielfältige Schädigungen und Veränderungen des instabilen humanen Genoms zur Fehlregulation von zellulären Signalwegen führen können und somit die Entstehung und das Wachstum von Tumoren vorantreiben. Dabei kann ein einziges mutiertes Gen, in diesem Zusammenhang als Onkogen bezeichnet, für die Entstehung und die unkontrollierte Proliferation von Tumorzellen verantwortlich sein. Dies resultiert oftmals in einer Abhängigkeit des Tumorwachstums von dem Onkogen („*oncogene addiction*“),^{32,33} das sich folglich besonders gut als Angriffsziel für die zielgerichtete Behandlung eignet. Die konventionelle chemotherapeutische Behandlung bei der Tumorthapie mit unspezifischen Wirkstoffen zielt auf fundamentale zelluläre Prozesse wie die DNA-Replikation und die Zellteilung ab, schädigt aber gleichermaßen gesunde wie kranke Zellen, führt so zu nicht unerheblichen Nebenwirkungen und bleibt oft erfolglos. Diese Befunde erklären das besonders große Bedürfnis nach zielgerichteten Behandlungsmöglichkeiten.³⁴ Eine personalisierte Tumorthapie zielt darauf ab, vor Therapiebeginn genetische Läsionen zu identifizieren, die das Tumorwachstum antreiben. Durch den Einsatz spezifischer niedermolekularer Inhibitoren werden die onkogenen Zielmoleküle gezielt ausgeschaltet, wodurch die Erfolgsrate der Behandlung erhöht und gleichzeitig Nebenwirkungen eingeschränkt werden.^{34,35}

Für den zukünftigen Erfolg der personalisierten Medizin in der Onkologie werden ein verbessertes Verständnis der Tumorbiologie, die Identifikation molekularer Zielmoleküle sowie die rationale Entwicklung neuer Krebsmedikamente grundlegend sein.³⁵ Darüber hinaus wird die klinische Erprobung an vorausgewählten Patientengruppen essentiell sein, um die Ansprechraten neuer Medikamente zu steigern und gleichzeitig das Risiko für deren Scheitern zu minimieren. Durch die Erkennung und den Einsatz geeigneter Biomarker könnte bereits in frühen klinischen Tests der Erfolg neuer Krebsmedikamente zuverlässig angezeigt werden.³⁵ Des Weiteren wird die Zugänglichkeit der Diagnostik, d.h. Kosten und Genauigkeit, Voraussetzung für ihren alltäglichen Einsatz sein.³⁶ Mittlerweile konnten die Kosten für die Sequenzierung eines menschlichen Genoms mit neuesten Techniken – z. B. basierend auf DNA-Nanoarrays – auf etwa \$4400 gesenkt werden.³⁷ Dadurch ist man dem Ziel nahe, diese Kosten auf

unter \$1000 zu reduzieren, und sie dadurch für den klinischen Gebrauch als Standardverfahren einsetzbar zu machen.³¹

Vor diesem Hintergrund wurden das „*Cancer Genome Project*“ (1999)³⁸ und „*The Cancer Genome Atlas*“ (2006)³⁹ mit dem Ziel gegründet, Veränderungen des menschlichen Genoms, die ausschlaggebend für die Entstehung verschiedener Arten von Krebs sind, in groß angelegten Studien zu identifizieren und zu katalogisieren. Darüber hinaus wurde 2007 die Initiative „*The International Cancer Genome Consortium*“ beschlossen, die die bisherigen Projekte zur Entschlüsselung des Krebsgenoms vereint bzw. koordiniert.⁴⁰ Dadurch soll eine Standardisierung der weltweiten Krebsforschungsprojekte, eine effiziente Bereitstellung der Daten, sowie eine bessere Kommunikation der Mitglieder des Konsortiums gewährleistet werden. Zusammengenommen sollen diese Maßnahmen die Effizienz der weltweiten Krebsforschung steigern.⁴⁰

1.5 Kinaseinhibitoren in der zielgerichteten Therapie

In der zielgerichteten Tumorthherapie gelten Kinaseinhibitoren als eine besonders aussichtsreiche Wirkstoffklasse, da Kinasen in die Steuerung nahezu aller zellulärer Signalwege eingebunden sind. Ihre Fehlregulation kann einen signifikanten Einfluss auf die Dynamik der komplexen zellulären Netzwerke haben und letztlich zu deren Dysregulation sowie zur Entstehung verschiedenster Erkrankungen wie z. B. Krebs führen.⁴¹ Dabei haben neben kleinen organischen Molekülen wie Imatinib (Gleevec[®]), Sorafenib (Nexavar[®]) oder Lapatinib (Tykerb[®]) auch einige monoklonale Antikörper wie z. B. Trastuzumab (Herceptin[®]) und Cetuximab (Erbix[®]) bereits die Marktzulassung erreicht (Abb. 1.4).²⁵ Trotz der bisherigen klinischen Erfolge von Kinaseinhibitoren in der zielgerichteten Tumorthherapie, bleiben weiterhin die Selektivität, eine eingeschränkte Wirksamkeit sowie das Aufkommen von Wirkstoffresistenzen grundlegende Herausforderungen bei der Entwicklung von Kinaseinhibitoren für eine effektive Langzeitbehandlung.^{9,10,42}

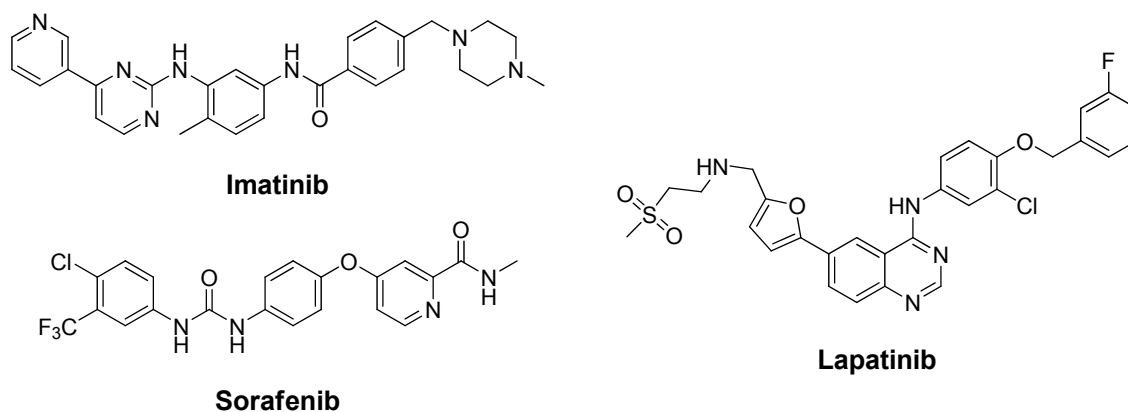


Abb. 1.4: Chemische Strukturen der Kinaseinhibitoren Imatinib (Gleevec[®]), Sorafenib (Nexavar[®]) und Lapatinib (Tykerb[®])

Wirkstoffresistenzen. Bei der Behandlung mit Kinaseinhibitoren treten immer häufiger Mutationen auf, die zu Wirkstoffresistenzen führen und den Erfolg der zielgerichteten Tumorthherapie einschränken.⁴³ Durch die Behandlung von Patienten mit reversiblen Inhibitoren wird auf die Tumorzellen ein Selektionsdruck ausgeübt, unter dem sich insbesondere Zellpopulationen mit entsprechenden Wirkstoffresistenzen durchsetzen können.⁴³ Die häufigsten Mutationen werden an der Position des Türsteherrestes in der Scharnierregion beobachtet, wobei Aminosäuren mit kleinen Seitenketten (überwiegend Thr) gegen größere, hydrophobe Reste (Ile oder Met) ausgetauscht werden.⁴³ Solche Mutationen wurden bereits eingehend untersucht (Bcr-Abl (T315I), c-KIT (T670I), PDGFR α (T674I) und EGFR (T790M); cSrc (T338M) wurde als Modellsystem für relevante wirkstoffresistente Kinasen studiert^{14,44}), wobei gezeigt wurde, dass sterisch anspruchsvolle Reste an dieser Position eine optimale Bindung von ATP-kompetitiven Inhibitoren verhindern und zudem die enzymatische Aktivität der Kinase sowie deren Affinität gegenüber ATP erhöhen.^{11,45,46} Prinzipiell können jedoch auch diese Resistenzen umgangen werden, wie der Inhibitor der Aurora Kinase VX-680 zeigt. Dieser Inhibitor behält auch gegen die wirkstoffresistente T315I Mutante der Bcr-Abl Kinase seine schwache Affinität bei, indem er an die Scharnierregion bindet, dabei jedoch dem Türsteherrest räumlich ausweicht.^{47,48} Zudem können solche Mutationen mit Inhibitoren umgangen werden, die außerhalb der ATP-Bindungstasche binden und enzymatisch inaktive Konformationen stabilisieren, wie am Beispiel des Bcr-Abl-Inhibitors GNF-2 (Abb. 1.3) erfolgreich gezeigt werden konnte.¹⁸

Selektivität von Kinaseinhibitoren. Eine Vielzahl der bekannten Kinaseinhibitoren ist in ihrer Wirkweise eher unselektiv und inhibiert in der Regel mehr als nur ein Zielprotein.⁴⁹ Diese Tatsache kann darauf zurückgeführt werden, dass Kinaseinhibitoren überwiegend ATP-kompetitiv sind und die hoch konservierte ATP-Bindungstasche adressieren, wo sie essentielle Wasserstoffbrückenbindungen mit der Scharnierregion der Kinasedomäne ausbilden. Verbindungen, die weniger konservierte Bereiche außerhalb der ATP-Bindungstasche belegen oder inaktive Kinasekonformationen stabilisieren, bieten daher neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Inhibitoren mit verbesserten Selektivitätsprofilen.⁵⁰ Die gezielte und spezifische Inhibition einer Kinase ist insbesondere für die akademische Forschung attraktiv. Hochselektive Inhibitoren dienen als Grundlage für chemische Sonden, die eingesetzt werden, um die Funktion einzelner Proteine in zellulären Signalwegen zu untersuchen. So konnten Taunton und Mitarbeiter Pyrrolopyrimidine entwickeln, die selektiv und kovalent die p90 ribosomalen Proteinkinasen RSK1 und RSK2 inhibieren (Abb. 1.3).²² Die Weiterentwicklung dieser Inhibitoren zu chemischen Sonden führte zur Aufklärung der Signalwege dieser Kinasen.⁵¹ Selbstverständlich sind selektive Inhibitoren, die üblicherweise mit weniger Nebenwirkungen einhergehen, auch für die pharmazeutische Industrie von großer Bedeutung. Im Hinblick auf die klinische Effektivität von Kinaseinhibitoren wird aktuell jedoch diskutiert, ob hochselektive Verbindungen Vorteile mit sich bringen, oder „*Multitarget*-Inhibitoren“ überlegen sind, die spezifisch mehrere Zielproteine ausschalten.^{20,52} Interessanterweise ergaben Untersuchungen von klinisch validierten Kinaseinhibitoren weitaus weniger spezifische Wirkprofile als zunächst angenommen.⁴⁷ Verschiedene Resistenzmechanismen, die nicht von einer Mutation des ursprünglichen Zielproteins ausgehen, sondern vielmehr auf der Aktivierung von z. B. redundanten Kinasen sowie der Inaktivierung von Phosphatasen beruhen, um die verbleibende Aktivität der inhibierten Zielkinase zu verstärken, sind eindeutige Anhaltspunkte, die für eine Kombinationstherapie mit mehreren selektiven Inhibitoren oder eine Therapie mit einem „*Multitarget*-Inhibitor“ sprechen.^{52,53} Eine zentrale Herausforderung für beide Ansätze stellt dabei die gezielte Entwicklung von Kinaseinhibitoren mit spezifischen Wirkprofilen dar – ungeachtet dessen, ob eine Kinase oder aber eine bestimmte Gruppe von Kinasen selektiv ausgeschaltet werden

soll. Hierzu wird oftmals die vielversprechende Methode des rationalen oder auch strukturbasierten Wirkstoffdesigns (SBWD) angewendet.⁵³

Strukturbasiertes Wirkstoffdesign. Die Wirkstoffentwicklung beginnt in der Regel mit der Durchmusterung von Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren, in dem neue Moleküle identifiziert werden, die eine biologische Aktivität gegenüber einem bestimmten Zielprotein aufweisen. Nach der Validierung dieser Verbindungen werden die aussichtsreichsten Kandidaten in medizinalchemischen Optimierungsprogrammen weiterentwickelt. Liegen ausreichend strukturelle Informationen über das Zielprotein vor, werden für die Leitstrukturentwicklung strukturbasierte Ansätze verwendet. Das SBWD stützt sich in erster Linie auf strukturbasierte Untersuchungen eines Zielproteins, die zum gezielten Entwurf und zur Weiterentwicklung biologisch aktiver kleiner organischer Moleküle führen. Dabei ist die genaue Analyse von potentiellen Bindungsstellen grundlegend, um diese mit möglichst hoher Affinität adressieren zu können.⁵⁴ Das SBWD lässt sich bei der Wirkstoffentwicklung in der Kinaseforschung besonders gut anwenden, da über 130 Röntgenkristallstrukturen von menschlichen Kinasen bekannt sind.⁴⁹ Diese Strukturen können direkt verwendet werden, oder aber für die Berechnung von Homologiemodellen verwandter Zielkinasen dienen. Gerade diese Vielzahl von Röntgenkristallstrukturen kann entscheidende Informationen über die Beschaffenheit und Eigenschaften möglicher Bindungstaschen liefern, und so zum Design von selektiven Inhibitoren beitragen, die gezielt eine Kinase oder aber eine Gruppe von Kinasen inhibieren.⁴⁹ Eine weitere strukturbasierte Methode ist das fragmentbasierte Wirkstoffdesign. Molekülfragmente (niedermolekulare chemische Einheiten) werden durch NMR (*nuclear magnetic resonance*) oder Röntgenkristallographie identifiziert und ihre Interaktionen mit dem Protein optimiert. Letztlich werden die Fragmente zu einer neuen Verbindung zusammengesetzt. Idealerweise ergeben sich daraus potente Verbindungen, deren Affinität in der Regel weitaus höher ist, als die der einzelnen Fragmente.⁵⁵ Auch dieser Ansatz wurde in der Kinaseforschung erfolgreich angewendet und resultierte beispielsweise in der Synthese von Typ-II-Inhibitoren der p38 α Kinase.⁵⁶

Neben den strukturbasierten Studien, die in erster Linie der Weiterentwicklung von bioaktiven kleinen organischen Molekülen dienen, sind für den Erfolg der Wirkstoffentwicklung geeignete Assaymethoden unabdingbar, die im

Hochdurchsatzverfahren das Auffinden neuer biologisch aktiver Moleküle ermöglichen. So ist der zukünftige Erfolg in der Kinaseforschung auch von der Entwicklung und Etablierung neuer Assaysysteme abhängig, da bisher überwiegend aktivitätsbasierte Assays eingesetzt wurden, und so unfreiwillig bevorzugt ATP-kompetitive Inhibitoren identifiziert wurden. Aktuell sind insbesondere Methoden von großem Interesse, die es erlauben, Inhibitoren zu finden, die inaktive Kinasekonformationen stabilisieren und/oder die Kinaseaktivität allosterisch modulieren.

2 *N*-Aryl-*N'*-Pyrazolharnstoffe

2.1 Einleitung

Kinasen nehmen typischerweise eine aktive Konformation an – auch DFG-*in*-Konformation genannt. Diese Konformation ermöglicht die Bindung von ATP und Substratproteinen und wurde erstmals für die Protein Kinase A (PKA) beschrieben.⁸ Konformelle Veränderungen der Aktivierungsschleife resultieren bei einigen Kinasen in einem 180° Flip des hochkonservierten DFG-Motivs, der zu der sogenannten DFG-*out*-Konformation führt. Dabei bewegt sich das Phe des DFG-Motivs in Richtung der ATP-Bindungsstelle und macht eine hydrophobe allosterische Tasche zugänglich.^{50,57} Charakteristischerweise binden Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren an Kinasen in der DFG-*out*-Konformation und besetzen dabei auch die neu ausgebildete allosterische Tasche.⁵⁰ Die strukturelle Veränderung, die mit der Bindung dieser Liganden einhergeht, steigert die Verweilzeit der Liganden am Wirkort. Dies führt im Hinblick auf eine Therapie dazu, dass geringere Wirkstoffkonzentrationen nötig sind, um die gewünschte Wirkung der Therapeutika am Zielprotein zu erreichen, und resultiert letztlich in einem erweiterten therapeutischen Fenster.⁵⁸ Bisher bleibt jedoch die Frage unbeantwortet, welche Kinasen eine DFG-*out*-Konformation annehmen können, und ob diese grundsätzlich durch Liganden stabilisiert werden kann. Zusammengenommen machen die vorteilhaften pharmakokinetischen Wirkprofile von Typ-II- bzw. Typ-III-Inhibitoren, sowie die Suche nach Kinasen, die eine inaktive DFG-*out*-Konformation annehmen können, die Klasse der DFG-*out*-Binder zu besonders interessanten Wirkstoffen.

2.2 Zielsetzung

Neben dem Typ-II-Inhibitor BIRB-796, einem p38 α Inhibitor von Boehringer-Ingelheim,^{57,59} sind einige hoch affine *N*-Aryl-*N'*-Pyrazolharnstoffe als Typ-III-Inhibitoren von p38 α bekannt. Aufgrund ihrer detaillierten strukturbiologischen Charakterisierung bot diese Substanzklasse einen idealen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der Fragestellung, welche Kinasen eine DFG-*out*-Konformation

annehmen können. Daher sollte basierend auf dem *N*-Aryl-*N'*-Pyrazolharnstoff-Motiv eine fokussierte Substanzbibliothek aus neuartigen Verbindungen synthetisiert werden. Im Folgenden sollten diese Substanzen als Referenzverbindungen für die Entwicklung und Validierung neuer Assaysysteme zur Identifikation von neuartigen DFG-*out*-Bindern eingesetzt werden. Darüber hinaus sollten zusätzliche Informationen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Substanzklasse gewonnen werden.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Strukturbasiertes Design einer fokussierten Substanzbibliothek

Um eine Substanzbibliothek aus pyrazolharnstoffbasierten Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren zu entwerfen, wurden die Prinzipien des strukturbasierten Wirkstoffdesigns angewendet. Dazu wurden die literaturbekannten Komplexstrukturen von BIRB-796 und **2.14** im Komplex mit p38 α analysiert (Abb. 2.1).⁵⁷

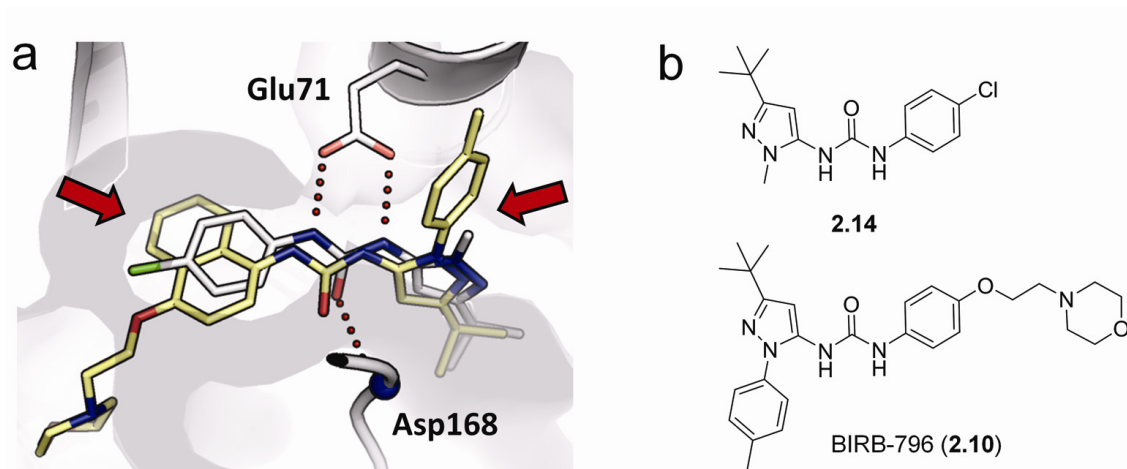


Abb. 2.1: (a) Überlagerung von BIRB-796 (gelb) und **2.14** (grau) im Komplex mit p38 α (PDB-Codes: 1KV2 und 1KV1)⁵⁷. Die essentiellen Wasserstoffbrücken dieser Substanzklasse sind zwischen dem Liganden **2.14** (grau) und p38 α (grau) durch rot gepunktete Linien gekennzeichnet. Die roten Pfeile markieren die Positionen, die für eine weitere Derivatisierung ausgewählt wurden. (b) Chemische Strukturen der Verbindungen **2.14** und BIRB-796.

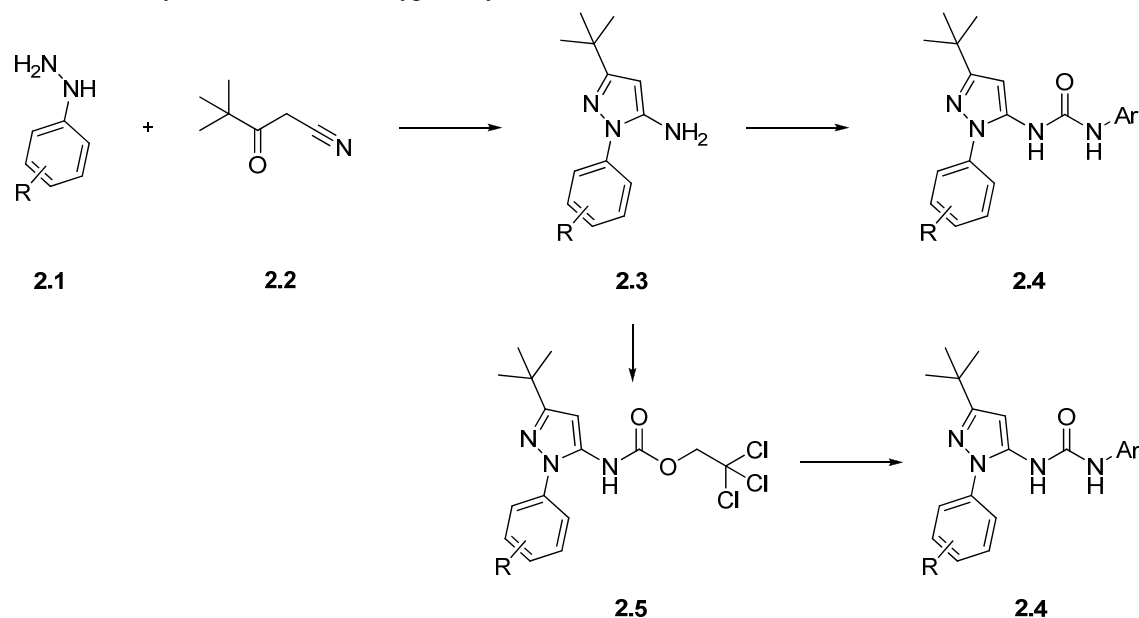
Basierend auf diesen Strukturen wurden zwei Positionen für die weitere Derivatisierung des Typ-III-Inhibitors **2.14** identifiziert. Zum einen sollten verschieden substituierte Phenyle die Methylgruppe am Pyrazolring ersetzen, um die allosterische Tasche effektiver auszufüllen. Dazu sollten zunächst *ortho*-, *meta*- sowie *para*-Tolyl Substituenten eingeführt werden, wobei BIRB-796 als Strukturbeispiel diene (Abb.

2.1). Als negative Referenz sollte **2.4e** dienen. Diese Verbindung, ebenfalls ein *N*-Aryl-*N'*-Pyrazol-Harnstoff, sollte an dem Pyrazolphenylring mit zwei Chloratomen und einer Trifluormethylgruppe sterisch sehr anspruchsvolle Substituenten tragen, die eine Bindung in der allosterischen Tasche verhindern sollten. Des Weiteren sollten Größe und Charakter der *N*-Arylsubstituenten variiert werden. Dabei wurde die Größe des hydrophoben Substituenten von *p*-Chlorophenyl zu Naphthyl gesteigert. Zudem sollten auch Aniline in diese Position gebracht werden, um den Einfluss polarer Gruppen auf die Bindungsaffinität studieren zu können. Weiterhin sollte neben BIRB-796 auch das Phenyl-Analogon **2.11** synthetisiert werden, um die unterschiedliche Bindungsaffinität beider Liganden durch strukturbiochemische Studien verstehen zu können.

2.3.2 Syntheseroute

Die Synthese der Verbindungen stützt sich in erster Linie auf literaturbekannte Verfahren.^{59,60} So sollen die Typ-III-Inhibitoren überwiegend in Additionsreaktionen aus Pyrazolaminen und Isocyanaten aufgebaut werden.

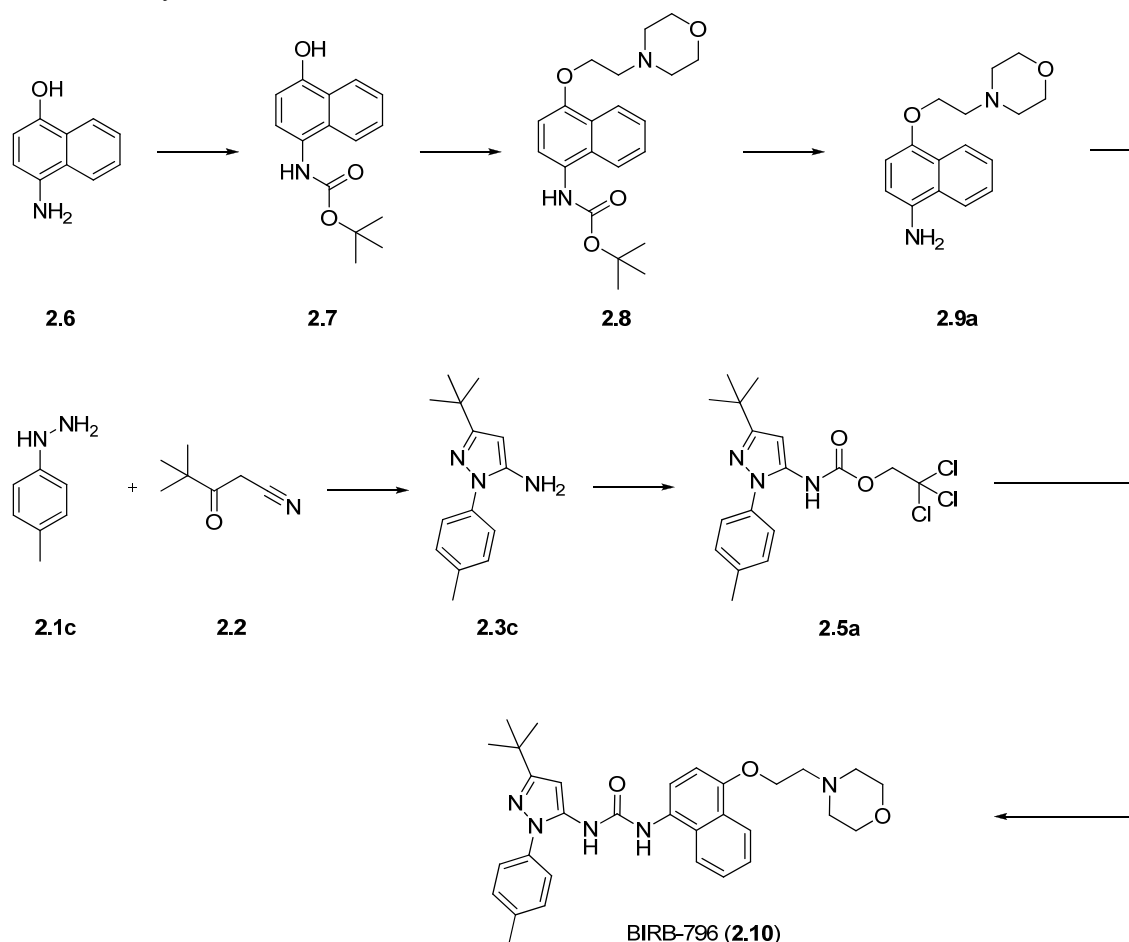
Schema 2.1: Syntheseroute für die Typ-III-Pyrazolharnstoffe.



Die benötigten Pyrazolamine werden in Kondensationsreaktionen aus Hydrazinen und Pivaloylacetonitril dargestellt. Alternativ wird das Harnstoff-Pharmakophor aus der Reaktion Troc-geschützter Pyrazolamine mit primären Aminen erhalten.

BIRB-796 sowie sein Phenyl-Analogon **2.11** werden basierend auf der vorgeschlagenen konvergenten Synthese von Regan *et al.* dargestellt.⁵⁹ Allerdings wird für die Harnstoffbildung nicht die Substitution an Phosgen mit den Aminen **2.3c** sowie **2.9a** bzw. **b** durchgeführt, sondern ein alternativer Weg verfolgt, der von Bagely *et al.* gezeigt wurde und mit höheren Ausbeuten einhergeht.⁶⁰ Dieser sieht die bereits erwähnte Harnstoffbildung durch die Substitution Troc-geschützter Pyrazolamine mit primären Aminen vor. Ausgehend von dem Aminopyrazol **2.3c** wird die Troc-Schutzgruppe am Amin eingeführt und liefert das Carbamat **2.5a**, in dem bereits die zur Bildung des Harnstoffs notwendige Carbonylfunktion vorliegt.

Schema 2.2: Syntheseroute BIRB-796.



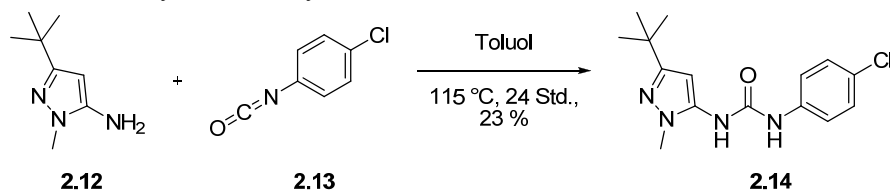
Die finale Harnstoffbildung wird durch den nukleophilen Angriff eines primären Amins auf den Carbonylkohlenstoff des Carbamats vervollständigt, wobei die Trichloroethoxy-Gruppe als Abgangsgruppe dient.

Das Aminonukleophil wird ausgehend von 4-Amino-1-naphthol **2.6** aufgebaut. Zunächst wird das Amin mit der *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe geschützt, was die selektive Reaktion der Naphthylhydroxygruppe mit 2-Chloroethylmorpholin ermöglicht. Die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird daraufhin wieder entfernt und liefert das Amin **2.9a**. Der finale Kupplungsschritt zur Synthese von BIRB-796 (**2.10**) ist also eine S_N2-Reaktion der Synthone **2.5a** und **2.9a**. Das Phenylderivat **2.11** (Tabelle 2.3) wird analog zu dieser Synthese hergestellt, wobei das Aminonukleophil **2.9b** aus 4-Aminophenol aufgebaut wird.

2.3.3 Synthese der N-Aryl-N'-Pyrazolharnstoffe

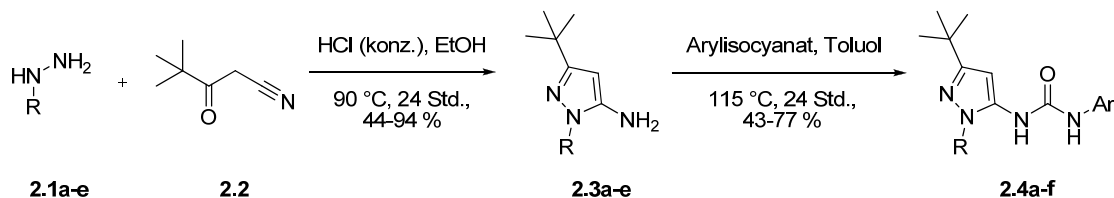
Als erste Referenzverbindung wurde **2.14** aus dem Aminopyrazol **2.12** und 4-Chlorphenylisocyanat **2.13** mit einer Ausbeute von 23 % dargestellt (Schema 2.3).

Schema 2.3: Synthese des Pyrazolharnstoffs **2.14**.



Um die weiteren Derivate für die fokussierte Substanzbibliothek aufzubauen, wurden zunächst die aromatisch substituierten Aminopyrazole durch eine *Pinner*-artige Reaktion von unterschiedlich substituierten Phenylhydrazinen oder Phenylhydrazinhydrochloriden mit dem durch HCl aktivierten Pivaloylacetonitril synthetisiert, wobei überwiegend sehr gute Ausbeuten erreicht wurden (Schema 2.4).

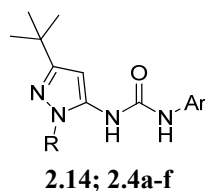
Schema 2.4: Synthese der Pyrazolharnstoffe.



R: a = *o*-Tolyl
 b = *m*-Tolyl
 c = *p*-Tolyl
 d = 3-Chloro-4-methylbenzyl
 e = 2,2-Dichloro-4-trifluoromethylbenzyl

Im darauf folgenden Schritt wurden in Additionsreaktionen die Aminopyrazole **2.3a-e** mit 4-Chloroisocyanat **2.13** bzw. Naphthylisocyanat umgesetzt, wodurch die Harnstoffeinheit aufgebaut wurde, und die Verbindungen **2.4a-f** in guten Ausbeuten isoliert wurden (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Pyrazolharnstoffe.

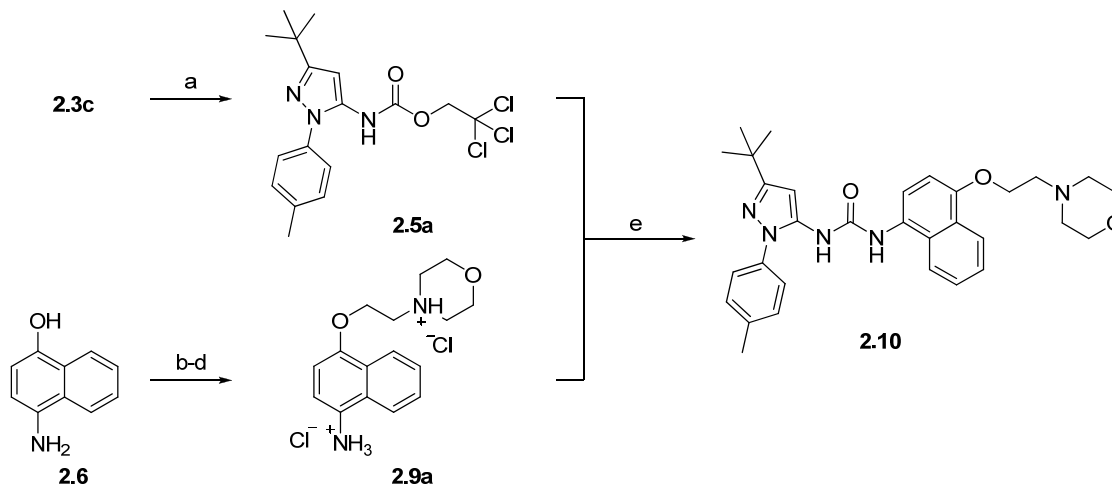


Verbindung	Pyrazol	R	Ar	Ausbeute [%]
2.14	2.12	Methyl	4-Chlorophenyl	23
2.4a	2.3a	<i>o</i> -Tolyl	4-Chlorophenyl	65
2.4b	2.3b	<i>m</i> -Tolyl	4-Chlorophenyl	63
2.4c	2.3c	<i>p</i> -Tolyl	4-Chlorophenyl	69
2.4d	2.3d	3-Cl- <i>p</i> -Tolyl	4-Chlorophenyl	43
2.4e	2.3e	2,2-Dichloro-4-trifluoromethylbenzyl	4-Chlorophenyl	77
2.4f	2.3c	<i>p</i> -Tolyl	Naphthyl	66

BIRB-796 und sein Phenyl-Analogon **2.11** wurden über konvergente Syntheserouten aufgebaut (Schema 2.2). Das Aminopyrazol **2.3c** wurde mit Troc-Cl zu dem Carbamat **2.5a** umgesetzt und mit einer Ausbeute von 78 % isoliert (Schema 2.5). Das Aminonukleophil wurde ausgehend von 4-Amino-1-naphthol **2.6** generiert. Zunächst wurde das Amin in moderater Ausbeute mit der *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe geschützt, was die selektive Reaktion der Naphthylhydroxygruppe unter basischen Bedingungen (K_2CO_3) mit 2-Chloroethylmorpholin ermöglichte. Die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde daraufhin unter sauren Bedingungen mit HCl (4 M in Dioxan) wieder entfernt und ergab das Amin **2.9a** in guten Ausbeuten. In einer S_N2 -Reaktion, dem finalen Kupplungsschritt, wurden die Synthone **2.5a** und **2.9a** zu BIRB-796 (**2.10**) in 44 %-iger Ausbeute verknüpft (Schema 2.5). Das Phenylderivat 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-morpholinoethoxy)-phenyl)harnstoff (**2.11**) wurde analog zu dieser Synthese hergestellt, wobei das Aminonukleophil

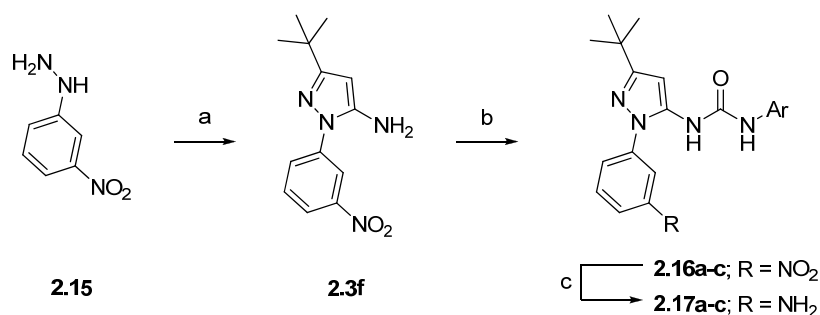
beginnend mit 4-Aminophenol aufgebaut wurde. **2.11** wurde in 59 %-iger Ausbeute isoliert.

Schema 2.5: Synthese von BIRB-796 (**2.10**).^a



^aReagenzien und Bedingungen: (a) TrocCl, H₂O, EtOAc, NaOH, 0 °C bis RT, 3 Std., 87 %; (b) Boc₂O, TEA, MeOH, RT, über Nacht; (c) KOH, 4-(2-Chloroethyl)morpholin Hydrochlorid, K₂CO₃, MeCN, 80 °C, 3 Std.; (d) HCl (4 M in Dioxan), Dioxan, RT, 16 Std., 46 % (3 Schritte); (e) DIPEA, DMSO, 60 °C, 5 Std., 44 %.

Die Darstellung der *N*-Pyrazol-*N'*-Aryl-Harnstoffe **2.16a-c** und **2.17a-c** erfolgte ausgehend von dem Aminopyrazol **2.3f**, das wie beschrieben aus dem *m*-Nitrophenylhydrazin und **2.2** in 57 %-iger Ausbeute erhalten wurde. Die Harnstoffe **2.16a-c** waren durch die Reaktion des Aminopyrazols **2.3f** mit 4-Chlorophenylisocyanat bzw. Naphthylisocyanat zugänglich. Die anschließende Reduktion mit Pd/C und Ammoniumformiat oder Raney-Nickel und Ammoniumchlorid lieferte **2.17a-c** in guten Ausbeuten (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Synthese der Nitro- und Aminopyrazolharnstoffe.^a

^aReagenzien und Bedingungen: (a) Pivaloylacetonitril, konz. HCl, EtOH, Rückfl., 24 Std. 57 %; (b) Arylisocyanat, DCM, RT; (c) Raney-Nickel, NH₄Cl, DMF, 45 °C oder Pd/C, NH₄CHO₂, EtOH, 90 °C.

Verbindung	R	Ar	Ausbeute [%]
2.16a	NO ₂	Phenyl	55
2.16b	NO ₂	4-Chlorophenyl	73
2.16c	NO ₂	Naphthyl	69
2.17a	NH ₂	Phenyl	71
2.17b	NH ₂	4-Chlorophenyl	62
2.17c	NH ₂	Naphthyl	44

2.3.4 Strukturbiologische Validierung

Die Synthese der fokussierten Substanzbibliothek der Pyrazolharnstoffe lieferte den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der DFG-*out*-Konformation verschiedener Kinasen. Da p38 α strukturbiologisch sehr detailliert charakterisiert wurde,^{57,61} sollte im Rahmen dieser Arbeit auf p38 α als Kristallisationssystem zurückgegriffen werden, um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen besser verstehen zu können, und um genauere Einblicke in die Bindungseigenschaften der synthetisierten Inhibitoren zu erlangen. So wurde im weiteren Verlauf p38 α exprimiert, aufgereinigt und anschließend für Kristallisationsexperimente verwendet. Eine detaillierte Beschreibung für Expression, Aufreinigung und Kristallisation ist im Experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden (siehe Abschnitte 9.2.2 und 9.2.3).

2.4 Diskussion

Basierend auf der Klasse der Pyrazolharnstoffe wurde eine fokussierte Substanzbibliothek entworfen und synthetisiert. Bestandteile der Substanzbibliothek waren neuartige Pyrazolharnstoffe sowie strukturbiologisch bereits detailliert

charakterisierte Verbindungen wie z. B. BIRB-796. Diese Inhibitoren dienten als Referenzverbindungen und waren für die Entwicklung und Validierung des p38 α -FLiK-Assay-Systems (Fluoreszente Label in Kinasen) entscheidend.⁶² Dieses System wurde im weiteren Verlauf verwendet, um die neuartigen Verbindungen auf ihre Bindungskonstanten hin zu charakterisieren. Zusammen mit strukturbiologischen Experimenten dienten die Bindungsaffinitäten des Weiteren zur Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Pyrazolharnstoffe.

2.4.1 p38 α -FLiK-Assay

Um eine sensitive und verlässliche Identifikation von kleinen organischen Molekülen zu ermöglichen, die allosterische Bindungsstellen belegen und/oder inaktive Konformationen von Kinasen (z. B. DFG-*out*) stabilisieren, wurde die FLiK-Technologie entwickelt. Zur Validierung dieses Systems, das Konformationsänderungen der Zielkinase durch Fluoreszenz sichtbar macht, wurde zunächst die Serin/Threonin-Kinase p38 α als Modellsystem verwendet. Mit Hilfe der gerichteten Punktmutagenese wurde in das N-terminale Ende der Aktivierungsschleife ein Cystein eingeführt, welches mit dem thiolreaktiven Fluorophor Acrylodan markiert wurde. Konformationsänderungen, wie sie bei dem Übergang von der DFG-*in*- zur DFG-*out*-Konformation beobachtet werden, verändern die chemische Umgebung des Fluorophors und somit dessen Emissionseigenschaften (Abb. 2.2). Wird die Veränderung der Emission gemessen, so können die Ergebnisse Aufschluss über die Konformation der Kinase, den Bindungsmodus eines Liganden sowie über dessen kinetische Parameter wie K_D , K_{on} und K_{off} geben, welche die Bindung eines Liganden beschreiben.^{62-64*}

* Die FLiK-Technologie wurde in der AG Rauh von Dr. Jeffrey R. Simard entwickelt.

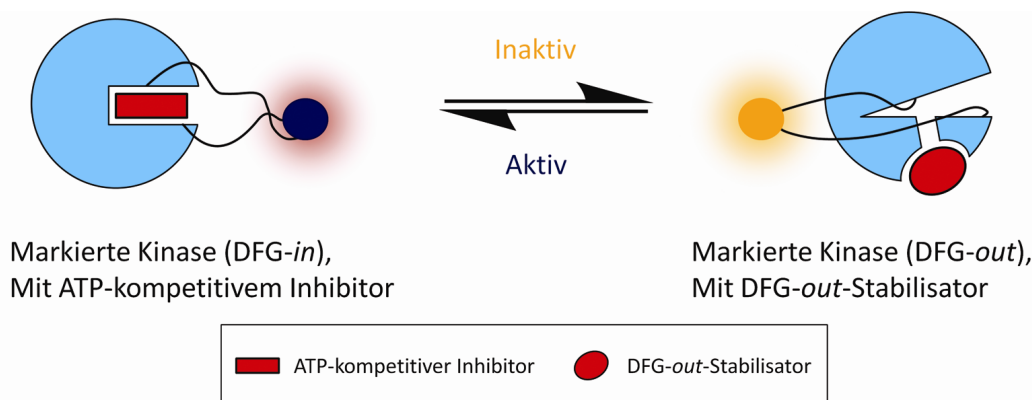


Abb. 2.2: Die FLiK-Technologie verwendet Kinasen, bei denen z. B. die Aktivierungsschleife oder andere flexible Strukturelemente mit einem Fluorophor markiert werden. Änderungen der Konformation bringen den Fluorophor in eine andere chemische Umgebung und ändern so dessen Emissionseigenschaften. Dies kann u.a. zur Bestimmung der Bindungskonstanten ausgenutzt werden.^{6,62-64}

2.4.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Pyrazolharnstoffe

Pyrazolharnstoffe repräsentieren eine gut charakterisierte Klasse von Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren und führten zu der Entwicklung des einstigen klinischen Kandidaten BIRB-796.⁵⁹ Einige der synthetisierten Verbindungen dienten als Referenzverbindungen für die Validierung des neuartigen FLiK-Bindungsassays.⁶² So konnte für den Inhibitor BIRB-796 erwartungsgemäß ein zeitabhängiger K_D -Wert reproduziert werden.^{57,62*}

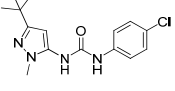
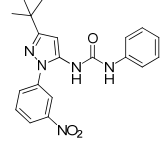
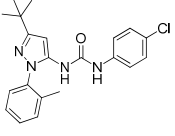
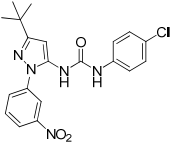
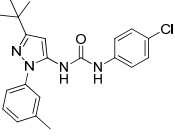
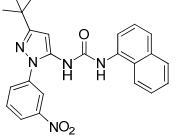
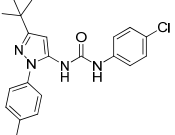
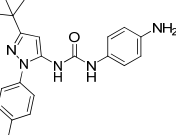
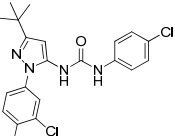
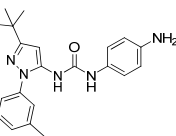
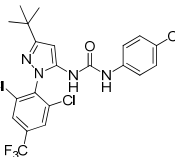
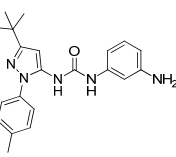
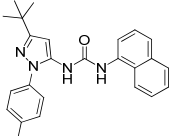
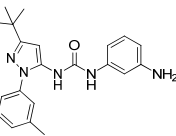
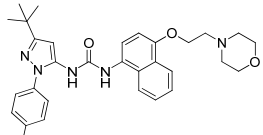
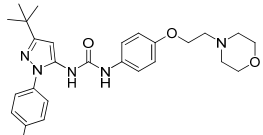
Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden mit Hilfe des p38 α -FLiK-Assays die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der synthetisierten Pyrazolharnstoffe untersucht. Mit zunehmender Größe des *N*-Arylsubstituenten steigt die Bindungsaffinität der Verbindungen von **2.16a** (Phenyl) über **2.16b** (4-Chlorophenyl) zu **2.16c** (Naphthyl) (Tabelle 2.3).^{57,59,65-67} Die Aryleinheit bindet in der hydrophoben Tasche hinter dem Türsteherrest von p38 α . Der Naphthylrest füllt diesen Bereich im Vergleich zu dem Phenyl- bzw. 4-Chlorophenylrest besonders effektiv aus. Daher führt die Bindung des Naphthylrestes im Vergleich zu den sterisch weniger anspruchsvollen Phenyleinheiten zur Verdrängung mehrerer Wassermoleküle und damit zu einem Gewinn an Solvatationsentropie.⁶⁸ Ein Phenylring trägt somit weniger zu der Affinität bei als die sterisch anspruchsvolleren Chlorophenyl- bzw. Naphthyleinheiten, was sich in den höheren Bindungsaffinitäten von **2.16b** und **c** im Vergleich zu **2.16a** widerspiegelt

* Die Messungen wurden von Dr. Jeffrey R. Simard durchgeführt.

(Tabelle 2.3). Dieser Trend wird auch aus dem Vergleich von BIRB-796 mit seinem Phenylderivat **2.11** ersichtlich, wo der Austausch des Naphthylringes durch einen Phenylring einen 50-fach höheren K_D -Wert mit sich bringt. Vergleichbare Werte wurden auch mit alternativen Ansätzen ermittelt.^{59,69} Aufgrund des hydrophoben Charakters dieser Bindungsstelle führen polare Gruppen, wie die Phenylamine (**2.3a** und **b**), zu einem deutlichen Affinitätsverlust (Tabelle 2.3).

Die Einführung eines monosubstituierten Phenylrings an das N1 Atom der Pyrazoleinheit von **2.14** erweitert den Liganden in Richtung der allosterischen Tasche und resultiert in einem signifikanten Anstieg der Bindungsaffinität. Dabei werden insbesondere Substituenten in *para*- und *meta*-Stellung bevorzugt.⁵⁹ Um den Einfluss der Substituenten des Pyrazolphenylringes auf die Bindungsaffinitäten weiter zu untersuchen, wurde der Ligand **2.4e** entwickelt. Er ging aus Modellierungsstudien hervor, die auf der Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit BIRB-796 beruhten. Die Kombination der 4-Trifluoromethyl- und 2,6-Dichlorosubstituenten am Pyrazolphenylring verhinderte die Bindung des Liganden in der allosterischen Tasche, wie durch Messungen mit dem FLiK-System bestätigt werden konnte (Tabelle 2.3).⁶²

Tabelle 2.3: K_D -Werte für die Pyrazolharnstoffe der fokussierten Substanzbibliothek.*

Verbindung	K_D [nM] p38 α	Verbindung	K_D [nM] p38 α
2.14 	1190 \pm 142	2.16a 	168 \pm 15
2.4a 	347 \pm 29	2.16b 	55.3 \pm 5.5
2.4b 	15.1 \pm 3.2	2.16c 	9.4 \pm 2.0
2.4c 	34.2 \pm 5.2	2.19b 	2273 \pm 518
2.4d 	17.9 \pm 3.4	3.3a 	1163 \pm 519
2.4e 	k. B.	2.19a 	286 \pm 34
2.4f 	11.1 \pm 2.0	3.3b 	349 \pm 104
2.10 	7.5 \pm 2.3	2.11 	419 \pm 95

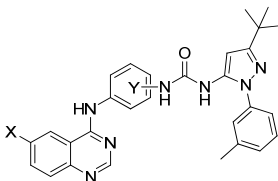
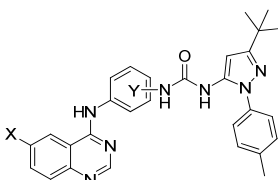
2.4.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Typ-II-Hybridinhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Typ-II-Hybrid-Inhibitoren entwickelt (siehe Kapitel 3).⁷⁰ Zunächst wurden Typ-III-Pyrazolharnstoffe als schwache

* Die K_D -Werte wurden von Dr. Jeffrey R. Simard bestimmt.

Inhibitoren der cSrc Kinase mit mikromolaren IC_{50} -Werten identifiziert. In Anlehnung an die Entwicklung von BIRB-796 aus dem Pyrazolharnstoff **2.14**,⁵⁹ führte die Kupplung der Pyrazolharnstoffe mit einem Chinazolin, das ebenfalls die Kinaseaktivität von cSrc mit mikromolaren IC_{50} -Werten inhibiert,¹⁴ zu potenten nanomolaren Typ-II-Inhibitoren. Biochemische Studien ergaben, dass diese Verbindungsklasse sowohl an cSrc als auch an p38 α bindet. Jedoch folgen die Bindungsaffinitäten in p38 α im Vergleich zu cSrc unterschiedlichen Trends (Tabelle 2.4), die mit Hilfe strukturbioologischer Untersuchungen erklärt werden können. Die SWB im Bezug auf p38 α werden in diesem Kapitel diskutiert, wobei genauere Studien zu den Hybridinhibitoren (insbesondere im Hinblick auf cSrc) in Kapitel 3 gezeigt werden.

Tabelle 2.4: Bindungsaffinitäten (K_D -Werte) für 1,3- und 1,4-verknüpfte Hybrid-Inhibitoren für p38 α .*

Verbindung	X	Y	K_D [nM] p38 α	Strukturen
3.7a	NO ₂	<i>para</i>	289 ± 26	 <p style="text-align: center;">3.7a-f</p>
3.7c	NH ₂	<i>para</i>	342 ± 39	
3.7e	-NHCOCH ₂ CH ₃	<i>para</i>	245 ± 55	
3.7b	NO ₂	<i>meta</i>	50 ± 16	
3.7d	NH ₂	<i>meta</i>	127 ± 26	
3.7f	-	<i>para</i>	218 ± 27	
2.18a	NO ₂	<i>para</i>	94 ± 17	 <p style="text-align: center;">2.18a-d</p>
2.18b	NH ₂	<i>para</i>	142 ± 20	
2.18c	NO ₂	<i>meta</i>	141 ± 8	
2.18d	NH ₂	<i>meta</i>	165 ± 58	

Während eine höhere Affinität der 1,4-verknüpften Hybride (**3.7a, c, e**) für cSrc festgestellt wurde, konnte in Modellierungsstudien gezeigt werden, dass die 1,3-verknüpften Inhibitoren (**3.7b, d**) mit höherer Affinität an p38 α binden würden (Kapitel 3). Messungen mit dem p38 α -FLiK-Assay bestätigten diese Hypothese und lieferten 6-fach höhere Affinitäten für die 1,3-verknüpften Verbindungen im Vergleich zu den 1,4-verknüpften Analoga (Tabelle 2.4). Um die Präferenz von p38 α für die 1,3-verknüpften Hybride besser zu verstehen, wurden die Kristallstrukturen von **3.7c** und **d**

* Die Messung der K_D -Werte wurde von Dr. Jeffrey R. Simard durchgeführt.

sowie **2.18d** im Komplex mit der Wildtyp Kinase gelöst.⁶² Die Verbindungen stabilisieren die DFG-*out*-Konformation und binden in einem für Typ-II-Inhibitoren typischen Bindungsmodus. Das N1 Stickstoffatom bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zu dem Rückgrat von Met109 (Scharnierregion), eine Interaktion, die üblicherweise zwischen Anilinochinazolinen und der Scharnierregion verschiedener Proteinkinasen ausgebildet wird.^{14,71}

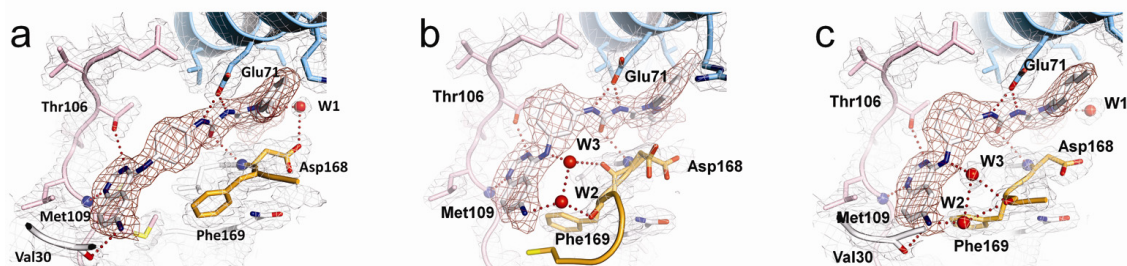


Abb. 2.3: Kristallstrukturen der Typ-II-Kinaseinhibitoren **3.7c**, **d** und **2.18d** im Komplex mit p38 α . Die experimentellen Elektronendichten (Ligand rot; Protein grau) des 1,4-verknüpften Chinazolin-Pyrazolharnstoff-Inhibitors **3.7c** (PDB-Code: 3GQC) (a) und der 1,3-verknüpften Hybridinhibitoren **3.7d** (PDB-Code: 3GUC) (b) und **2.18d** (PDB-Code: 3GCV) (c) sind mit Auflösungen von 2.0 Å, 2.3 Å und 2.1 Å gezeigt. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichteverteilung ist bei 1σ konturiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen der Inhibitoren mit der Helix C (blau), dem DFG-Motiv (orange) und der Scharnierregion (pink) sind durch rote gepunktete Linien gekennzeichnet. Die Kinasedomäne ist in der inaktiven Konformation und die Pyrazolharnstoffeinheit belegt die allosterische Tasche, die durch die Helix C und das DFG-Motiv eingegrenzt wird.

Des Weiteren werden Wasserstoffbrücken zwischen der Harnstoffeinheit und dem Peptidrückgrat von Asp168 sowie der Seitenkette von Glu71 in allen Komplexen ausgebildet. Die Kristallstrukturen von **3.7d** und **2.18d** im Komplex mit p38 α verdeutlichen jedoch weitere stabilisierende Wechselwirkungen, die möglicherweise die Präferenz für die 1,3-verknüpften Inhibitoren **3.7d** und **2.18d** in p38 α erklären. Das Phe169 des DFG-Motivs bewegt sich ~ 4 Å in Richtung der Ebene des Chinazolinkerns. Dies führt zu einer günstigen „*edge-to-face*“-Orientierung beider Aromaten. Zudem wird ein Netzwerk aus wasservermittelten Wasserstoffbrücken zwischen den Inhibitoren und dem DFG-Motiv gebildet, welches in dem **3.7c**-p38 α -Komplex nicht beobachtet werden kann. Diese zusätzliche Stabilisierung der DFG-*out*-Konformation könnte die höhere Affinität der 1,3-verknüpften Hybride für p38 α erklären. Interessanterweise befindet sich in allen Komplexen das N3 Atom des Chinazolins in ausreichender Nähe für eine Wasserstoffbrücke zu der Seitenkette des Türsteherrestes Thr106. Um diese mögliche Wechselwirkung näher zu untersuchen, wurde die Affinität

des analogen 1,4-verknüpften Chinolin-Hybrids gemessen. Im Vergleich zu dem direkten Chinazolin-Analogen wurde allerdings kein signifikanter Unterschied der Bindungsaffinitäten festgestellt, so dass diese Interaktion nicht essentiell für die Bindung dieser Substanzklasse zu sein scheint.⁶²

Im Gegensatz zu der Tyrosinkinase cSrc sind die 1,4-*para*-Hybride grundsätzlich schlechtere Inhibitoren für p38 α als die entsprechenden Typ-III-Inhibitoren. Möglicherweise lässt die höhere Flexibilität der Helix C in Tyrosinkinasen wie z. B. cSrc⁷² den relativ großen Hybrid-Molekülen mehr Freiheit, die Bindungsstelle zu „erstasten“ und sich ihr anzupassen. Zudem wird durch die Flexibilität der Helix C die allosterische Tasche in beträchtlichem Maße eingegrenzt, wodurch die deutlich geringere Affinität von Typ-III-Inhibitoren in cSrc verglichen mit p38 α erklärt werden könnte. In p38 α hingegen ist die Helix C relativ unflexibel und führt zu einer stabileren allosterischen Tasche, so dass die Bindung von Typ-III-Pyrazolharnstoffen an p38 α thermodynamisch weitaus vorteilhafter ist. Diese These wird durch die Dissoziationsraten für die Typ-II-Inhibitoren **3.7c** und **d** sowie dem eng verwandten Typ-III-Inhibitor **2.4b** untermauert.⁶² Die Bindungsaffinitäten sinken in der Reihenfolge **2.4b** > **3.7d** > **3.7c**. Das Netzwerk aus wasservermittelten Wasserstoffbrücken und die aromatischen Interaktionen des Phe169 mit dem Chinazolin von **3.7d** stabilisieren den Typ-II-Bindungsmodus und führen zu einer langsameren Dissoziationsrate und gleichzeitig einer höheren Affinität im Vergleich zu **3.7c**.⁶² Verbindung **2.11** beinhaltet ebenfalls einen 1,4-substituierten zentralen Phenylring und dissoziiert von p38 α mit ähnlicher Geschwindigkeit. Im Gegensatz zu cSrc, wo DFG-*out*-Binder schneller dissoziieren,⁷⁰ besitzen Typ-III-Liganden wie z. B. **2.4b** längere Verweilzeiten in p38 α , woraus ihre höheren Affinitäten im Vergleich zu **3.7c**, **d** und **2.11** resultieren. Zudem besitzt **2.4b** eine *p*-Chlorophenyleinheit, die den hydrophoben Bereich hinter dem Türsteherrest von p38 α effektiver ausfüllt und möglicherweise die Dissoziation des Liganden verlangsamt. An gleicher Stelle trägt BIRB-796 eine Naphthyleinheit, die ebenfalls zur langsameren Dissoziation im Vergleich zu dem Phenyl-Analogen **2.11** führt, und BIRB-796 zu einem der potentesten p38 α -Inhibitoren macht.⁶²

2.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine fokussierte Substanzbibliothek aus Pyrazolharnstoffen für die Inhibition von p38 α geplant und synthetisiert werden. Diese strukturbioologisch detailliert charakterisierte Substanzklasse bot einen exzellenten Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung der inaktiven DFG-*out*-Konformation von Kinasen. So waren die hergestellten Verbindungen essentiell für die Entwicklung bzw. die Validierung des p38 α -FLiK-Assays⁶² und boten zudem die Grundlage für die Synthese eines Sonden-Moleküls, das für die Entwicklung des p38 α -EFC-Assays verwendet wurde.⁶⁹ Beide Assay-Systeme ermöglichen die Identifikation und Charakterisierung von Liganden, die die DFG-*out*-Konformation stabilisieren. Des Weiteren konnten die Pyrazolharnstoffe als Stabilisatoren der DFG-*out*-Konformation von cSrc identifiziert werden, und dienten als Ausgangspunkt für die Entwicklung von potenten Typ-II-Inhibitoren (siehe Kapitel 3).⁷⁰

2.6 Publikationen/Patent

Teile dieser Ergebnisse wurden in den folgenden Publikationen und einem Patent veröffentlicht:

1. Simard J.R., Klüter S., Grütter C., Getlik M., Rabiller M., Rode H.B., Rauh D., "A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc", *Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5: 394-396.
2. Simard J.R., Getlik M., Grütter C., Pawar V., Rauh D., "Development of a fluorescent-tagged kinase assay system for the detection and characterization of allosteric kinase inhibitors", *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131: 13286-13296.
3. Klüter S., Grütter C., Naqvi T., Rabiller M., Simard J.R., Pawar V., Getlik M., Rauh D., "Displacement assay for the detection of stabilizers of inactive kinase conformations", *J. Med. Chem.*, 2010, 53: 357-367.
4. Simard J.R., Getlik M., Rauh D., "Fluorescently or spin-labeled kinases for rapid screening and identification of novel kinase inhibitor scaffolds." WO/2010/009886, 2010.

3 Design und Synthese von Typ-II-Hybridinhibitoren

3.1 Einleitung

Kinasen und ihre assoziierten Signalwege sind für die Regulation einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen verantwortlich. Eine Dysregulation von Kinasen kann einen signifikanten Effekt auf die Dynamik dieser komplexen Netzwerke haben und zur Entstehung verschiedenster Krankheiten wie z. B. Krebs führen.⁴¹ Basierend auf einem verbesserten Verständnis der Fehlsteuerung von Kinasen in der Tumorbologie, wurden kleine organische Moleküle für die zielgerichtete Tumorthherapie entwickelt. Obwohl bereits einige Kinaseinhibitoren die Marktzulassung erlangt haben und sich weitere in der klinischen Erprobung befinden, bleiben die Selektivität, eine eingeschränkte Wirksamkeit sowie das Aufkommen von Wirkstoffresistenzen weiterhin grundlegende Herausforderungen bei der Entwicklung von Kinaseinhibitoren.^{10,25,42} Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Mehrzahl der Kinaseinhibitoren ATP-kompetitiv ist (Typ-I-Inhibitoren) und die hoch konservierte ATP-Bindungstasche belegt, wie z. B. Staurosporin und der dual-spezifische Src/Abl Inhibitor Dasatinib. Verbindungen, die weniger konservierte Bereiche außerhalb der ATP-Bindungstasche adressieren (z. B. Typ-II- oder Typ-III-Inhibitoren) oder inaktive Kinasekonformationen stabilisieren, bieten neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Inhibitoren mit verbesserten Selektivitätsprofilen.⁵⁰

3.2 Zielsetzung

Einige Pyrazolharnstoffe konnten als Typ-III-Inhibitoren der Tyrosinkinase cSrc identifiziert werden.⁶⁴ Strukturbiologische Untersuchungen bestätigten die Bindung dieser Liganden in der allosterischen Tasche von cSrc, wo sie einen vergleichbaren Bindungsmodus wie in der p38 α Kinase annehmen und die inaktive DFG-*out*-Konformation stabilisieren. Durch Aktivitätsmessungen konnte gezeigt werden, dass diese Substanzklasse ihre Aktivität gegenüber der wirkstoffresistenten Türstehermutante T338M in cSrc beibehält, wenn kleinere Aryl-Substituenten an dem

Harnstoffpharmakophor eingesetzt werden, und so eine ausreichende Distanz zwischen Ligand und Türsteherrest gewährleistet wird.⁶⁴ Die Mutation des Türsteherrestes beeinflusst maßgeblich die Affinität von Typ-I-Inhibitoren und führt in dem Fall von cSrc zu einer Wirkstoffresistenz gegenüber dem Inhibitor Dasatinib.⁷³ cSrc wird in verschiedenen Tumorarten überexprimiert, insbesondere in Glioblastomen sowie in Gastrointestinal- und Prostatakarzinomen und ist daher ein interessantes Zielprotein in der Tumorthherapie.⁷⁴⁻⁷⁷ Vor dem Hintergrund dieser Wirkstoffresistenz und einiger klinisch erfolgreicher Typ-II-Inhibitoren (z. B. Lapatinib und Imatinib), die sich von der ATP-Bindungstasche an dem Türsteherrest vorbei bis in einen naheliegenden allosterischen Bereich erstrecken und einzig an inaktive Kinasekonformationen binden, sollte die pharmakologische Relevanz der allosterischen Bindungsstelle in cSrc untersucht werden. In einem fragmentbasierten Ansatz sollten basierend auf den Pyrazolharnstoffen Typ-II-Inhibitoren für cSrc entwickelt werden, die die enzymatisch inaktive DFG-*out*-Konformation der cSrc Kinasedomäne stabilisieren und gleichzeitig die Aktivität gegenüber der Türstehermutante T338M beibehalten.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Typ-III-Inhibitoren hemmen die wirkstoffresistente cSrcT338M-Mutante

In einer Durchmusterungskampagne wurden die Pyrazolharnstoffe **2.17b**, **2.17c** als Typ-III-Binder von cSrc mit K_D -Werten im mikromolaren Bereich identifiziert (Tabelle 3.1).⁶⁴ Einige Pyrazolharnstoffe waren als potente Typ-III-Binder der Serin/Threonin Kinase p38 α mit Affinitäten im niederen nanomolaren Bereich bekannt (Kapitel 2), wobei nicht bekannt war, dass diese Verbindungsklasse auch an cSrc bindet.^{57,78} Im weiteren Verlauf der Studie konnte die Hemmung der Kinaseaktivität von cSrc (mikromolarer Bereich, Tabelle 3.1) mittels aktivitätsbasierten Assays bestätigt werden. Der angenommene Typ-III-Bindungsmodus wurde mit Hilfe der Protein-Röntgenkristallographie (PDB-Code: 3F3U und 3F3T) verifiziert. Die Komplexstrukturen klärten zudem die Präferenz für die *N*^c-Aryl-Substituenten in **2.17b** und **2.17c** auf und belegten, dass Größe und Hydrophobizität dieser Arylsubstituenten wichtige Determinanten für eine energetisch vorteilhafte Bindung an inaktive

Konformationen von cSrc sind. Aktivitätsmessungen mit der wirkstoffresistenten Variante von cSrc (T338M) zeigten im Vergleich zum Wildtyp, dass der größere Türsteherrest keinen Einfluss auf die Potenz von **2.17b** hat, wobei der größere Naphthylrest von **2.17c** von der wirkstoffresistenten Variante von cSrc nicht toleriert wird und zum Verlust der Aktivität des Inhibitors führt. Im Gegensatz dazu verlieren Typ-I-Inhibitoren wie das Chinazolin **3.1** oder das Aminothiazol Dasatinib stark an Aktivität gegenüber cSrc T338M (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Typ-I- und Typ-III-Inhibitoren für cSrc und p38 α .^a

Verbindung	IC ₅₀ [μ M]		K _D [μ M]	
	cSrc (Wildtyp)	cSrc (T338M)	cSrc (Wildtyp)	p38 α
2.17b	32.1 \pm 7.5 ⁴⁵	27.8 \pm 10.2	35 \pm 0.9 % ⁴⁵ (50 μ M)	0.055 ⁴⁵ \pm 0.005
2.17c	64.1 \pm 15.3 ⁴⁵	>100	26 \pm 1.3 % ⁴⁵ (50 μ M)	0.012 ⁴⁵ \pm 0.002
3.1	6.4 ⁷⁶	>100 ⁷⁶	45 \pm 1.3 % ⁴⁵ (10 μ M)	>100 [#]
3.2	0.0004 \pm 0.0002	0.480 \pm 0.40	0.011 \pm 0.003	0.495 \pm 0.128

^a Strukturen der Pyrazolharnstoffe **2.17b**, **2.17c**, des Aminochinazolins **3.1** und des Aminothiazols Dasatinib, sowie IC₅₀-Werte (μ M) der gezeigten Inhibitoren für den Wildtyp von cSrc und cSrc T338M sowie die K_D-Werte (μ M) für cSrc und p38 α . Die mit [#] gekennzeichneten Werte konnten aufgrund der Interferenz des Assaysystems mit der intrinsischen Inhibitor-Fluoreszenz nicht ermittelt werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch für EGFR berichtet, wo die T790M Mutation des Türsteherrestes zu einer Wirkstoffresistenz gegenüber den Arzneimitteln Gefitinib und Erlotinib führt.⁷⁹ Um den Mechanismus der Dasatinib-Resistenz von cSrc aufzuklären, wurde dessen Struktur im Komplex mit dem Wildtyp von cSrc gelöst (PDB-Code: 3G5D)⁷⁰ und der Bindungsmodus in eine apo cSrc T338M Struktur (PDB-Code: 2QI8) modelliert (Abb. 3.1).[†]

* Die Messungen wurden von Dr. Mathias Rabiller und Dr. Jeffrey R. Simard durchgeführt.

† Diese strukturellen Studien wurden von Dr. Christian Grütter und Dr. Jeffrey R. Simard durchgeführt.

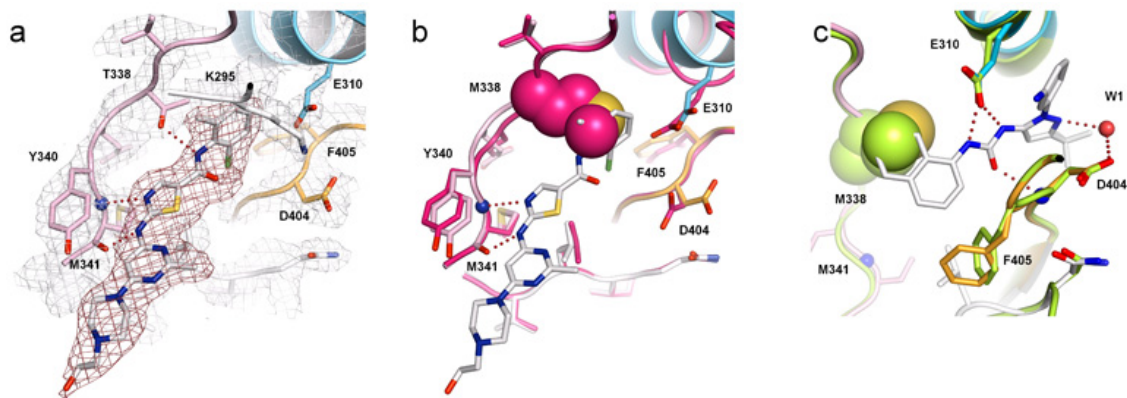


Abb. 3.1: Kristallstruktur des cSrc-Dasatinib-Komplexes (PDB-Code: 3G5D). (a) Die Elektronendichte von Dasatinib gebunden in der ATP-Bindungstasche von cSrc in der aktiven Konformation (DFG-*in*) (orange). Die $2F_o-F_c$ Elektronendichten von cSrc (grau) und Dasatinib (rot) sind bei 1σ konturiert. Die Wasserstoffbrücken des Inhibitors mit der Scharnierregion (pink) sind durch rote Kugeln dargestellt. (b) Der cSrc-Dasatinib-Komplex überlagert mit der Struktur von cSrc T338M (PDB-Code: 2QI8). Die Anilineinheit von Dasatinib kollidiert mit dem Türsteherrest der wirkstoffresistenten Variante cSrc T338M. (c) Bindungsmodus von **2.17c** übertragen aus dem cSrc-**2.17c**-Komplex auf die cSrc T338M Variante. Die Naphthyleinheit des Inhibitors überschneidet sich mit der Seitenkette des Türsteherrestes.

Die Überlagerung zeigt deutlich, wie die Methionin-Seitenkette der Mutationsvariante nicht nur die essentielle Wasserstoffbrücke zwischen dem Inhibitor und der Seitenkette des Türstehers unterbindet, sondern auch sterisch die Bindung des Inhibitors verhindert. Diese sterische Abstoßung durch den größeren Türsteherrest ist wahrscheinlich auch für den Aktivitätsverlust von **2.17c** und **3.1** in cSrc T338M (Abb. 3.1) verantwortlich und zeigt, dass ein größerer Türsteherrest kleinere Verbindungen wie **2.17b** nicht beeinträchtigt und eine Bindung in dem allosterischen Bereich inaktiver Kinasen (DFG-*out*) ermöglicht.

3.3.2 Design potenter Typ-II-Hybridinhibitoren für die cSrc Kinase

Die Typ-III-Pyrazolharnstoffe **2.17b** und **2.17c**, die nur moderate IC_{50} -Werte in cSrc aufweisen, dienten als Ausgangspunkt für die Entwicklung potenterer Typ-II-Inhibitoren. Die Überlagerung des cSrc-Pyrazolharnstoff-Komplexes (PDB-Code: 3F3U) mit einer in der Arbeitsgruppe Rauh gelösten Struktur von cSrc im Komplex mit einem 4-Aminochinazolin (PDB-Code: 2QLQ)¹⁴ wies darauf hin, dass die Phenylsubstituenten beider Inhibitor-Grundgerüste (das Anilin des Chinazolins sowie das Anilin des Pyrazolharnstoffs) sich in der Nähe der Seitenkette des Türsteherrestes Thr338 überschneiden. Diese Studie deutete darauf hin, dass potente Hybridinhibitoren

aus beiden Grundgerüsten durch eine 1,4- oder 1,3-Verknüpfung hergestellt werden könnten (Abb. 3.2).

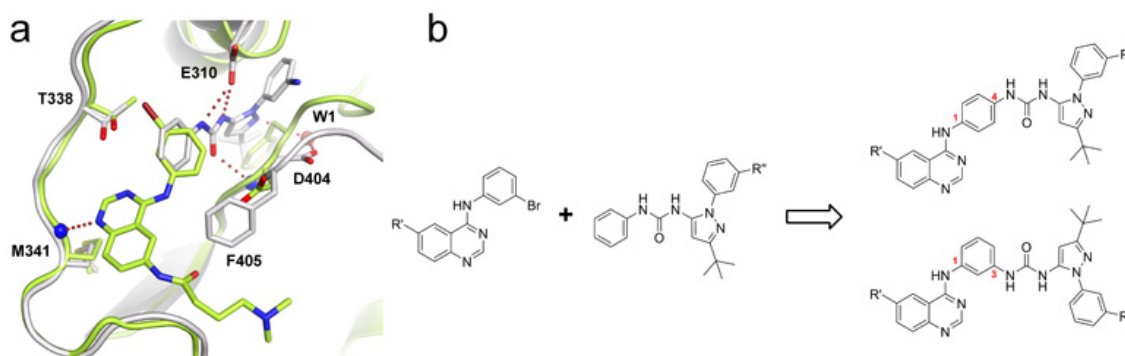


Abb. 3.2: Strukturbasiertes Design potenter Hybridinhibitoren von cSrc. (a) Die Überlagerung der Co-Kristallstrukturen von cSrc im Komplex mit einem Pyrazolharnstoff Typ-III-Inhibitor (PDB-Code: 3F3U)⁶⁴ (grau) und cSrc im Komplex mit einem ATP-kompetitiven 4-Aminochinazolin (grün) (PDB-Code: 2QLQ)¹⁴ lieferte das Rational für das strukturbasierte Design. Das Chinazolin bindet an die Scharnierregion der Kinase, während der Pyrazolharnstoff ausschließlich in der allosterischen Region bindet. Die Phenylringe beider Verbindungen überlagern in der Nähe des Türsteherrestes. (b) Rationales Design von Typ-II-Inhibitoren basierend auf den Bindungsmodi des Typ-I-4-Aminochinazolins und des Typ-III-Pyrazolharnstoffs in cSrc. Entsprechend der Prinzipien des fragmentbasierten Wirkstoffdesigns^{80,81} sollte die chemische Verknüpfung der beiden schwachen Binder in deutlich höheren Bindungsaffinitäten resultieren.

Vergleichbare Pyrazolharnstoffe, die mit verschiedenen Scharnierregion-Bindern verknüpft sind, werden in der Patentliteratur als TIE-2- und RAF-Inhibitoren beschrieben.⁸² In einem fragmentbasierten Ansatz sollten die Pyrazolharnstoffe als Ausgangspunkt für eine strukturbasierte Entwicklung von Verbindungen dienen, die größere Seitenketten an der Türsteherposition tolerieren. Dabei galt diese Substanzklasse als eine erfolgsversprechende Basis, da die Pyrazolharnstoffe eine privilegierte Klasse für Typ-III-Inhibitoren der p38 α Kinase darstellen und hinter dem mutationsanfälligen Türsteherrest binden. Modellierungsstudien von 1,4- und 1,3-verknüpften Hybridverbindungen in einer Struktur von BIRB-796 im Komplex mit p38 α zeigten verschiedene Bindungsgeometrien in der Umgebung des Türsteherrestes sowie der Scharnierregion (Abb. 3.3). Auf Grundlage dieser Beobachtungen sollten die 1,4-verknüpften Hybridverbindungen bevorzugt an cSrc binden, wobei die 1,3-verknüpften Verbindungen eine höhere Affinität gegenüber p38 α besitzen sollten. Obwohl das 4-Aminochinazolin **3.1** und die identifizierten Pyrazolharnstoffe **2.17b** und **2.17c** selbst nur schwache Inhibitorfragmente mit IC₅₀-Werten im mikromolaren

Bereich gegen den Wildtyp von cSrc sind, sollten die 1,4-Hybridverbindungen eine wesentlich höhere Potenz – zumindest gegen die Wildtypkinase – zeigen.

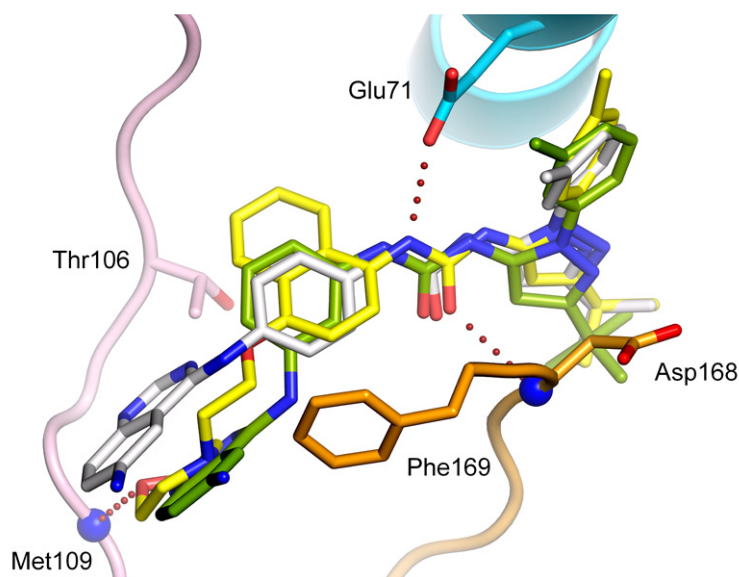


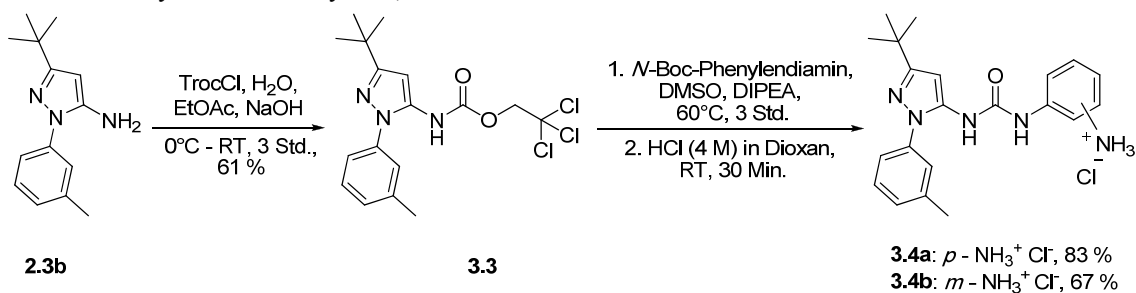
Abb. 3.3: Modellierungsstudie von 1,3- und 1,4-verknüpften Hybridinhibitoren in p38 α in der inaktiven Konformation. Modelle von **3.7c** (weiß) und **3.7d** (grün) wurden entworfen, die Energie mit dem MAB Kraftfeld aus Moloc^{83,84} minimiert und mit einem p38 α -BIRB-796-Komplex überlagert* (PDB-Code: 1KV2)⁵⁷. Der 1,3-Hybridinhibitor **3.7d** bindet ähnlich wie BIRB-796 in der allosterischen Region (Glu71, Asp168) und der Scharnierregion (Met109) von p38 α . Obwohl auch das 1,4-verknüpfte Hybrid **3.7c** den allosterischen Bereich belegt, bildet es aufgrund von konformellen Einschränkungen keinen Kontakt zu der Scharnierregion aus.

3.3.3 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek neuartiger Typ-II-Inhibitoren

Die Synthese der fokussierten Substanzbibliothek der Typ-II-Hybridinhibitoren basierte auf einer konvergenten Syntheseroute, bei der Chinazolin- und Pyrazolteil miteinander verknüpft werden sollten. Dabei sollten Verbindungen mit unterschiedlicher Geometrie dargestellt werden, d.h. sowohl 1,3- als auch 1,4-verknüpfte Hybride (Tabelle 3.2).

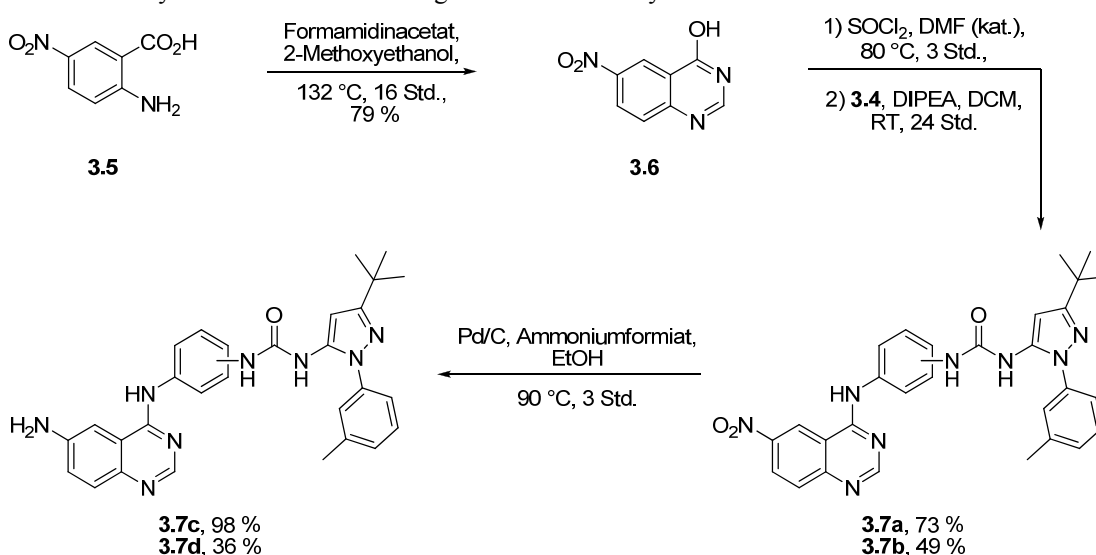
Die Darstellung der *N*-Pyrazol-*N'*-Aryl-Harnstoffe **3.4a** und **b** erfolgte ausgehend von dem Aminopyrazol **2.3b**, welches mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat zum Carbamat **3.3** in 61 %-iger Ausbeute umgesetzt wurde. Die Kupplung mit dem entsprechenden *N*-Boc-Phenylendiamin und die anschließende Entschützung mit HCl (4 M) in Dioxan führte zu den Harnstoffen **3.4a** und **b** mit Ausbeuten von 83 bzw. 67 % nach 2 Schritten.

* Die Modellierungsstudie wurde von Dr. Matthias Rabiller durchgeführt.

Schema 3.1: Synthese der *N*-Pyrazol, *N'*-Anilinharnstoffe.

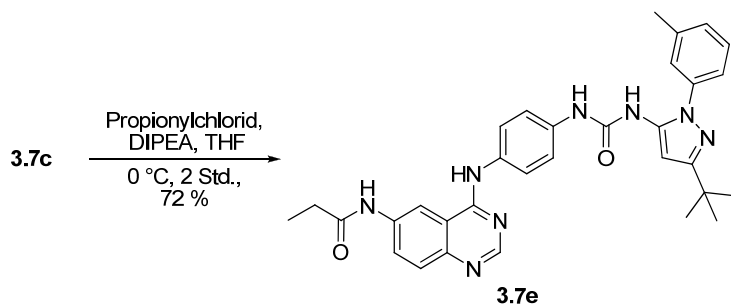
Für die Synthese der Hybridverbindungen **3.7a-e** wurde eine konvergente Synthesestrategie verfolgt. Das Chinazolingrundgerüst wurde durch die Reaktion von 2-Amino-5-nitrobenzoesäure **3.5** mit Formamidinacetat aufgebaut und mit einer Ausbeute von 79 % isoliert. Aus der anschließenden Chlorierung des 4-Hydroxy-6-nitrochinazolins **3.6** mit Thionylchlorid und DMF (kat.) wurde das 4-Chloro-6-nitrochinazolin erhalten und direkt weiterverwendet. Die Chinazolinharnstoffe **3.7a** und **b** wurden durch eine nukleophile Substitution von dem 4-Chloro-6-nitrochinazolin mit den Aminonucleophilen **3.4a** bzw. **b** gebildet. Unter basischen Bedingungen (DIPEA) wurden dabei Ausbeuten von 73 bzw. 49 % erzielt. Die weitere Reduktion der Nitroverbindungen **3.7a** und **b** mit Pd/C und Ammoniumformiat lieferte die Amine **3.7c** und **d**, die mit Ausbeuten von 98 und 36 % isoliert wurden.

Schema 3.2: Synthese der Chinazolinfragmente sowie der Hybridinhibitoren.



Die Einführung des Propionylsubstituenten wurde durch die Reaktion von **3.7c** mit Propionylchlorid in Gegenwart von DIPEA in THF erreicht, und die Verbindung **3.7e** mit einer Ausbeute von 72 % erhalten.

Schema 3.3: Derivatisierung des 6-Amino-chinazolins.



3.3.4 *In vitro* Charakterisierung der neuen Typ-II-Hybridinhibitoren

Zunächst wurden die Bindungsaffinitäten (K_D -Werte) aller Hybridverbindungen mit Hilfe des FLiK-Systems bestimmt.* Dadurch konnte gleichzeitig bestätigt werden, dass die Liganden den allosterischen Bereich sowohl in cSrc auch als in p38 α adressieren. Zudem wurde die Präferenz der Liganden hinsichtlich p38 α und cSrc belegt (siehe Kapitel 2).^{62,64}

* Diese Messungen wurden von Dr. Jeffrey R. Simard durchgeführt.

Tabelle 3.2: Fokussierte Bibliothek rational entworfener Typ-II-Inhibitoren.^a

Verbindung	IC ₅₀ [μM]		K _D [μM]	
	cSrc (Wildtyp)	cSrc (T338M)	cSrc (Wildtyp)	p38α
3.7a	0.071 ± 0.010	0.101 ± 0.004	0.174 ± 0.038	0.127 ± 0.026
3.7c	0.021 ± 0.005	0.034 ± 0.012	0.073 ± 0.016	0.342 ± 0.039
3.7e	0.014 ± 0.001	0.023 ± 0.004	0.056 ± 0.013	0.245 ± 0.055
3.7b	0.207 ± 0.079	keine Bindung	0.256 ± 0.064	0.050 ± 0.016
3.7d	0.235 ± 0.094	36.8 ± 6	0.174 ± 0.038	0.127 ± 0.026

^a Strukturen der 1,4- und 1,3-verknüpften Hybridinhibitoren. Gezeigt sind die IC₅₀-Werte (μM) der Inhibitoren für cSrc Wildtyp und cSrc T338M, sowie die K_D-Werte (μM) für cSrc und p38α. Die 1,4-verknüpften Systeme zeigen eine höhere Aktivität gegen den Wildtyp sowie die wirkstoffresistente Variante von cSrc, wobei die 1,3-verknüpften Inhibitoren cSrc T338M signifikant schlechter inhibieren.*

Die Daten bestätigten die erwartete Präferenz der 1,3- sowie 1,4-verknüpften Systeme bezüglich p38α bzw. cSrc. Des Weiteren wurden Enzymaktivitätsassays für cSrc durchgeführt (Wildtyp und T338M-Variante), um die Inhibition des Phosphattransfers durch einige der Typ-II-Inhibitoren zu untersuchen (Tabelle 3.2). Im Vergleich zu den einzelnen Pyrazolharnstoff- und Chinazolinfragmenten **2.17b** und **2.17c**, aus denen die Hybridverbindungen hergestellt wurden, konnten deutlich niedrigere IC₅₀-Werte beobachtet werden. Die absoluten Werte für die Bindungsaffinitäten (K_D) waren insgesamt etwas höher als die IC₅₀-Werte, folgten aber demselben Trend sowohl für 1,3- als auch für 1,4-verknüpfte Hybridverbindungen. Die wichtigste Erkenntnis aus diesen Messungen war jedoch die Tatsache, dass die 1,4-verknüpften Hybridinhibitoren (**3.7a, c, e**) ihre Aktivität *in vitro* auch gegenüber der wirkstoffresistenten Variante von cSrc bewahren.

* Die Aktivitätsmessungen wurden von Dr. Matthias Rabiller durchgeführt.

3.3.5 Strukturbiologische Untersuchung der Hybridinhibitoren

Um Aufschluss über den Bindungsmodus dieser Typ-II-Inhibitor-Klasse zu bekommen, und um zu verstehen, wie die 1,4-verknüpften Inhibitoren den sperrigen Met-Türsteherrest umgehen, ohne an Affinität zu verlieren, wurden Kristallisationsstudien von cSrc (Wildtyp und T338M Variante) mit **3.7c** durchgeführt.*

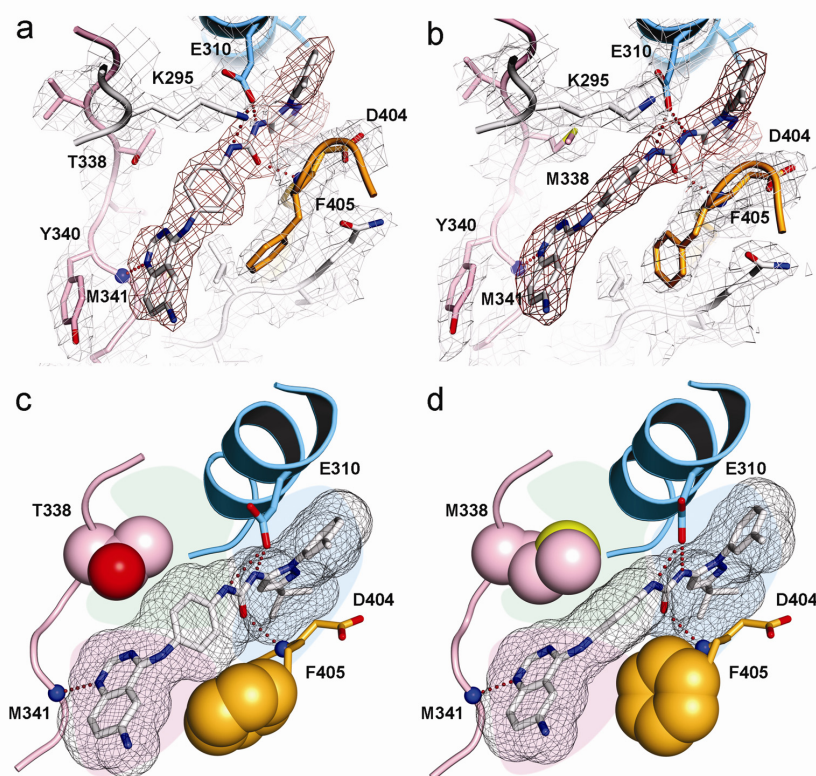


Abb. 3.4: Der 1,4-verknüpfte Hybridinhibitor **3.7c** im Komplex mit dem Wildtyp von cSrc und der wirkstoffresistenten cSrc T338M-Variante. Die Strukturen zeigen die Inhibitorflexibilität, die es ermöglicht, die durch den Türsteher hervorgerufene Wirkstoffresistenz zu umgehen. Darstellung der experimentellen Elektronendichte (Ligand rot, Protein grau) von cSrc-**3.7c** (a) und cSrc-T338M-**3.7c** (b). Beide Datensätze haben eine Auflösung von 2.6 Å und die $2F_o - F_c$ Elektronendichten sind bei 1σ konturiert. Die Wasserstoffbrücken des Inhibitors zur Helix C (blau), dem DFG-Motiv (orange) und der Scharnierregion (pink) sind durch rote Kugeln dargestellt. Die Kinasedomäne ist in der inaktiven Konformation, und die Pyrazolharnstoffeinheit liegt in der allosterischen Region flankiert von der Helix C und dem DFG-Motiv. Das N1 Atom des Chinazolins bildet eine für diese Klasse typische direkte Wasserstoffbrücke mit dem Peptidrückgrat von M341. In beiden Komplexen wechselwirkt der zentrale Phenylring „edge-to-face“ mit der Seitenkette des F495 (DFG-Motiv). (c) Die van-der-Waals-Radien des Inhibitors (Netz), des Türsteherrestes T338/M338 (pinke Sphären) und die Seitenketten des F403 (orange Sphären) beschreiben, wie durch Rotation des zentralen Phenylrings des Inhibitors der Türsteherrest räumlich umgangen, und die Bindung von **3.7c** an die wirkstoffresistente Variante cSrc T338M ermöglicht wird. (d) Die größere Seitenkette an der Türsteherposition führt zu einem 90°-Flip des zentralen Phenylrings des Inhibitors. Gleichzeitig rotiert auch die Seitenkette des F405 um 90°, so dass die elektrostatisch günstige „edge-to-face“ Orientierung beider aromatischen Systeme beibehalten wird.⁸⁵

* Die Kristallisation und die Strukturaufklärung wurden von Dr. Sabine Klüter bzw. Dr. Christian Grütter durchgeführt

Wie erwartet bindet der Inhibitor an die DFG-*out* Konformation und nimmt einen für Typ-II-Inhibitoren typischen Bindungsmodus ein, indem er von der allosterischen Tasche bis in die ATP-Bindungsstelle reicht (Abb. 3.4). Das N1 Stickstoffatom des Chinazolins bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zu der Scharnierregion (M341) aus, die typischerweise auch bei der Bindung von Chinazolinen an CDK2,⁸⁶ p38 α ,⁸⁶ Aurora,⁸⁷ und EGFR^{71,88} beobachtet wird. Die Pyrazolharnstoffeinheit belegt den allosterischen Bereich und bindet in identischer Weise über Wasserstoffbrücken an die Helix C und den N-terminalen Bereich der Aktivierungsschleife (DFG-Motiv) wie auch in den cSrc-Typ-III-Inhibitor-Komplexen (PDB-Codes: 3F3U und 3F3T)⁶⁴ und der Struktur von BIRB-796 im Komplex mit p38 α .⁵⁷ Der zentrale Phenylring von **3.7c**, der das Chinazolin mit dem Pyrazolharnstoff verbindet, ist zwischen dem Türsteherrest und der Seitenkette von Phe405 des DFG-Motivs stabilisiert. Interessanterweise zwingt der sterisch anspruchsvolle Met Türsteher in dem cSrc-T338M-**3.7c**-Komplex diesen zentralen Phenylring zu einer Rotation um 90°, so dass die Ebene des Phenylrings dem C ϵ des Met338 gegenüberliegt und ein Kontakt mit der Seitenkette dieser Aminosäure vermieden wird. Dabei rotiert die Seitenkette des Phe405 ebenfalls um 90°, so dass die elektrostatisch begünstigte „*edge-to-face*“ Orientierung⁸⁵ beider aromatischen Systeme (Phenylring des Inhibitors und Phenylseitenkette von Phe405) beibehalten wird und möglicherweise diese Konformation zusätzlich stabilisiert (Abb. 3.4). Die Rotation des zentralen Phenylrings in 1,3-verknüpften Systemen wie **3.7b** und **d** ist nicht möglich, ohne die Orientierung des Chinazolins oder Pyrazolharnstoffs und somit die entsprechenden Wechselwirkungen mit dem Protein zu stören. Dies erklärt, warum die Verbindungen **3.7b** und **d** nicht an die wirkstoffresistente cSrc T338M Variante binden können (Abb. 3.5). Eine vergleichbare Flexibilität von Typ-I-Inhibitoren, die auf Pyrazolopyrimidinen basieren und gleichermaßen an cSrc sowie an die Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) (Ile als Türsteher) binden und somit dual-spezifische Tyrosinkinasehemmer darstellen, wurde von Shokat und Mitarbeitern berichtet.⁷³

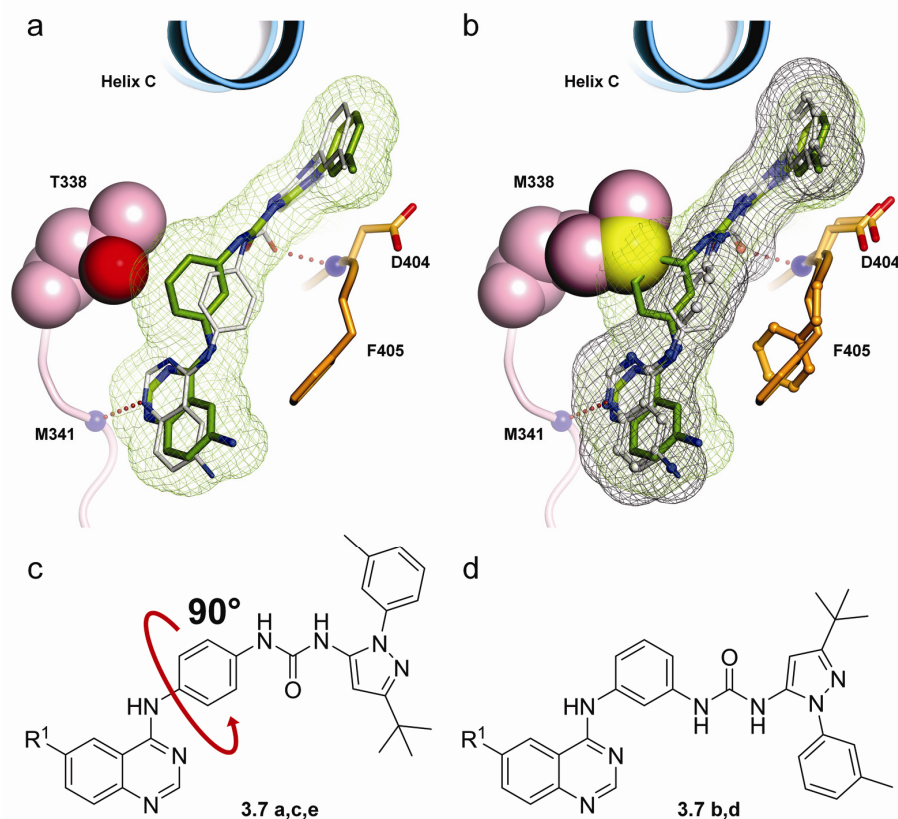


Abb. 3.5: Bindungsmodi der 1,3- und 1,4-verknüpften Hybridverbindungen in cSrc WT und cSrc T338M. Die 1,3-verknüpfte Verbindung **3.7d** wurde manuell in die cSrc-WT-**3.7c** (a) und cSrc-T338M-**3.7c** (b) Komplexe gedockt. Dabei wurde auf die Erhaltung der essentiellen Wasserstoffbrücken zwischen dem Chinazolin N1 Atom mit dem Peptidrückgrat der Scharnierregion und die Bindung der Pyrazolharnstoffeinheit in der allosterischen Tasche geachtet. Der Inhibitor wird von dem kleinen Türsteherrest (T338) gut toleriert. (c) In cSrc T338M kann sich der zentrale 1,4-substituierte Phenylring von **3.7a**, **c** und **e** durch seine freie Rotierbarkeit an den größeren Türsteherrest anpassen. (d) Diese Rotation ist bei den 1,3-verknüpften Systemen nicht gewährleistet und würde die ursprünglichen Interaktionen der Chinazolin- oder Pyrazolharnstoffeinheit stören. Die herabgesetzte Inhibitorflexibilität erklärt warum die Verbindungen nicht an die wirkstoffresistente cSrc T338M-Variante binden.

3.3.6 Typ-II-Inhibitoren unterdrücken Zell-Zell-Kontakte in Tumorzelllinien

Um die Hemmung von cSrc durch den potentesten 1,4-verknüpften Inhibitor **3.7e** in zellulären Systemen zu untersuchen, wurden PC3 und DU145 Prostatakarzinomzelllinien⁷⁶ mit verschiedenen Konzentrationen von **3.7e**, 100 nM Dasatinib als Positivkontrolle sowie DMSO inkubiert, und die Phosphorylierung von Tyr416 (ein Autophosphorylierungsrest in der Aktivierungsschleife von cSrc) und Tyr576/Tyr577 (zwei Aminosäuren in der Aktivierungsschleife von FAK, die von cSrc phosphoryliert werden, um FAK vollständig zu aktivieren) verfolgt. FAK ist eine Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, die an fokale Adhäsionen lokalisiert, welche sich zwischen Zellen

ausbilden. Zudem nimmt FAK eine Schlüsselfunktion bei der Zellzyklusentwicklung, dem Überleben der Zellen sowie der Zellmigration ein.⁸⁹ Die Aktivierung durch cSrc bewirkt eine Trennung der fokalen Adhäsionen, die zu einem Verlust von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten und Apoptose führt.^{77,90} Die Überexpression von FAK und cSrc führt zu einer vermehrten Invasion und Metastasierung von Brust- und Darmtumoren.^{91,92}

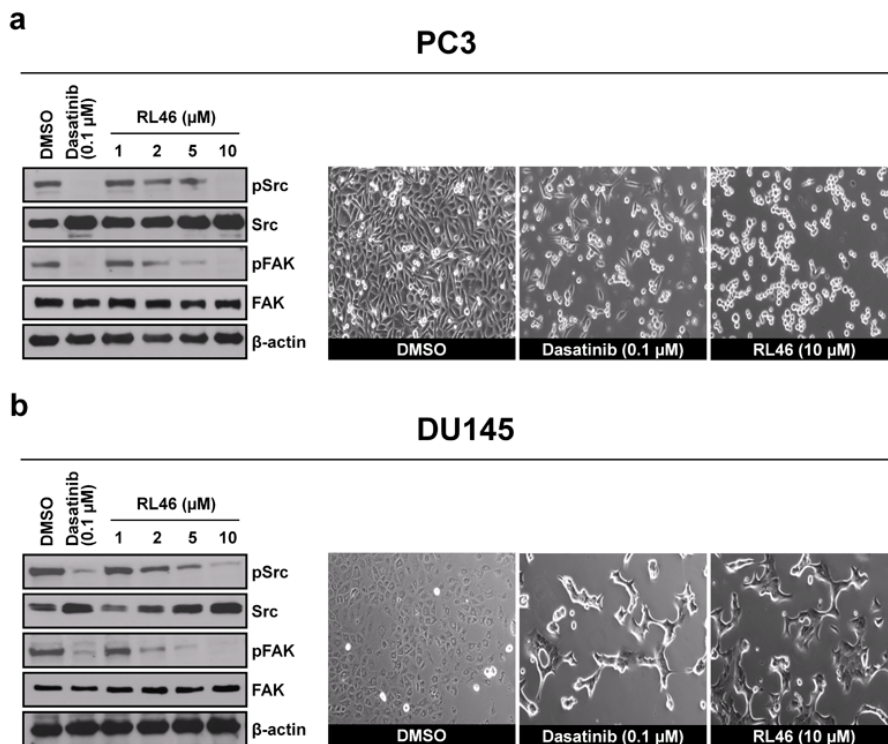


Abb. 3.6: Reduktion der Zell-Zell-Kontakte und der Zellproliferation in PC3- und DU145-Zellen durch **3.7e**. PC3 (a) und DU145 (b) Zellen wurden für 5 Stunden mit **3.7e** (RL46) (1, 2, 5 und 10 μM), Dasatinib (100 μM) und DMSO inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, und die Proteine mittels Immunoblot visualisiert. Die p-Src- und p-FAK-Level wurden deutlich durch die Behandlung mit **3.7e** und Dasatinib reduziert. Das Expressionslevel von FAK blieb unverändert, wobei das cSrc-Expressionslevel in beiden Zelllinien höher lag. Zell-Zell-Kontakte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei 10-facher Vergrößerung dargestellt. Als Folge der Behandlung mit **3.7e** (10 μM) und Dasatinib (100 nM) wurden weniger intakte Zellen gezählt. Sowohl PC3- als auch DU145-Zellen bilden deutlich weniger Zell-Zell-Kontakte aus.

Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden mit Dasatinib oder **3.7e** zeigten konfluente PC3 und DU145 Zellen eine deutlich verminderte Phosphorylierung von cSrc (Tyr416) und FAK (Tyr576/577), sowie den Verlust von Zelladhäsionen und eine erheblich geringere Anzahl an Zellen (Abb. 3.6). Die reduzierte Phosphorylierung von FAK und eine verminderte nachgeschaltete Signalweiterleitung kann aufgrund der Änderung der Zellmorphologie der direkten Hemmung von cSrc durch **3.7e** zugesprochen werden.

Interessanterweise wurde eine gesteigerte Expression von cSrc bei höheren Konzentrationen von **3.7e** in beiden Zelllinien beobachtet. Ein positiver Rückkopplungsmechanismus für die Expression von cSrc bei vorausgegangener Hemmung der cSrc-Aktivität wurde zuvor berichtet,⁹³ was zusätzlich die Inhibition von cSrc *in vivo* bekräftigt.*

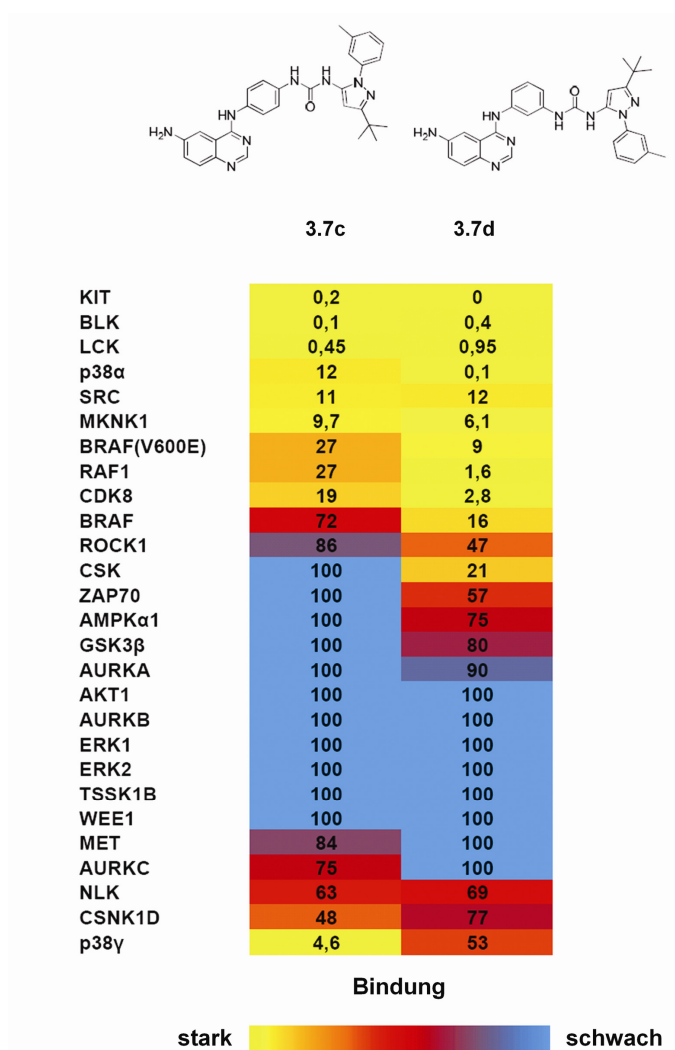


Abb. 3.7: Kinaselektivitätsprofil für 1,3- und 1,4-verknüpfte Hybridinhibitoren. Das Profil wurde für die Verbindungen **3.7c** und **d** für eine Auswahl von 27 verschiedenen Kinasen bei einer Konzentration von 5 μ M durchgeführt, wobei der KINOMEscan Bindungsassay (Ambit Biosciences) verwendet wurde.^{47,94} Die Bindungsaffinitäten wurden abhängig von der Bewertung von Ambit farbkodiert von blau (schwach) nach gelb (stark) dargestellt.

Die Selektivität der Typ-II-Inhibitoren wurde durch eine Profilierung gegen eine Auswahl von 27 verschiedenen Kinasen bei einer Konzentration von 5 μ M überprüft

* Die Zellversuche wurden gemeinsam mit Dr. Armin Robubi durchgeführt.

(Ambit Biosciences) (Abb. 3.7). Die Daten ergaben für 1,3- bzw. 1,4-verknüpfte Hybridinhibitoren unterschiedliche Selektivitätsprofile und zeigten, dass neben cSrc und p38 α auch weitere Kinasen inhibiert werden (Abb. 3.7).

3.3.7 Zusammenfassung

Die Selektivität von Inhibitoren sowie die Entstehung von Wirkstoffresistenzen bleiben fundamentale Herausforderungen bei der Entwicklung von Kinaseinhibitoren für eine effektive Langzeittherapie. In dieser Studie wurde eine Serie von Typ-III-Inhibitoren vorgestellt, die die Dasatinib-resistente cSrc T338M-Variante inhibiert. Trotz der schwachen Bindung an cSrc im Vergleich zu p38 α , dienten diese Pyrazolharnstoffe als hervorragende Ausgangssubstanzen für die Entwicklung der potenteren Typ-II-Inhibitoren. Basierend auf Analysen der Kristallstrukturen von cSrc im Komplex mit verschiedenen Typ-III-Pyrazolharnstoffen sowie mit chinazolinbasierten Typ-I-Inhibitoren, wurden Typ-II-Inhibitoren entworfen und zu potenten cSrc-Inhibitoren entwickelt. Mehrere Derivate wurden synthetisiert, um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen. Diese bestätigten die Annahme, dass die Geometrie der Verbindungen zum einen die Selektivität gegenüber cSrc oder p38 α bestimmt, und es zum anderen ermöglicht, große Türsteherreste zu umgehen, die häufig Wirkstoffresistenzen in Tumoren hervorrufen. Diese Hypothese wurde durch die Bestimmung der K_D - und IC_{50} -Werte, sowie durch die Protein-Röntgenkristallographie untermauert. Für die gesteigerte Affinität der Typ-II-Hybridinhibitoren war nicht nur die Verknüpfung von Pyrazol- und 4-Aminochinazolin-Einheit ausschlaggebend, sondern auch das Substitutionsmuster des zentralen Phenylringes. Obwohl 1,3- und 1,4-verknüpfte Hybridinhibitoren cSrc sehr potent inhibieren, umgehen ausschließlich die 1,4-verknüpften Hybride die Wirkstoffresistenz-Variante cSrc T338M, indem ihr zentraler Phenylring aufgrund seiner freien Rotierbarkeit einem größeren Türsteherrest ausweichen kann, ohne dass weitere Wechselwirkungen zwischen Protein und Inhibitor beeinflusst werden. In einer Studie haben Shokat *et al.* über eine ähnliche Flexibilität berichtet, die sie bei pyrazolopyrimidinbasierten Typ-I-Inhibitoren beobachtet haben. Diese binden sowohl an cSrc (Türsteher Thr) als auch an die PI3-Kinase (Türsteher Ile) und gelten als dual-spezifische TK/PI3K Inhibitoren.⁷³ Weiter publizierte dieselbe Gruppe Pyrazolopyrimidin-harnstoffe als potente Typ-II-cSrc-Inhibitoren.⁹⁵

Komplexstrukturen mit cSrc zeigten einen *para*-substituierten Phenylring in Nähe des Türsteherrestes. Die Autoren schlussfolgern, dass die relative Orientierung des Phenylringes im Vergleich zu dem *o*-Methylanilin von Imatinib, das eine effektive Bindung an die wirkstoffresistente Abl-T315I Variante verhindert, dafür verantwortlich ist, dass diese Inhibitoren auch an Abl-T315I binden können.

Die Aktivität der in dieser Arbeit vorgestellten Typ-II-Inhibitoren in den cSrc-relevanten Prostatakarzinom-Zelllinien unterstreicht das strukturbasierte Rational, welches für das Design dieser potenten Verbindungen verwendet wurde. Unter Verwendung des FLiK-Systems für cSrc konnte gezeigt werden, dass die 1,4-verknüpften Verbindungen (**3.7a**, **c** und **e**) wesentlich langsamer von ihrem Wirkort dissoziieren als die weniger aktiven 1,3-verknüpften Systeme (**3.7b** und **d**), wobei die Bindungskonstanten aller Verbindungen ähnlich sind. Daher erscheint es besonders interessant, dass die *in vivo* Wirksamkeit eines Wirkstoffes gegen sein primäres Zielprotein mit seiner dortigen Verweildauer korreliert, was bedeutet, dass ein Wirkstoff nur solange wirkt, wie er an das Zielprotein gebunden ist.⁵⁸ Auch wenn es zurzeit nicht klar ist, welche Kinasen im Verlauf zielgerichteter Therapien Wirkstoffresistenzen aufgrund von Punktmutationen entwickeln werden, ist es augenscheinlich, dass dies vor dem Hintergrund steigender Zahlen von Therapien mit Kinaseinhibitoren zukünftig eines der zentralen Probleme in der Kinaseforschung darstellen wird. Wie aus dem Auftreten von Resistenzen gegenüber antibakteriellen und antiviralen Substanzen bekannt ist, wird durch die Inaktivierung essentieller Proteine die Häufigkeit von Resistenzmutationen erhöht. Dies wird auch in Tumorzelllinien zu entsprechenden Mutationen und zu sich schneller teilenden Zellpopulationen führen. Um dieser Herausforderung nachzugehen, und um die Entwicklung zukünftiger Generationen von Kinaseinhibitoren zu stimulieren, werden eingehende Studien durchgeführt, die in Modellorganismen Resistenzmutationen als Folge einer Behandlung mit spezifischen Kinaseinhibitoren hervorrufen sollen. Dabei wird das Ziel verfolgt, klinisch relevante Mutationen von Kinaseallelen vorhersagen zu können. Solche Erkenntnisse werden das Konzept der personalisierten Tumorthherapie durch den Einsatz von Wirkstoffen vorantreiben, die gegen die identifizierte Tumorzelllinie entwickelt wurden.⁹⁶⁻⁹⁸ Alternativ ist das Wissen über die genaue Position wahrscheinlich auftretender Mutationen, die Wirkstoffresistenzen zur Folge haben,

essentiell, um neue Generationen von Wirkstoffen zu entwickeln, die solche Resistenzen umgehen können. Auch wenn Kinasen zu einer ausgiebig untersuchten Enzymklasse gehören, sind Strategien zum Umgehen von Wirkstoffresistenzen weiterhin eine große Herausforderung für die innovative Lösungen gefunden werden müssen. Beispielsweise haben Crespo et al. gezeigt⁹⁹, dass Imatinib strukturell so verändert werden kann, dass der entropische Verlust, der mit der Bindung an die wirkstoffresistente Variante Abl-D816V einhergeht, minimiert werden kann, indem eine gewisse Flexibilität der Aktivierungsschleife gefördert wird.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse beschreiben einen Ansatz, wie Wirkstoffresistenzen umgangen werden können. Dazu wurden Typ-II-Inhibitoren generiert, die eine intrinsische Flexibilität besitzen und sich daher an mutationsbedingte Veränderungen in der Bindungstasche anpassen können und gleichzeitig die Kinase in ihrer inaktiven Konformation arretieren.

3.4 Publikation

Diese Ergebnisse wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

1. Getlik M., Grütter C., Simard J.R., Klüter S., Rabiller M., Rode H.B., Robubi A., Rauh D., "Hybrid compound design to overcome the T338M gatekeeper mutation in cSrc", *J. Med. Chem.*, 2009, 52: 3915-3926.

4 *N*-Pyrazol-*N'*-Thiazolharnstoffe als p38 α -Inhibitoren

4.1 Einleitung

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP Kinase) p38 α reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung, Überleben und Migration.¹⁰⁰ Nach der Entdeckung von p38 α als Regulator verschiedener inflammatorischer Mediatoren, hat die pharmazeutische Industrie enorme Anstrengungen unternommen, um p38 α -Inhibitoren zu entwickeln. Dabei blieb jedoch der erhoffte Erfolg aus da nur wenige Wirkstoffe kamen über die klinische Phase I hinaus.¹⁰¹ Neueste Untersuchungen zeigen, dass p38 α nicht nur in Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt, sondern auch an der Entstehung von Krebs beteiligt sein kann.¹⁰⁰ Das Scheitern mehrerer p38 α -Inhibitoren in klinischen Studien und die Indikationserweiterung hin zu Tumoren, deren Wachstum durch chronische Entzündungsprozesse gefördert wird, verdeutlichen den Bedarf an neuen Ansätzen und Inhibitoren, die auf den p38 α -Signalweg abzielen. Aktuelle Bemühungen in der Kinaseforschung beschäftigen sich mit der Identifikation und Entwicklung von Inhibitoren, die an weniger konservierte Stellen binden und/oder inaktive Kinasekonformationen stabilisieren.¹⁸ Solch eine allosterische Stelle befindet sich nahe der ATP-Bindungstasche und kann in verschiedenen Kinasen adressiert werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die jeweilige Kinase eine DFG-*out*-Konformation annehmen kann.⁵⁰ Im Vergleich zu herkömmlichen ATP-kompetitiven Inhibitoren versprechen die sogenannten DFG-*out*-Binder vorteilhafte Eigenschaften hinsichtlich auf ihre Selektivität und Pharmakologie.^{50,58}

Bisher sind Methoden zur Identifikation solcher Liganden in der Kinaseforschung limitiert, da die meisten Durchmusterungsverfahren auf der Messung der Enzymaktivität beruhen. Kürzlich konnten in der Arbeitsgruppe Rauh zwei Ansätze entwickelt werden, die beide eine Identifizierung von Liganden ermöglichen, die enzymatisch inaktive Konformationen stabilisieren:^{62-64,69} a) ein Verdrängungsassay, der auf der Enzym-Fragment-Komplementierungs-Technologie beruht, bei der ein

Peptid-Fragment der β -Galaktosidase an einen DFG-*out*-Binder geknüpft ist. Diese Sonde bindet an die inaktive Kinase und kann durch kleine Moleküle verdrängt werden, die an der gleichen Stelle binden. Die Komplementierung der gekürzten β -Galaktosidase mit der freigesetzten Sonde stellt die enzymatische Aktivität wieder her und stimuliert gleichzeitig eine chemilumineszente Reaktion, die ein Auslesen des Signals ermöglicht.⁶⁹ b) Die FLiK-Technologie macht sich die Flexibilität gewisser Strukturelemente von Kinasen zu Nutze, wie beispielsweise die Aktivierungsschleife, in welche Fluorophore eingeführt werden können. Dieses vorteilhafte System kann Konformationsänderungen der Aktivierungsschleife bzw. dem DFG-Motiv – wie die Änderung zwischen DFG-*in* und DFG-*out* – direkt verfolgen. Die sich dabei verändernden Emissionseigenschaften des Fluorophors ermöglichen die direkte Messung der Bindungskonstante K_D .⁶²

4.2 Motivation und Zielsetzung

Bei der Durchmusterung von mehr als 35000 Substanzen im Hochdurchsatzverfahren wurden unter Anwendung des p38 α -FLiK-Assays mehrere Verbindungen als potente p38 α -Binder identifiziert, die auf neuen chemischen Grundgerüsten basierten. Interessanterweise stellte sich heraus, dass die Klasse der *N*-Aryl-*N'*-Thiazolharnstoffe nicht nur in der allosterischen Tasche von p38 α bindet (K_D -Werte = 13-48 μ M) und die DFG-*out*-Konformation stabilisiert, sondern auch die Aktivität der Kinase inhibiert (IC_{50} -Werte = 12-75 μ M).¹⁰² Diese Verbindungen wurden zuvor nicht als Stabilisatoren der inaktiven p38 α -Konformation identifiziert und stellen somit eine neue Substanzklasse für diesen Bindungsmodus dar (Abb. 4.1).

Auffallend ist, dass die gefundenen *N*-Aryl-*N'*-Thiazolharnstoffe alle einen gemeinsamen Benzyloxy-Ethyl-Substituenten an 4-Position des Thiazols tragen, der offensichtlich eine wichtige Determinante für die Bindung dieser Substanzklasse ist (siehe 4.1, Abb. 4.1). Zudem bildet die Harnstoff-Einheit wie erwartet Wasserstoffbrücken zum Peptidrückgrat von Asp168 und der Seitenkette von Glu71 aus. Trotzdem scheint gerade die abgewinkelte Konformation der Benzyloxy-Ethyl-Einheit in dem hydrophoben Bereich hinter dem Türsteherrest das Harnstoff-Pharmakophor in eine geneigte Geometrie zu zwingen – im Vergleich zu dem

Bindungsmodus von BIRB-796 – und verhindert so möglicherweise eine stärkere Bindung dieser Substanzklasse.¹⁰²

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Thiazolharnstoffe untersucht werden und zur Entwicklung von potenten Typ-II- und Typ-III-p38 α -Inhibitoren führen. Unter Anwendung von strukturbasiertem Design sollten chemische Modifikationen wie die Einführung zusätzlicher funktioneller Gruppen oder Heteroatome vorgenommen werden, um die strukturelle Flexibilität des Grundgerüsts auszunutzen, und um spezifisch die Scharnierregion bzw. die allosterische Bindungsstelle zu adressieren. Durch biochemische und strukturbiochemische Analysen sollte die Spezifität der neuen Verbindungen bestätigt werden. Weiterhin sollten diese Verbindungen in zellulären Systemen validiert werden, indem ihre Eigenschaft p38 α zu inhibieren, untersucht werden sollte. Dazu sollte die nachgeschaltete Phosphorylierung von MK2 beobachtet werden.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Strukturbasierte Entwicklung von Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren für p38 α

Das neu entwickelte p38 α -FLiK-System wurde für eine Hochdurchsatz-Durchmusterung von mehr als 35000 Verbindungen angewendet. Bei dieser Durchmusterungskampagne konnten mehrere Treffer identifiziert werden, unter denen sich auch die Klasse der *N*-Aryl,-*N'*-Thiazolharnstoffe befand.¹⁰² Strukturell verwandte Verbindungen wurden als Inhibitoren der Aurora Kinase publiziert (siehe 4.21, Abb. 4.1).

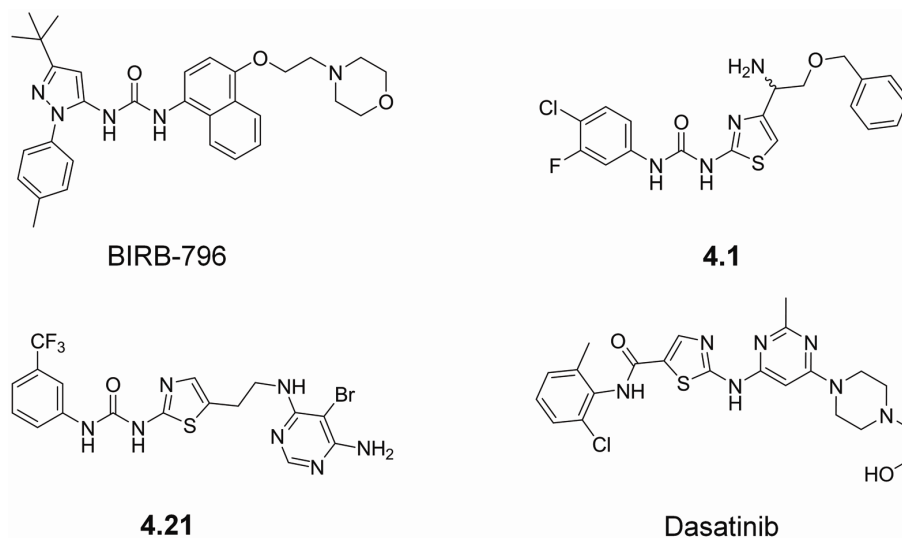


Abb. 4.1: Strukturen des p38 α Inhibitors BIRB-796, der Verbindung **4.1** – einer der ursprünglich identifizierten *N*-Aryl-*N'*-Thiazolharnstoffe – sowie des strukturell verwandten Aurora A Inhibitors **4.21** und dem Abl/Src Inhibitor Dasatinib.

Allerdings binden diese Verbindungen in der ATP-Bindungsstelle der aktiven Kinase-Konformation (Abb. 4.2). Interessanterweise wurde von Karaman *et al.* gezeigt, dass der thiazolbasierte dual-spezifische Abl/Src-Inhibitor Dasatinib ebenfalls an p38 α bindet.⁴⁷ Strukturbiologische Untersuchungen von Dasatinib im Komplex mit p38 α bestätigten einen ATP-kompetitiven Bindungsmodus (Abb. 4.2), wie er auch in den Kinasen cSrc (PDB-Code: 3G5D)⁷⁰ und Abl (PDB-Code: 2GQG)¹⁰³ beobachtet wird.

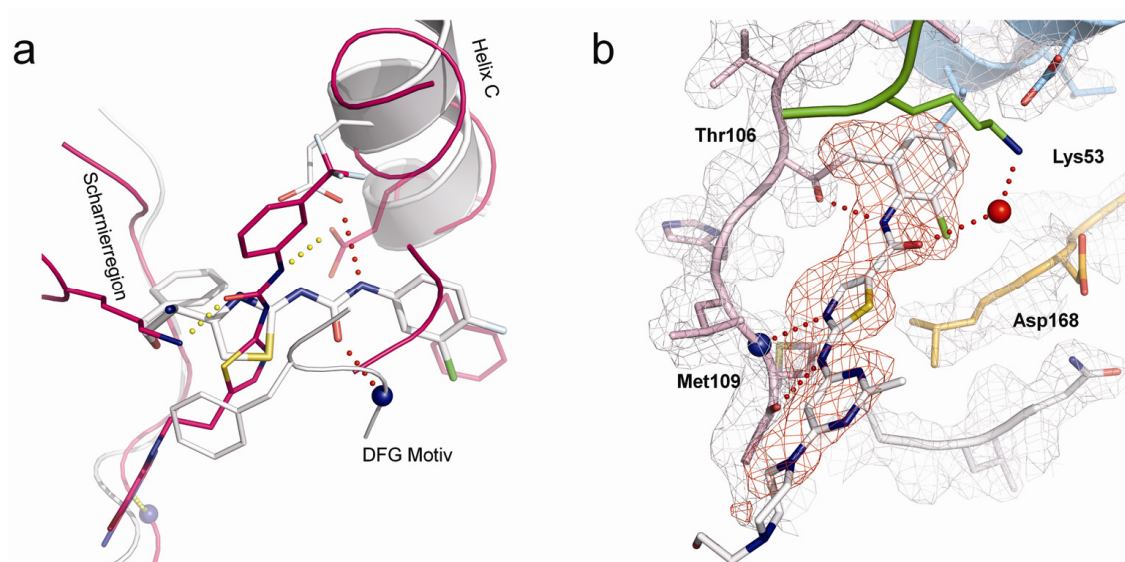


Abb. 4.2: (a) Strukturelle Überlagerung des p38 α -**4.1**-Komplexes (weiß, PDB-Code: 3IW8) und der Kristallstruktur der Aurora Kinase A im Komplex mit einem Thiazolharnstoff (pink, PDB-Code: 3DJ7). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gepunktete Linien dargestellt (rot für **4.1** und gelb für den Aurora A Inhibitor). (b) Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit Dasatinib. Die Elektronendichte ($2F_o-F_c$) von

p38 α (grau) und Dasatinib (rot) ist bei 1 σ konturiert. Dasatinib bildet zwei direkte Wasserstoffbrücken zu der Seitenkette von Thr106 aus, zwei zu dem Peptidrückgrat von Met109 und eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke zu Lys53. Die Elektronendichte von Phe169 ist nicht eindeutig definiert, was auf eine gewisse Flexibilität des DFG-Motivs hindeutet.*

Die Bindung von Dasatinib an p38 α ist identisch zu den bekannten Strukturen von cSrc und Abl, obwohl die Scharnierregion von p38 α um eine Aminosäure verkürzt ist. Der Inhibitor bildet drei Wasserstoffbrücken zu der Scharnierregion aus: die erste zwischen dem Stickstoffatom der Anilineinheit und der Seitenkette des Türsteherrestes (Thr106), die zweite zwischen dem Stickstoffatom des Thiazol-Kerns und dem Rückgrat von Met109 (Amid) und eine dritte zwischen dem sekundären Amin, das Thiazol- und Pyrimidinring verbindet, und dem Rückgrat von Met109 (Carbonyl). Darüber hinaus bildet der Inhibitor eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke zum Lys53 der Glycinreichen Schleife. Die löslichkeitsvermittelnde Ethoxypiperazin-Gruppe ist zum Lösungsmittel gerichtet und weist aus der ATP-Bindungsstelle hinaus. Obwohl Dasatinib ein klassischer Typ-I-Binder ist, ist die Konformation des DFG-Motivs und der Aktivierungsschleife von p38 α vergleichsweise flexibel, was zu einer undeutlichen Elektronendichte für dieses Strukturelement führt (Abb. 4.2). Daher konnte die Aktivierungsschleife im Gegensatz zu den cSrc- und Abl-Strukturen nicht modelliert werden, bei denen eine eindeutige DFG-*in*-Konformation beobachtet wird, wenn Dasatinib gebunden ist. Der Typ-III-Bindungsmodus der identifizierten Thiazolharnstoffe ist somit einzigartig in p38 α und führte zusammen mit den moderaten Bindungsaffinitäten der ersten Treffer-Verbindungen zur Weiterentwicklung dieser Inhibitoren. Das Thiazol-Harnstoff-Gerüst war dafür ein wertvoller Ausgangspunkt, da substituierte Thiazole in vielen Naturstoffen, Pharmaka und Agrochemikalien vorkommen und möglicherweise eine biologisch privilegierte chemische Struktureinheit darstellen.¹⁰⁴

Um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen, wurde das zentrale Thiazol-Harnstoff-Pharmakophor des ursprünglichen Treffers **4.1** beibehalten, und zunächst die Substituenten des Thiazolrings und des N-Harnstoff-Stickstoffatoms modifiziert. Da der 4-Benzylloxy-Ethylrest offenbar deutlich zu der Affinität von **4.1** und den weiteren Treffern beiträgt, wurde lediglich das Amin-substituierte chirale Zentrum entfernt, das

* Diese strukturbioologischen Experimente wurden von Dr. Jeffrey R. Simard und Dr. Christian Grütter durchgeführt.

ohnehin keine essentiellen Wechselwirkungen mit dem Protein eingeht. Des Weiteren wurde das *N*-Harnstoff-Stickstoffatom mit verschiedenen hydrophoben Motiven dekoriert, die üblicherweise in der Kinaseforschung verwendet werden und in die allosterische Tasche binden.⁵⁰

Die Einführung der 3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-Einheit führte zu **4.4f** und einer 40-fachen Steigerung der Affinität verglichen mit der Ausgangssubstanz. Modellierungsstudien führten zu dem Einsatz von Cycloalkan-Substituenten an der 3-Position des Pyrazolrings, mit der Absicht, den hydrophoben Bereich der allosterischen Tasche effizienter auszufüllen. Nachfolgende Versuche, Cyclopropyl- (in **4.4a**) oder Cyclopentyl-Einheiten (in **4.4d** und **e**) einzuführen, resultierten leider nicht in einer besseren Bindungsaffinität. Um mehr über die essentiellen Bindungswechselwirkungen dieser Stoffklasse zu erfahren, wurde die Kristallstruktur von **4.4f** im Komplex mit p38 α gelöst (Abb. 4.3). Diese strukturelle Studie bestätigte die wichtigsten Bindungswechselwirkungen, die zuvor auch für **4.1** beobachtet wurden. Zudem lieferte sie weiteren Aufschluss über die Konformation des in p38 α gebundenen Inhibitors. Die Harnstoff-Einheit bildet die typischen Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp168 des DFG-Motivs und der Seitenkette von Glu71 (befindet sich innerhalb der Helix C), die zuvor für verschiedene Typ-II- und Typ-III-harnstoffbasierte Inhibitoren beobachtet wurden.^{57,62,69,70} Eine weitere Wasserstoffbrücke wird zwischen dem Stickstoffatom des Thiazolrings und dem katalytisch aktiven Lys53 ausgebildet, und stabilisiert möglicherweise die gefaltete Konformation des 4-Benzyloxy-Ethylrests innerhalb der hydrophoben Tasche hinter dem Türsteherrest. Interessanterweise führt diese Wasserstoffbrückenbindung zusammen mit den hydrophoben Wechselwirkungen der 4-Benzyloxy-Ethyl-Einheit im Vergleich zu bisher bekannten Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren von p38 α ⁵⁷ zur Umorientierung des gesamten Thiazol-Harnstoff-Pharmakophors und verhindert dadurch eine Ausrichtung des Inhibitors, die für die Ausbildung idealer Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp168 und Glu71 nötig ist (Abb. 4.3).

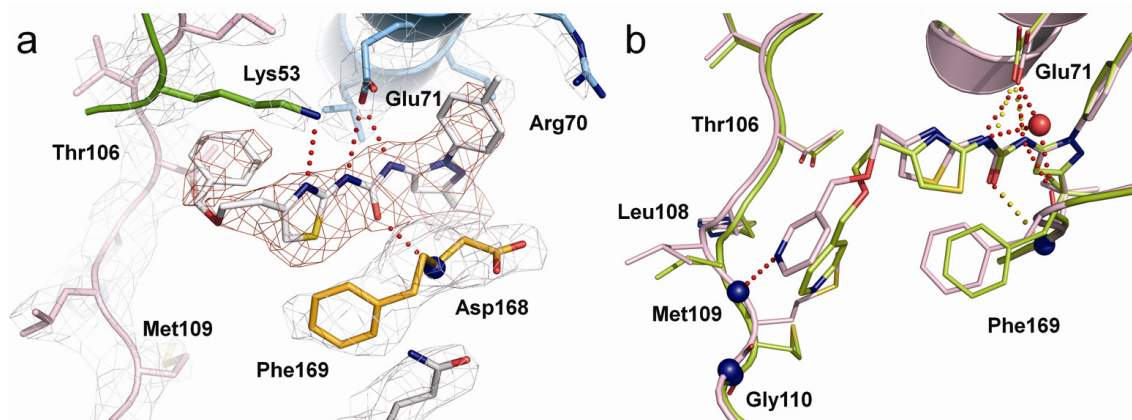


Abb. 4.3: (a) Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit **4.4f**. Die Elektronendichten ($2F_o - F_c$) von p38 α (grau) und **4.4f** (rot) sind bei 1σ konturiert. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gepunktete rote Linien dargestellt. Der Inhibitor bildet die für die Harnstoffeinheit typischen Wasserstoffbrücken zu Glu71 und Asp168 aus. Zusätzlich existiert eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Thiazol-Stickstoffatom und der Seitenkette von Lys53. (b) Strukturelle Überlagerung der p38 α -**4.4i** (pink) und p38 α -**4.4h** (grün) Komplexe. **4.4i** bildet Wasserstoffbrücken (rote gepunktete Linie) zu dem Peptidrückgrat von Met109 und ein starkes Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der Harnstoffeinheit, Glu71 und Asp168. Im Gegensatz dazu bildet **4.4h** lediglich die konservierten Wasserstoffbrücken zu Glu71 und Asp168 (gelb gepunktete Linie). Interessanterweise wird in dem p38 α -**4.4h**-Komplex ein Peptid-Flip um die Met109-Gly110-Bindung beobachtet, obwohl der Inhibitor keine Wasserstoffbrücke zu der Scharnierregion ausbildet.

Obwohl der 4-Benzyloxy-Ethyl-Substituent offensichtlich zu der Affinität dieser Substanzklasse beiträgt und damit für die Bindung der zuvor identifizierten Thiazol-Harnstoff-Verbindungen von entscheidender Bedeutung ist, zwingt die angewinkelte Konformation dieser Gruppe innerhalb der hydrophoben Tasche die Harnstoffeinheit, verglichen mit dem Bindungsmodus von BIRB-796, in eine geneigte Geometrie.¹⁰² Um diese Spannung aufzuheben, wurden Typ-II-Inhibitoren entwickelt, die die Scharnierregion über ihren 4-Benzyloxy-Ethyl-Substituenten adressieren. Dazu wurde der hydrophobe Phenylring durch einen polaren Pyridinring ersetzt (wie in **4.4h** und **i**), was zu dem erwarteten Flip dieser Linkereinheit in die ATP-Bindungsstelle führte. Im Vergleich zu den bisher kristallisierten Liganden verschiebt sich dabei der zentrale Thiazolkern der Inhibitoren **4.4h** und **i** etwa 2 Å weg von dem DFG-Motiv. Dadurch löst sich die geometrische Spannung und ermöglicht es dem Harnstoff-Pharmakophor eine bevorzugte Orientierung einzunehmen, um die gewohnt starken Wasserstoffbrücken ausbilden zu können. Allerdings führt diese Neuausrichtung zu dem Verlust der Wasserstoffbrücke zwischen dem Thiazol-Stickstoff und Lys53 (Abb. 4.3). Bemerkenswert ist, dass **4.4h** einen Peptid-Flip der Met109-Gly110 Bindung induziert, der zuvor für p38 α beschrieben wurde,¹⁰⁵ obwohl kein Kontakt zu der

Scharnierregion ausgebildet wird. Zudem weist eine reduzierte Elektronendichte in der Kristallstruktur auf eine restliche Mobilität des Pyridin-4-methoxy-ethyl-Linkers in **4.4h** hin. Im Gegensatz dazu bildet das Meta-Pyridin von **4.4i** eine direkte Wasserstoffbrücke zu dem Rückgrat von Met109 (Abb. 4.3). Die Bildung dieser Wasserstoffbrückenbindung verringert deutlich die Flexibilität der Linkereinheit auf Kosten der Entropie und führt möglicherweise zu der geringeren Affinität von **4.4i**.

An diesen Ergebnissen orientierte sich die weitere Optimierung mit dem Ziel, die hohe Flexibilität der Linkereinheit zu vermeiden. Das Entfernen dieser Gruppe führte zu der Synthese von **4.5a** und einem 3-fach höheren K_D -Wert verglichen mit **4.4f**, was durch den Verlust der hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der hydrophoben Tasche begründet werden kann. Jedoch geht aus der Kristallstruktur von **4.5a** im Komplex mit p38 α hervor, dass das Entfernen dieser flexiblen Gruppe gleichzeitig zu einer optimalen Ausrichtung des Thiazol-Harnstoff-Pharmakophors führt, wie auch bei **4.4h** und **i**, und den eher moderaten Verlust der Bindungsaffinität erklärt (Abb. 4.4).

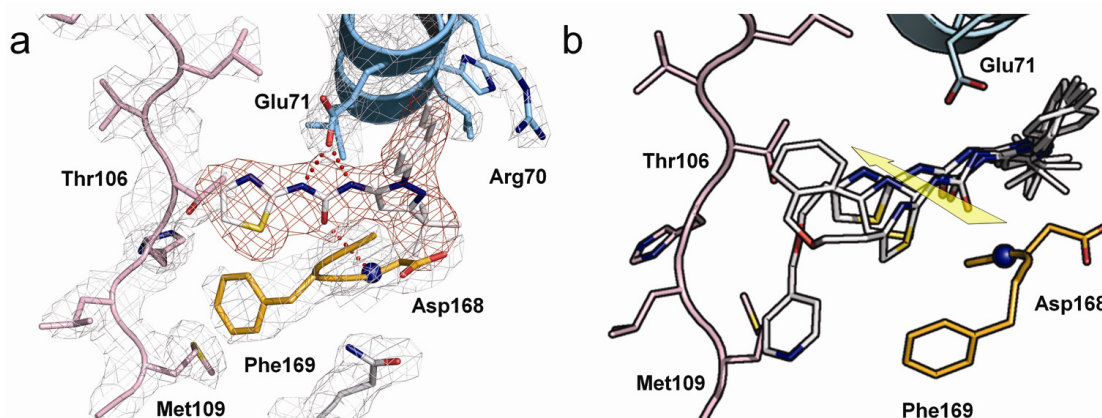


Abb. 4.4: (a) Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit **4.5a**. Die Elektronendichte ($2F_{\sigma} - F_c$) von p38 α (grau) und **4.5a** (rot) ist bei 1σ konturiert. Die rot-gepunkteten Linien stellen die Wasserstoffbrücken dar. (b) Überlagerung der Strukturen von **4.4f**, **4.4h** und **4.5a** im Komplex mit p38 α . Zu sehen ist die Verschiebung des Thiazolkerns in Richtung der hydrophoben Tasche (gelber Pfeil) und die damit zusammenhängende Umorientierung der Harnstoff-Einheit.

Basierend auf diesen Beobachtungen und mit dem Ziel, die Bindungsaffinität weiter zu erhöhen, wurden polare Gruppen am Pyrazol-Phenylring eingeführt, die Wasserstoffbrücken zu der Seitenkette von Arg70 der Helix C ausbilden und die Inhibitoren in der allosterischen Bindungsstelle erweitern sollten. Der Austausch der *para*-Methylgruppe mit einer Essigsäure-Einheit (**4.4c**) resultierte in einer erhöhten Bindungsaffinität. Ähnliche Veränderungen an der *meta*-Position (**4.4b**) waren weniger

vorteilhaft. Die Co-Kristallisation von **4.4c** mit p38 α bestätigte den erwarteten Bindungsmodus (vergleichbar mit dem von **4.4f**) und legte die Bildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zu der Seitenkette von Arg70 dar, wodurch die verbesserte Affinität erklärt werden kann (Abb. 4.5). Obwohl der allgemeine Bindungsmodus identisch zu dem von **4.4f** ist, induziert die neue Interaktion am Rand der allosterischen Tasche einen 90°-Flip des Phenylrings, was die räumliche Anordnung dieses Teils des Liganden verbessert. Die Einblicke in die Bindungsmodi von **4.5a** und **4.4c** führten zu der Annahme, dass die Einführung der *para*-Essigsäure-Funktionalität in **4.5a** einen noch potenteren Typ-III-Inhibitor zur Folge hätte, der die neuartige Wasserstoffbrücke in der allosterischen Bindungstasche ausbildet und gleichzeitig die verzerrte Konformation der zentralen Thiazol-Harnstoff-Einheit vermeidet.

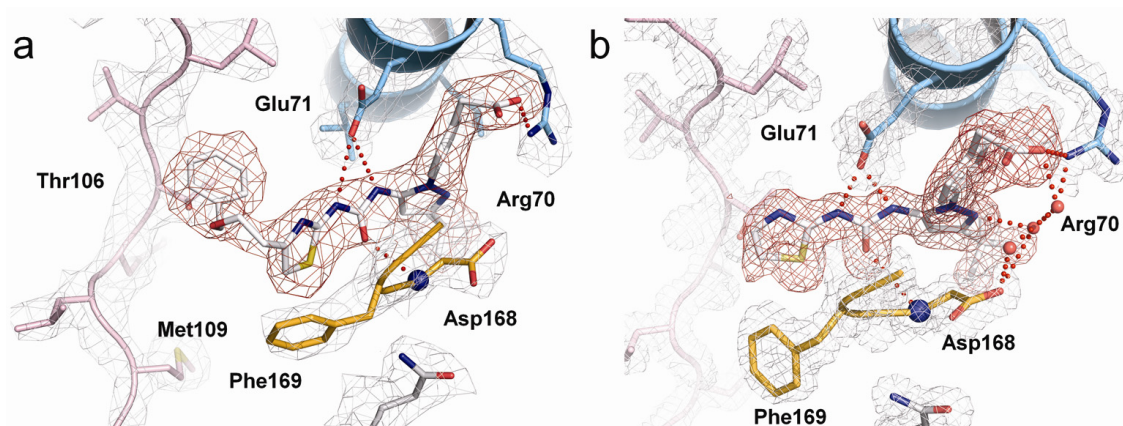


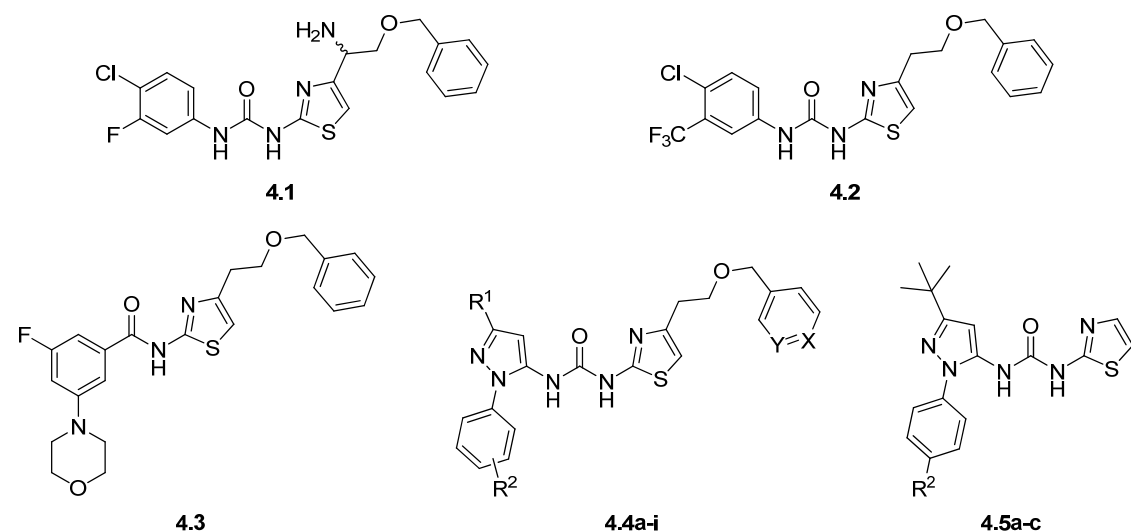
Abb. 4.5: Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit (a) **4.4c** und (b) **4.5c**. Die Elektronendichten ($2F_o - F_c$) von p38 α (grau) und **4.4c** (rot) und **4.5c** (rot) sind bei 1σ konturiert. Beide Inhibitoren bilden zusätzlich zu den konservierten Interaktionen eine Wasserstoffbrücke zu Arg70 der Helix C aus.

Schließlich wurde die Verbindung **4.5c** synthetisiert, die eine 70-fach höhere Affinität als die ursprüngliche Verbindung **4.1** und eine 5-fach höhere Affinität als das engste Analogon **4.5a** aufweist. Die Co-Kristallisation von **4.5c** im Komplex mit p38 α bestätigte die erwartete Wechselwirkung mit Arg70 sowie die Entzerrung der Thiazol-Harnstoff-Einheit. Diese Interaktion wird zudem durch die Koordination von drei Wassermolekülen stabilisiert, die ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken zwischen Asp168, Arg70, der Carbonsäure-Funktionalität und dem N2 Stickstoffatom des Pyrazols bilden. Trotz der Einführung dieser zusätzlichen Gruppe ist der restliche Bindungsmodus von **4.5a** und **c** identisch (Abb. 4.5).

4.3.2 Biochemische Validierung

Um die Inhibitoren zu validieren, wurden zunächst die K_D -Werte mit Hilfe des p38 α -FLiK Assays bestimmt.^{62*} Die Bindungsaffinitäten bestätigten die Erwartungen und untermauerten die rationale Inhibitorentwicklung. Die Bindungsaffinität konnte verglichen mit der Ausgangsverbindung um das 70-fache verbessert werden. Des Weiteren wurden für die aussichtsreichsten Verbindungen Enzymaktivitätsassays durchgeführt, um die Hemmung der Enzymaktivität von p38 α zu untersuchen, und um die gemessenen Bindungsaffinitäten zu bestätigen. Die K_D - und IC_{50} -Werte folgten denselben Trends, auch wenn die absoluten Werte nicht identisch waren. Aus der gesamten Substanzbibliothek zeigte **4.5c** die höchste Affinität, die auch durch die höchste Aktivität untermauert wurde.

* Die K_D -Werte wurden von Beate Aust und Dr. Jeffrey R. Simard gemessen.

Tabelle 4.1: Bindungsaffinitäten (K_D) und IC_{50} -Werte der Thiazolharnstoffe.

Verbindung	R ¹	R ²	X	Y	K _D [nM]	IC ₅₀ [nM]
4.1	-	-	-	-	13400 ± 2300	-
4.2	-	-	-	-	nicht löslich	-
4.3	-	-	-	-	keine Bindung	-
4.5a	-	Me	-	-	990 ± 110	-
4.5b	-	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ Et	-	-	675 ± 58	639 ± 67
4.5c	-	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ H	-	-	196 ± 38	135 ± 21
4.4a	Cyclopropyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	14700 ± 5700	-
4.4b	<i>tert</i> -Butyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	920 ± 11	-
4.4c	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	287 ± 42	-
4.4d	Cyclopentyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	580 ± 139	-
4.4e	Cyclopentyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	901 ± 61	-
4.4f	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	CH	CH	382 ± 65	-
4.4g	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	CF	CH	303 ± 60	-
4.4h	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	N	CH	586 ± 98	-
4.4i	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	CH	N	1656 ± 107	3641 ± 486

4.3.3 Zelluläre Validierung von 4.5c

Um die Inhibition von p38 α in einem zellulären System zu überprüfen, wurde die Fähigkeit von 4.5c untersucht, die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MK2), einem bekannten Substrat von p38 α , zu inhibieren.¹⁰⁶ MK2 und p38 α formen im Zellkern ein stabiles Heterodimer. Nach einer stressvermittelten Signalübertragung führt die Phosphorylierung von p38 α zu einer Auflösung dieses Komplexes. Als Folge seiner Aktivierung kann p38 α erneut an MK2

binden und gleichzeitig an deren Phosphorylierungsstellen phosphorylieren. Dies induziert eine Konformationsänderung von MK2, wodurch das Kernexportsignal exponiert wird. Letztlich wird der p38 α -MK2-Komplex in das Zytoplasma transportiert, wo möglicherweise weitere Substrate wie Transkriptionsfaktoren und Hitzeschockproteine phosphoryliert werden. Daher bestimmt MK2 die zelluläre Lokalisation von p38 α und wirkt aufgrund der Phosphorylierung weiterer Substrate zudem als Effektor von p38 α .^{107,108}

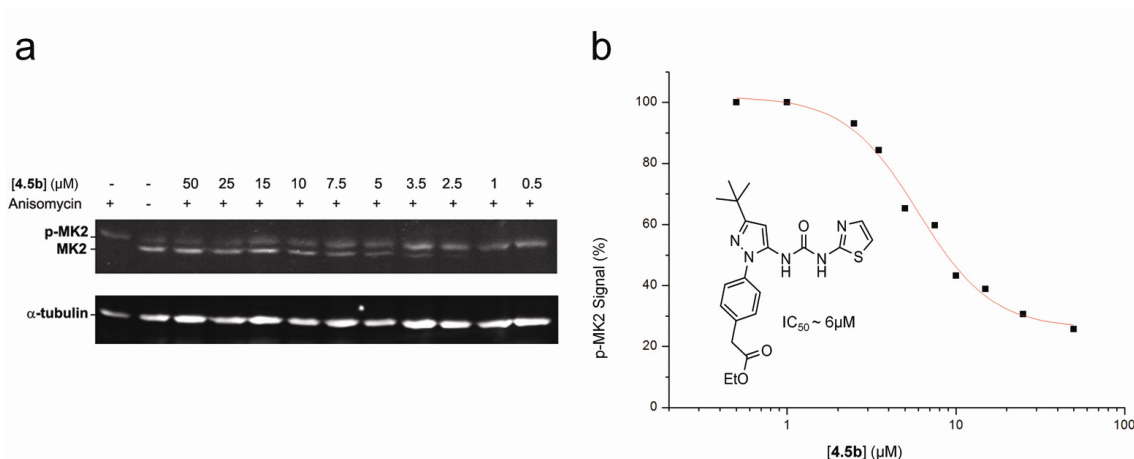


Abb. 4.6: Konzentrationsabhängige Reduktion der MK2-Phosphorylierung durch **4.5b**. HeLa-Zellen wurden in serumfreiem Medium für 24 Std. gehungert, für 30 Min. mit Anisomycin stimuliert (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und für 2 Std. mit 10 verschiedenen Konzentrationen **4.5b** und einer DMSO-Kontrolle inkubiert. (a) Die Zellen wurden lysiert und MK2 mit MK2- und pMK2-Antikörpern (pT334) visualisiert. Bei höheren Inhibitorkonzentrationen ist eine Inhibition der Phosphorylierung zu sehen. (b) Die Blots wurden mit einem Odyssey Infrarot Scanner eingescannt, und die Signale für MK2 und pMK2 in relativen Einheiten dargestellt. Die konzentrationsabhängige Hemmung der MK2-Phosphorylierung zeigt einen zellulären IC_{50} -Wert von 6 μM .*

Trotz der starken *in vitro* Inhibition der p38 α Aktivität (135 ± 21 nM) durch **4.5c**, wurde *in vivo* kein Effekt auf die Phosphorylierung von MK2 beobachtet und die mangelnde Wirksamkeit auf die fehlende Zellpermeabilität aufgrund der polaren Carbonsäure-Einheit von **4.5c** zurückgeführt. Um die Zellpermeabilität zu verbessern, wurde das Ethylester-Derivat **4.5b** hergestellt, das aufgrund seiner verbesserten Lipophilie mit einer gesteigerten Absorption einhergehen sollte.¹⁰⁹ Darüber hinaus sollte es als Prodrug fungieren und in der Zelle durch Esterasen zur biologisch aktiveren freien Säure **4.5c** hydrolysiert werden. Trotz einer 5-fach geringeren *in vitro* Aktivität im Vergleich zu **4.5c**, inhibiert **4.5b** effektiv und konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von

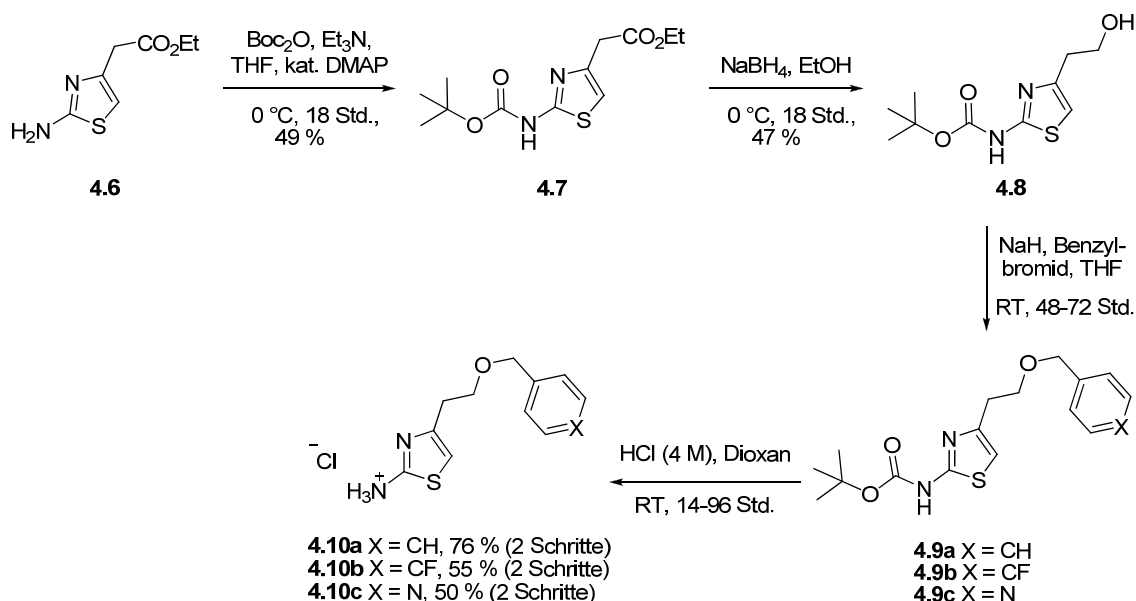
* Die zelluläre Charakterisierung wurde von Dr. Hoang D. Nguyen durchgeführt.

MK2 mit einem zellulären IC₅₀-Wert von 6 μ M (Abb. 4.6). So konnte durch die Einführung der Estergruppe und der damit verbundenen erhöhten Lipophilie die Zellpermeabilität gesteigert und eine Inhibition der Phosphorylierung von MK2 in HeLa-Zellen erzielt werden.

4.3.4 Synthese der N-Pyrazol-N'-Thiazolharnstoffe

Für die Synthese der fokussierten Substanzbibliothek von p38 α Inhibitoren, die auf dem N'-Thiazolharnstoff-Grundgerüst basiert, wurde eine konvergente Syntheseroute gewählt. Im Vordergrund stand dabei die einfache Kombination der synthetisierten Aminothiazol- und Pyrazolamin-Synthese. Die Aminothiazole wurden ausgehend von 2-Aminothiazol-4-Ethylacetat **4.6** dargestellt. Das Amin **4.6** wurde unter basischen Bedingungen und mit DMAP katalysiert mit einer Ausbeute von 49 % in das *tert*-Butylcarbamat **4.7** überführt (Schema 4.1).

Schema 4.1: Synthese der Aminothiazole **4.10a-c**.*



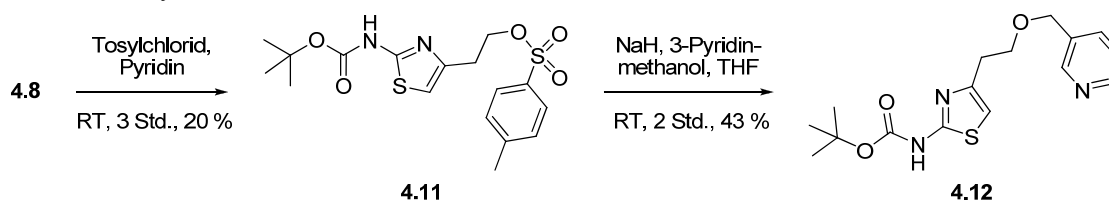
In einem weiteren Schritt wurde der Ethylester mit NaBH₄ zu dem Alkohol **4.8** reduziert, der anschließend nach Deprotonierung mit NaH selektiv mit verschiedenen Benzylbromiden alkyliert wurde. Unter sauren Bedingungen wurden abschließend die

* Dieser Syntheseabschnitt wurde von Prof. Dr. Willem A. L. van Otterlo durchgeführt.

Carbamate in quantitativen Ausbeuten in die Hydrochloride der Aminothiazole **4.10a-c** überführt (Schema 4.1).

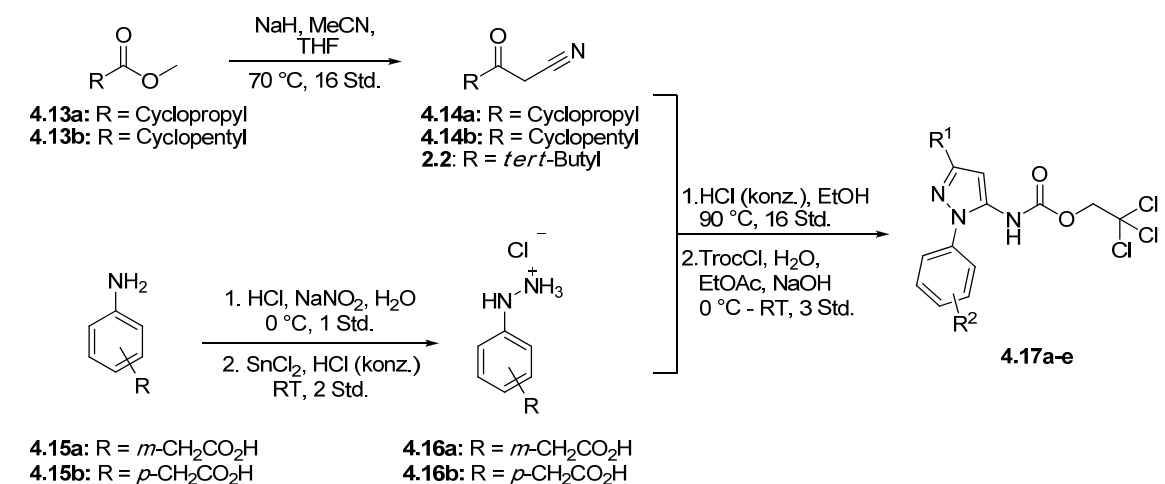
Die Umsetzung von **4.8** mit 3-Bromomethylpyridin nach Deprotonierung des Alkohols mit NaH führte ausschließlich zur *N*-Alkylierung, so dass zur Herstellung von **4.12** ein alternativer Weg verwendet wurde (Schema 4.2). Zunächst wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen durchgemustert, wobei Base, Lösungsmittel sowie Reaktionstemperatur variiert wurden. Der Einsatz von Aminbasen (TEA, DIPEA) führte zu keiner Reaktion, die Alkalimetallhydroxide NaOH und CsOH leiteten ebenso wie NaH lediglich die *N*-Alkylierung ein. Daraufhin sollte das Di-*tert*-butylcarbamate synthetisiert werden, um in einem weiteren Schritt selektiv den Alkohol alkylieren zu können. Auch dieser Ansatz führte nicht zum gewünschten Produkt, da der Alkohol in das *tert*-Butylcarbonat transformiert wurde und eine anschließende *O*-Alkylierung mit 3-Bromomethylpyridin verhindert wurde. Schließlich konnte mit Tosylchlorid der Alkohol mit einer Ausbeute von 20 % in das Tosylat **4.11** überführt werden, welches bei der anschließenden Substitution mit 3-Pyridinmethanol als Abgangsgruppe fungierte und das Carbamat **4.12** in 43 %-iger Ausbeute ergab (Schema 4.2). Im Anschluss wurde die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe mit HCl (4 M in Dioxan) abgespalten und **4.12** in das Aminothiazol **4.10d** überführt.

Schema 4.2: Synthese von Carbamat **4.12**.



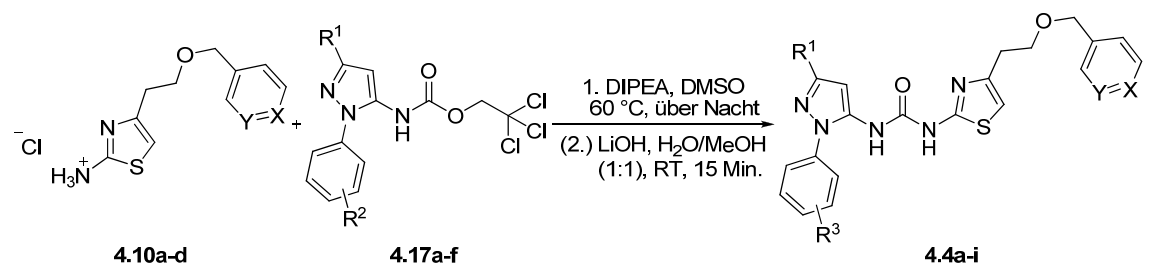
Für die Synthese der Trichloroethyl-Carbamat-Synthone **4.17a-e** wurden die Nitrile **4.14a** und **4.14b** ausgehend von Methylcyclopropyl- bzw. Methylcyclopentancarboxylat und Acetonitril unter Zugabe von NaH entsprechend der Patentliteratur hergestellt (Tabelle 4.2).¹¹⁰ Weiterhin wurden die Hydrazine **4.16a** und **b** durch die Nitrosierung der Aminoessigsäuren **4.15a** und **b** mit NaNO₂ und anschließender Reduktion mit SnCl₂ erhalten (Tabelle 4.2).¹¹⁰ Durch Kondensation der Nitrile **1.5**, **4.14a** und **4.14b** mit den Hydrazinen **4.16a** und **b** wurden zunächst Pyrazolamine erhalten, die ohne weitere Aufreinigung mit Troc-Cl unter den zuvor beschriebenen Bedingungen zu den

Trichloroethyl-Carbamaten **4.17a-e** in moderaten Ausbeuten umgesetzt wurden (Tabelle 4.2).⁷⁰ Bei der Bildung der Pyrazole, die durch HCl katalysiert in EtOH durchgeführt wurde, kommt es gleichzeitig zur Transformation der Carbonsäure in den entsprechenden Ethylester (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Synthese der Carbamate **4.17a-e**.

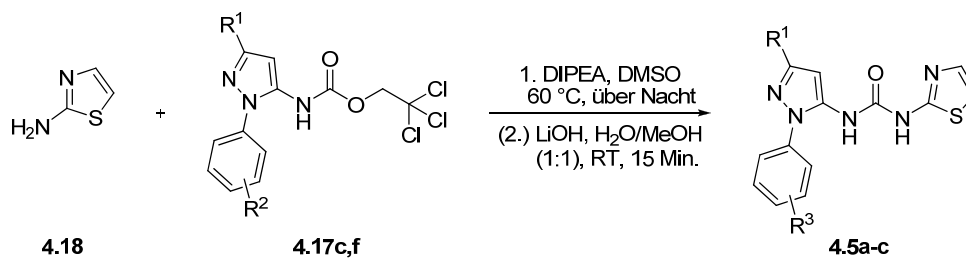
Verbindung	R ¹	R ²	Ausbeute [%] (3 Schritte)
4.17a	Cyclopropyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ Et	9
4.17b	<i>tert</i> -Butyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ Et	37
4.17c	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ Et	61
4.17d	Cyclopentyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ Et	5
4.17e	Cyclopentyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ Et	55

Die Harnstoffbildung wurde durch die nukleophile Substitution der Trichloroethyl-carbamate **4.17a-f** mit den Aminothiazolen **4.10a-d** unter basischen Bedingungen abgeschlossen. Die Ethylester der Thiazolharnstoffe **4.4a-e** wurden nach dieser Kupplung in einer basischen Lösung aus LiOH in H₂O und Methanol hydrolysiert, so dass die korrespondierenden Carbonsäuren freigesetzt wurden. Im Allgemeinen wurden die finalen Thiazolharnstoffe in nur mäßigen Ausbeuten isoliert, was überwiegend an der problematischen Aufreinigung fest zu machen ist. Dabei mussten häufig zwei Aufreinigungsschritte hintereinander geschaltet werden, um reine Verbindungen zu isolieren (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Thiazolharnstoffe **4.4a-i**.

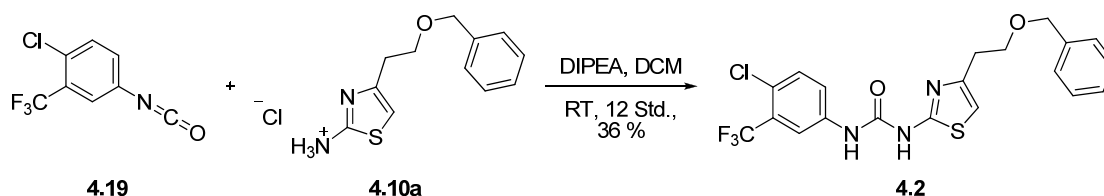
Thiazol	Carbamat	R ¹	R ³	X	Y	Produkt	Ausbeute [%]
4.10a	4.17a	Cyclopropyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	4.4a	9
4.10a	4.17b	<i>tert</i> -Butyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	4.4b	35
4.10a	4.17c	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	4.4c	29
4.10a	4.17d	Cyclopentyl	<i>m</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	4.4d	22
4.10a	4.17e	Cyclopentyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ H	CH	CH	4.4e	64
4.10a	4.17f	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	CH	CH	4.4f	19
4.10b	4.17f	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	CF	CH	4.4g	22
4.10c	4.17f	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	N	CH	4.4h	16
4.10d	4.17f	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	CH	N	4.4i	16

Die Typ-III-Inhibitoren **4.5a-c** wurden unter gleichen Bedingungen hergestellt, wobei die Trichloroethoxy-Gruppe durch das 2-Aminothiazol **4.18** substituiert wurde. Die Carbonsäure **4.5c** wurde abschließend aus der Hydrolyse des Ethylesters **4.5b** gewonnen (Tabelle 4.4).

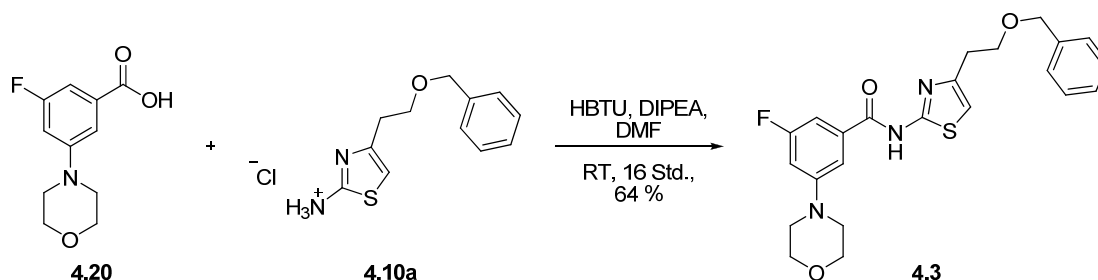
Tabelle 4.4: Thiazolharnstoffe **4.5a-c**.

Amin	Carbamat	R ¹	R ³	Produkt	Ausbeute [%]
4.18	4.17f	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₃	4.5a	59
4.18	4.17c	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ Et	4.5b	29
4.18	4.17c	<i>tert</i> -Butyl	<i>p</i> -CH ₂ CO ₂ H	4.5c	12

Das Aminothiazol **4.10a** wurde in Gegenwart von DIPEA an das Isocyanat **4.19** addiert, so dass der Thiazolharnstoff **4.2** mit einer Ausbeute von 36 % erhalten wurde (Schema 4.3).

Schema 4.3: Synthese **4.2**.

Die Kupplung der Synthone **4.20** und **4.10a** wurde mit HBTU und DIPEA in DMF unter Standard Peptid-Kupplungs-Bedingungen durchgeführt und das Biarylamid **4.3** mit einer Ausbeute von 64 % isoliert (Schema 4.4).

Schema 4.4: Synthese **4.3**.

4.4 Diskussion

Obwohl Kinasen eine der meist untersuchten Zielproteinklassen in der Wirkstoffforschung sind, gehören Inhibitorselektivität, -spezifität und aufkommende Wirkstoffresistenzen zu den größten Herausforderungen in der Kinaseforschung.⁶ Die Entwicklung von Inhibitoren, die an weniger konservierte Stellen binden und Kinasen in deren inaktiven Konformationen stabilisieren, könnte diese Einschränkungen umgehen, wie von Gray und Mitarbeitern mit der Entwicklung des pyrimidinbasierten Inhibitors GNF-2 gezeigt werden konnte.¹¹¹ Obwohl mehrere solcher allosterischen Inhibitoren bereits entwickelt wurden, stellen die ATP-kompetitiven Inhibitoren nach wie vor die größte Klasse der Kinaseinhibitoren dar.^{6,18} Im Rahmen dieses Kapitels wurde das vielversprechende Thiazol-Harnstoff-Gerüst als ein Startpunkt für die

Entwicklung potenter p38 α -Inhibitoren beschrieben, die sich in die sogenannte allosterische Bindungstasche ausdehnen.

In einem strukturbasierten Ansatz wurde eine fokussierte Substanzbibliothek von Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren entworfen und synthetisiert. Darüber hinaus zeigten die optimierten Typ-III-Inhibitoren eine exzellente Inhibition der enzymatischen Aktivität von p38 α . Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden untersucht, um die vorausgesagte Flexibilität des Inhibitorgrundgerüsts und die Möglichkeit, die Inhibitoren in die allosterische Tasche zu erweitern, zu bestätigen. Des Weiteren konnten die Hypothesen durch die Bestimmung von Bindungsaffinitäten, die Verwendung von Kinaseaktivitäts-Assays sowie strukturbioologischen Studien untermauert werden. Die ursprüngliche Absicht, polare Heteroatome in den Benzylring des Thiazol-Substituenten einzuführen, resultierte in Typ-II-Inhibitoren mit moderaten Bindungsaffinitäten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die neu ausgebildete Wasserstoffbrückenbindung zu der Scharnierregion mit einer entropisch benachteiligten, reduzierten Flexibilität der Linkereinheit einhergeht. Des Weiteren führt der Verlust der hydrophoben Wechselwirkungen in dem hydrophoben Bereich hinter dem Türsteherrest zu einer weiter sinkenden Bindungsaffinität. Ein ähnlicher Effekt konnte für das Phenyl-Derivat **2.11** von BIRB-796 beobachtet werden, das eine wesentlich geringere Affinität als die Typ-III-Vorgängermoleküle und auch als BIRB-796 aufweist.^{59,69}

Bei der Weiterentwicklung der Typ-III-Inhibitoren resultierte die Einführung der Essigsäurefunktionalität an den Pyrazol-Phenylring in der Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks in der allosterischen Bindungsstelle, das für die höheren Bindungsaffinitäten grundlegend ist. Gleichzeitig wurde die 4-Benzyl-oxo-Ethyl-Einheit entfernt, so dass das Thiazol-Harnstoff-Pharmakophor eine vorteilhaftere Bindungsgeometrie annehmen kann. Diese ist für die Ausbildung stärkerer Wasserstoffbrücken zu dem Peptidrückgrat des DFG-Motivs (Asp168) und der Seitenkette von Glu71 der Helix C essentiell. Der vorgestellte Ansatz, Inhibitoren weiter in die allosterische Tasche auszudehnen, stellt möglicherweise eine attraktive Alternative für die Entwicklung von Inhibitoren mit vorteilhaften pharmakologischen Profilen dar. Während die Kinase außerhalb der ATP-Bindungsstelle adressiert und in einer inaktiven Konformation stabilisiert wird, können die Inhibitoraktivitäten durch die Ausbildung

neuartiger Interaktionen innerhalb der allosterischen Tasche konserviert werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen und dem einzigartigen Bindungsmodus des Inhibitorgrundgerüsts könnte eine Weiterentwicklung dieser Inhibitoren erfolgen.

4.5 Zusammenfassung

Zusammengefasst konnten potente p38 α -Inhibitoren in einem strukturbasierten Design Ansatz entwickelt werden. Die Affinität der ursprünglich identifizierten Treffer-Strukturen wurde durch die Ausdehnung der Inhibitoren in die allosterische Tasche um ein 70-faches verbessert. Die so gesteigerten Affinitäten konnten durch strukturbiochemische Studien erklärt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass **4.5c** innerhalb der allosterischen Tasche neuartige Interaktionen ausbildet und als nützliche Leitstruktur für die Inhibitorentwicklung dienen kann.

4.6 Publikation

Diese Ergebnisse werden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

1. Getlik M., Grütter C., Simard J. R., Hoang D. H. D., Robubi A., Aust B., van Otterlo W. A. L., Rauh D., Structure-based design, synthesis and biological evaluation of *N*-pyrazole, *N'*-thiazole urea inhibitors of MAP kinase p38 α , 2011, *eingereicht*.

5 Allosterische Modulatoren von p38 α und Bcr-Abl

5.1 Einleitung

Die intensive Forschung auf dem Gebiet der Kinasen brachte in den letzten Jahren eine Fülle bioaktiver kleiner organischer Moleküle hervor, von denen einige Wirkstoffe bereits die Marktzulassung erhalten haben und häufig mit gutem Erfolg in der gezielten Tumorthherapie eingesetzt werden.¹⁹ Die überwiegende Mehrheit von Kinaseinhibitoren adressiert die bei Proteinkinasen hochkonservierte ATP-Bindungsstelle oder angrenzende Bereiche. Diese Substanzen sind häufig unselektive Inhibitoren, wie z. B. Staurosporin, das über 40 Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen potent inhibiert.^{112,113} Auch wenn heute klar ist, dass die meisten zugelassenen Kinaseinhibitoren mehr als eine Kinase inhibieren, stellt die Entwicklung hochselektiver Inhibitoren nach wie vor eine zentrale Herausforderung in der Kinaseforschung dar,²⁰ da durch den Einsatz selektiver Wirkstoffe im Allgemeinen unerwünschte Nebenwirkungen eingeschränkt werden können.¹¹³

Ein alternativer Ansatz zu ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren sind allosterische Modulatoren. Diese Moleküle adressieren Bereiche in einiger Entfernung zu der ATP-Bindungsstelle und stabilisieren inaktive Kinasekonformationen.⁶ Grundsätzlich können solche allosterisch wirkenden Liganden einige Vorteile mit sich bringen. So werden durch die Bindung an weniger konservierte Stellen bessere Selektivitäten erwartet. Wirksamkeiten gegenüber wirkstoffresistenten Mutationen und aktivierende bzw. feinregulatorische Eigenschaften, die aus der Perturbation von Protein-Protein-Interaktionen resultieren, konnten bereits gezeigt werden.^{18,19} Die Identifikation und Entwicklung allosterischer Liganden könnte somit Moleküle mit vorteilhaften Wirkprofilen gegenüber klassischen Kinaseinhibitoren hervorbringen, die zudem aufgrund ihrer Potenz und Selektivität die Untersuchung neuer Regulationsmechanismen von Kinasen auf zellulärer Ebene ermöglichen würden.^{19,113}

Einige allosterische Modulatoren sind bereits bekannt und besitzen überaus interessante Eigenschaften. So befinden sich modifizierte Chinoxaline zurzeit in der klinischen

Erprobung, die an die Pleckstrin-Homologie-Domäne von Akt binden und die Phosphorylierung von Akt und nachgeschalteten Substraten inhibieren. Zudem zeigen Studien, dass diese Moleküle die Translokation von Akt in Zellen beeinflussen.^{19,114} Im N-terminalen Bereich von PDK1 wurde die sogenannte PDK1-interagierende-Fragment-Stelle (PIF) identifiziert, die üblicherweise das phosphorylierte Substrat bindet und so Lokalisation und Aktivierung von PDK1 reguliert. Auch hier wurden allosterische Modulatoren gefunden, die eine Aktivierung imitieren, gleichzeitig aber die Substratbindung verhindern.¹¹³ Novartis entwickelte die Inhibitoren GNF-2 und GNF-5, die an die Myristoyl-Bindungsstelle in Bcr-Abl (einer konstitutiv aktiven Fusionsvariante von Abl) binden, und die Kinaseaktivität effektiv inhibieren.^{17,18}

Ähnliche Lipid-Bindungsstellen wurden auch in weiteren Kinasen identifiziert.^{115,116} So ist eine Bindungsstelle in der C-terminalen Domäne von GSK3 ein wichtiges Element für die zelluläre Lokalisation der Kinase, in CDK2 werden an dieser Stelle regulatorische Proteine gebunden, die die CDK2-Aktivität steuern. In Erk2 binden Substrate wie Transkriptionsfaktoren und Phosphatasen an diesen Bereich.¹¹⁶ Strukturbiologische Untersuchungen bestätigten auch eine Lipid-Bindungsstelle in p38 α , deren Funktion die Feinregulierung der Kinaseaktivität zu sein scheint.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Diese Lipid-Bindungsstelle wird von den beiden α -Helices 1L14 und 2L14 sowie dem Hauptteil der C-terminalen Domäne gebildet und stellt für MAPK ein typisches Strukturelement dar (Abb. 5.1). Protein-Kristallstrukturen im Komplex mit dem Detergenz β -Octylglucopyranosid legten eine gewisse Flexibilität dieses Bereiches offen. Bei der Bindung von β -Octylglucopyranosid „öffnet“ sich die Lipid-Bindungsstelle durch eine Konformationsänderung der α -Helices 1L14 und 2L14 sowie der α EF/ α F Schleife (Abb. 5.1).¹¹⁸

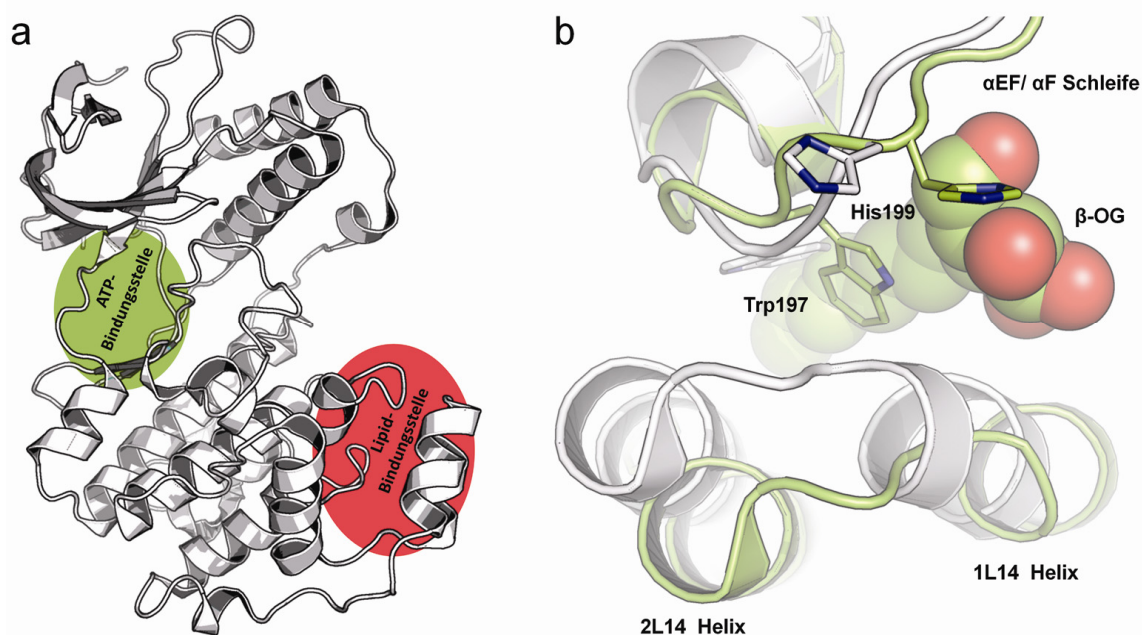


Abb. 5.1: Kristallstruktur von p38 α (grau, PDB-Code: 1WBK). (a) Die ATP-Bindungsstelle (grün) und die Lipid-Bindungsstelle (rot) liegen etwa 30 Å voneinander entfernt. (b) Die Lipid-Bindungsstelle wird von den Helices 1L14, 2L14 sowie von dem Hauptteil der C-terminalen Domäne gebildet (grau). Bei der Bindung von β -Octylglucopyranosid (β -OG, grüne Kugeln) öffnet sich die Bindungsstelle von p38 α (grün, PDB-Code: 2NPQ), was mit einer deutlichen Konformationsänderung der α EF/ α F Schleife einhergeht – insbesondere der Seitenketten von Trp197 und His199. Die Seitenkette von Trp197 bildet mit dem aliphatischen Teil des β -OG hydrophobe Wechselwirkungen aus.¹¹⁸

Einer genauen biologischen Funktion kann diese Bindungsstelle jedoch bis heute nicht zugewiesen werden. Selektive allosterische Liganden, die diesen Bereich adressieren, böten im Rahmen weiterführender chemisch-biologischer Untersuchungen einen wertvollen Ausgangspunkt, um Einblicke in die Funktion der Lipid-Bindungsstelle in p38 α zu erlangen.

5.2 2-Phenylchinazoline als p38 α -Modulatoren

Im Rahmen eines weiteren Projektes wurde das 2-Phenylchinazolin **5.6** zunächst als chemische Sonde entworfen. Ausgehend von einem strukturell verwandten 2-Phenylchinazolin, das von Pierce *et al.* als GSK3-Inhibitor publiziert worden war,¹¹⁹ sollte das Chinazolingrundgerüst mit einem Elektrophil derivatisiert werden. Die Einführung eines Cysteins in der ATP-Bindungsstelle von GSK3 an einer geeigneten Position sollte die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen **5.6** und der modifizierten Kinase erlauben, und somit das selektive Markieren der GSK3 mit **5.6**

ermöglichen. Im weiteren Verlauf sollte der Ligand **5.6** mit einem Fluorophor dekoriert werden, um letztlich mit dieser Sonde die Signalwege von GSK3 auf zellulärer Ebene untersuchen zu können. Vor diesem Hintergrund wurde **5.6** synthetisiert.

Nachdem die FLiK-Technologie auf die Markierung der Glycin-reichen Schleife von p38 α erfolgreich übertragen werden konnte, wurde dieses System für die Durchmusterung einer laborinternen Substanzbibliothek verwendet. Letztere setzt sich überwiegend aus für Kinaseinhibitoren privilegierten chemischen Grundgerüsten zusammen, welche sowohl an die DFG-*in*- als auch die DFG-*out*-Konformation binden.⁶³ Aus dieser Kampagne gingen einige Treffer hervor, welche anschließend näher charakterisiert wurden. Interessanterweise wurde auch **5.6** als Ligand identifiziert, der mit einer Affinität von 1 μ M an p38 α bindet. Um zu prüfen, ob **5.6** direkt mit der Glycin-reichen Schleife wechselwirkt und/oder die DFG-*out*-Konformation stabilisiert, wurde **5.6** mit p38 α co-kristallisiert und die Struktur mit einer Auflösung von 1.7 Å gelöst (PDB-Code: 3HUC).^{63*}

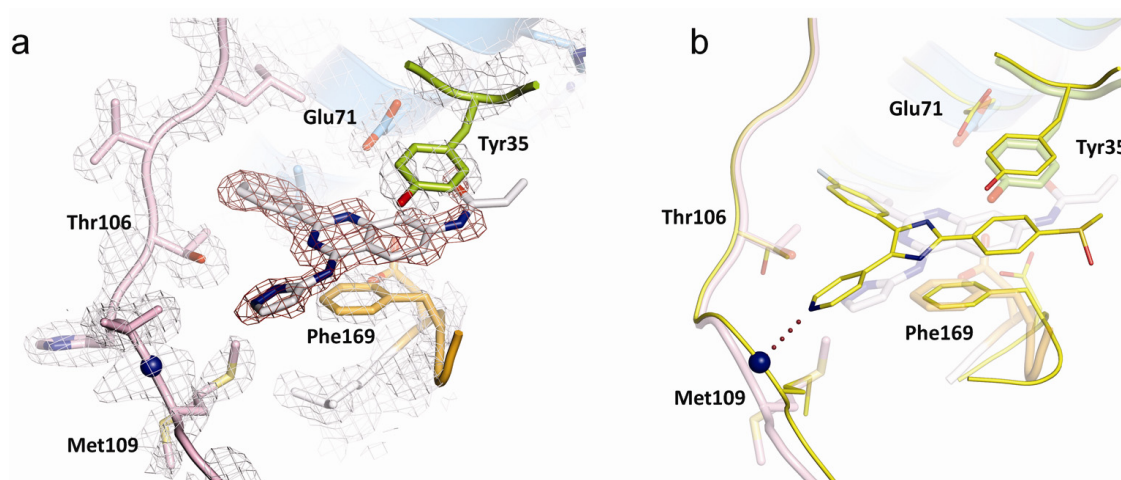


Abb. 5.2: (a) Kristallstruktur von **5.6** im Komplex mit p38 α (PDB-Code: 3HUC). Die $2F_o - F_c$ Elektronendichteverteilung ist bei 1σ konturiert. **5.6** bildet mit den Seitenketten von Tyr35 der Glycin-reichen Schleife (grün) und Phe169 des DFG-Motivs (orange) π - π -Wechselwirkungen aus und bildet keinen Kontakt zu der Scharnierregion (pink). Die Elektronendichte wie ESI-MS-Messungen bestätigen, dass das Elektrophil von **5.6** nicht mit dem Protein reagiert. (b) Strukturelle Überlagerung der p38 α -**5.6**- und p38 α -SB203580-Komplexe.⁶² In dem p38 α -SB203580-Komplex (gelb, PDB-Code: 3GCP)⁶² bildet der Pyridinring des Inhibitors eine Wasserstoffbrücke zum Peptidrückgrat der Scharnierregion (Met109). Der Phenylring von SB203580 und der Chinazolinkern von **5.6** werden zwischen der Glycin-reichen Schleife und dem DFG-Motiv stabilisiert, indem sie mit den Seitenketten von Tyr35 und Phe169 energetisch vorteilhafte π - π -Wechselwirkungen ausbilden. Durch diese Wechselwirkungen wird vermutlich die DFG-*out*-Konformation stabilisiert.

* Die Struktur wurde von Dr. Christian Grütter gelöst.

In dem p38 α -**5.6**-Komplex nimmt der chinazolinbasierte Inhibitor überraschenderweise einen ähnlichen Bindungsmodus wie das dreifach substituierte Imidazol SB203580 an,⁶² und stabilisiert die Kinase in der DFG-*out*-Konformation (Abb. 5.2). Der Chinazolinring wird zwischen der Glycin-reichen Schleife und dem DFG-Motiv durch π - π -Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Tyr35 und Phe169 stabilisiert. Im Gegensatz zu SB203580 interagiert **5.6** nicht mit der Scharnierregion und auch das Elektrophil bildet keinen Kontakt zu ihr aus. Dieser Bindungsmodus unterscheidet sich grundlegend von bisher bekannten Bindungsmodi, die für einige Strukturanaloga von **5.6** im Komplex mit GSK3¹¹⁹ und CaMK1D (PDB-Code: 2JC6) berichtet wurden. In diesen Strukturen befindet sich die Kinase in der DFG-*in*-Konformation und die Aminopyrazol-Einheit des Inhibitors bildet drei Wasserstoffbrücken zu der Scharnierregion aus. Die Entdeckung des neuartigen Bindungsmodus von **5.6** in p38 α leitete die Weiterentwicklung der chinazolinbasierten Liganden als p38 α -Inhibitoren ein.

5.3 Zielsetzung

Das 2-Phenylchinazolin **5.6** bot einen interessanten Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer p38 α -Inhibitoren. Der Bindungsmodus, der die DFG-*out*-Konformation durch π - π -Wechselwirkungen mit dem Phe169 des DFG-Motivs stabilisiert, zeigt einige Gemeinsamkeiten mit dem potenten p38 α -Inhibitor SB203580. Die Überlagerung der p38 α -Komplexstrukturen beider Liganden lieferte wertvolle Hinweise für die Optimierung der Bindungsaffinität von **5.6** (Abb. 5.2). Basierend auf diesen strukturellen Studien, sollte das 2-Phenylchinazolin-Gerüst weiterhin die Kerneinheit bilden. Analog zu SB203580 sollte allerdings der Phenylring in 4-Position mit einem Fluoratom derivatisiert werden, um den hydrophoben Bereich hinter dem Türsteherrest weiter auszufüllen. Des Weiteren sollte das Pyrazol durch größere Heterozyklen ausgetauscht werden, um dadurch den Liganden näher an die Scharnierregion zu positionieren, und die Ausbildung neuer Wasserstoffbrücken zu ermöglichen. Von diesen Variationen ausgehend, sollte eine fokussierte Substanzbibliothek synthetisiert und im weiteren Verlauf biochemisch und strukturbiologisch charakterisiert werden, um

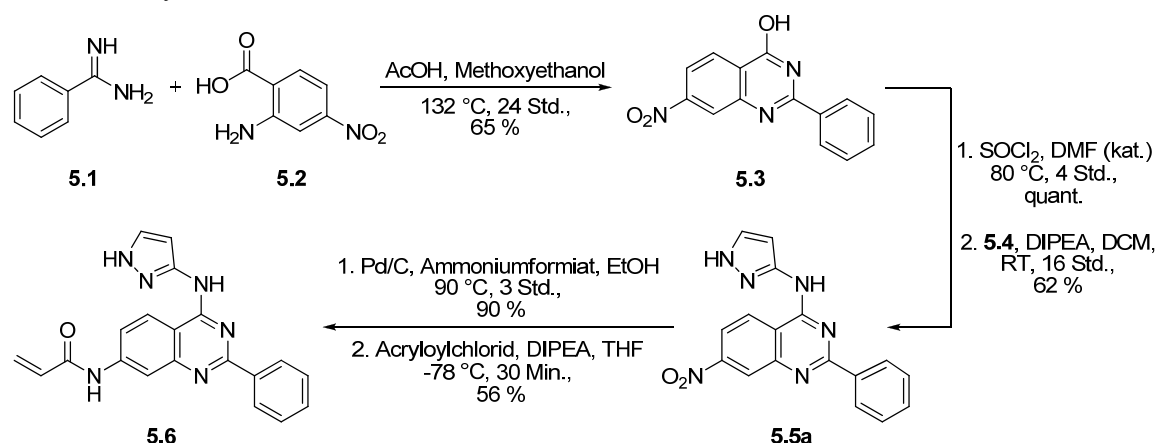
die Eigenschaften dieser Substanzklasse im Hinblick auf die Bindung an p38 α besser verstehen zu können.

5.4 Ergebnisse

5.4.1 Synthese

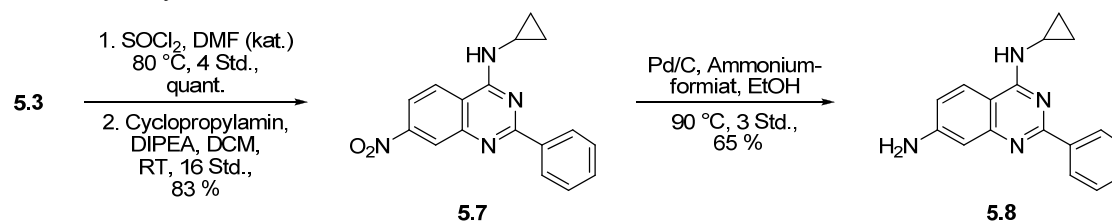
Das 2-Phenylchinazolin-Grundgerüst wurde aus Benzamidin und 2-Amino-4-nitro-Benzoessäure aufgebaut. Durch die Zugabe von Essigsäure wird *in situ* aus dem Imin ein Acetamid gebildet, welches bei der Cyclisierung eine gute Abgangsgruppe darstellt. So konnte das Grundgerüst **5.3** in 65 %-iger Ausbeute dargestellt werden. Der nächste Schritt beinhaltete die Aktivierung der 4-Position für eine nukleophile aromatische Substitution durch die Einführung eines Chloratoms, die mit Thionylchlorid und einer katalytischen Menge DMF erzielt wurde und quantitativ verlief. Im weiteren Verlauf der Synthese erfolgte die Substitution des Chloratoms mit 3-Aminopyrazol **5.4** unter basischen Bedingungen und einer Ausbeute von 62 %. Das Nitrochinazolin **5.5a** wurde mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator und Ammoniumformiat als Protonendonator zum Amin **5.5b** reduziert (Ausbeute 90 %), welches anschließend mit DIPEA in THF gelöst und mit Acryloylchlorid umgesetzt wurde. Der finale Ligand **5.6** wurde dabei in guten Ausbeuten isoliert.

Schema 5.1: Synthese des Inhibitors **5.6**.



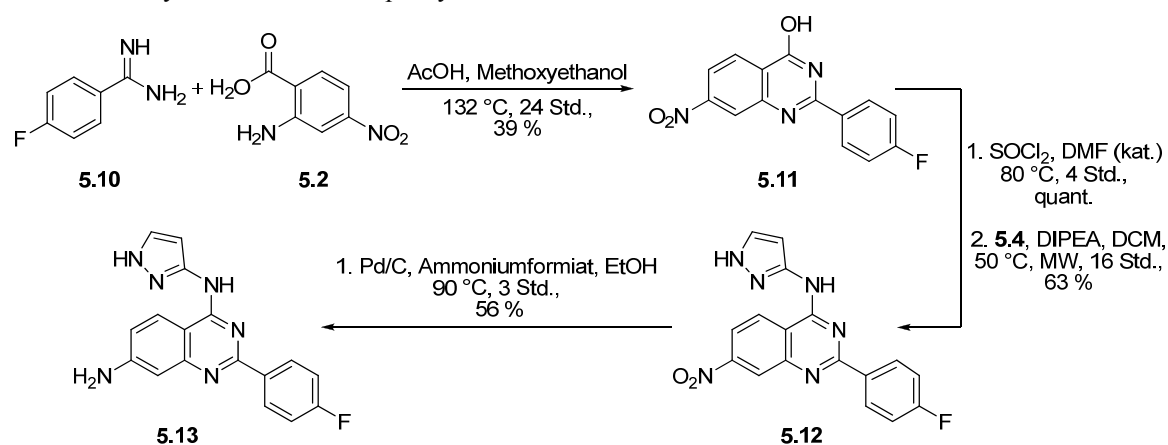
Die Synthese weiterer Derivate erfolgte analog zu der Synthese von **5.6**. Dabei wurde nach der Chlorierung von **5.3** Cyclopropylamin in DCM und DIPEA vorgelegt und in

einer nukleophilen Substitution mit dem 4-Chloro-7-nitro-2-phenylchinazolin in 83 %-iger Ausbeute gekuppelt. Abschließend erfolgte wie beschrieben die katalytische Reduktion der Nitro-Gruppe zum Amin. Des Weiteren wurde das 4-Chloro-7-nitro-2-phenylchinazolin mit 3-Aminopyridin zu 7-Nitro-2-phenyl-*N*-(pyridin-3-yl)chinazolin-4-amin **5.9** umgesetzt.

Schema 5.2: Synthese von **5.8**.

Neben dem 2-Phenylchinazolin-Grundgerüst sollten auch Derivate basierend auf 2-4-Fluorophenylchinazolin hergestellt werden. Diese Synthese erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die bereits vorgestellte Route für **5.6**. Lediglich im ersten Schritt wurde anstelle von **5.1** 4-Fluorobenzamidin eingesetzt. Als weiteres Derivat wurde 2-(4-Fluorophenyl)-7-nitro-*N*-(pyridin-3-yl)chinazolin-4-amin **5.9** dargestellt.

Schema 5.3: Synthese der 4-Fluorophenylchinazoline.



5.4.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Nachdem eine fokussierte Substanzbibliothek synthetisiert worden war, wurden die Verbindungen mit Hilfe des FLiK-Assays charakterisiert und ihre Bindungsaffinitäten

bestimmt. Dazu wurde auf das FLiK-System mit der Fluorophor-markierten Glycinreichen Schleife zurückgegriffen (Tabelle 5.1).*

Um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen, wurden die Substituenten des Chinazolinkerns an drei Positionen variiert (Abb. 5.3). An Position 7 wurden Nitro- und Amino-Gruppen eingesetzt, an 4-Position wurde das 3-Aminopyrazol durch 3-Aminopyridin oder Cyclopropylamin ausgetauscht. Die dritte Variation beinhaltete die Einführung eines Fluoratoms an den 2-Phenylring in *para*-Stellung.

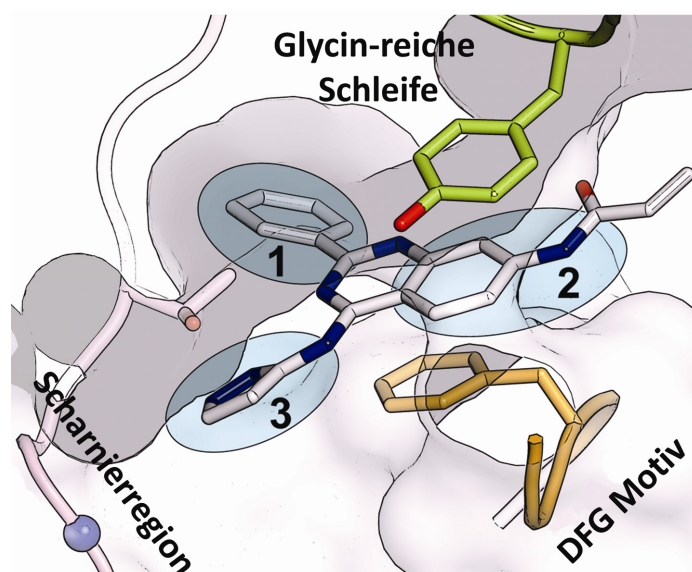


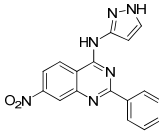
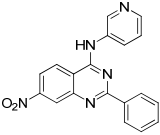
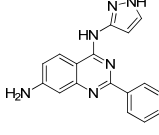
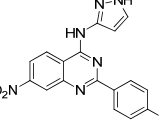
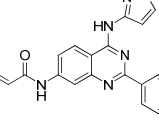
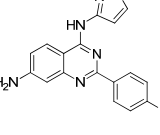
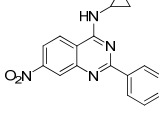
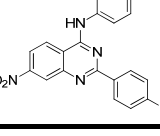
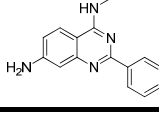
Abb. 5.3: **5.6** bindet in der ATP-Bindungsstelle von p38 α und bildet π - π -Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Phe169 und Tyr35 aus. Um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen, wurden an den Positionen 1, 2 und 3 (blau) die Substituenten variiert.

Aus den Struktur-Wirkungs-Beziehungen lassen sich für diese fokussierte Substanzbibliothek einige Trends ableiten. Grundsätzlich zeigen die Amine bessere Bindungsaffinitäten als ihre Nitro-Analoga. Diese Veränderung ist bei den Verbindungen **5.7** und **5.8** am deutlichsten ausgeprägt, wobei **5.8** eine 35-fach stärkere Affinität zu p38 α besitzt. Offensichtlich sind an dieser Position Wasserstoff-Donoren bevorzugt. Das Aminopyrazol an 4-Position führt zu Bindungsaffinitäten im niederen mikromolaren Bereich, auch wenn aus dem p38 α -**5.6**-Komplex hervorgeht, dass kein Kontakt zu der Scharnierregion geformt wird. Die Einführung des 3-Aminopyridins resultiert in deutlich schlechteren K_D -Werten (41 μ M für **5.9** und 12 μ M für **5.14**).

* Die Messungen wurden von Dr. Jeffrey R. Simard durchgeführt.

Daher scheint die Position des Pyridin-Stickstoffatoms nicht ideal zu sein, um mit der Scharnierregion zu interagieren. Die Verschiebung des Heteroatoms z. B. in die *para*-Stellung könnte bevorzugt sein. Interessanterweise weist **5.8** die deutlich stärkste Affinität auf, obwohl das Cyclopropylamin keine Wasserstoffbrücken zu der Scharnierregion bilden kann. Die Einführung des Fluoratoms in den 2-Phenylring hat keine signifikante Auswirkung auf die Affinitäten, auch wenn sie zu etwas höheren K_D -Werten bei **5.12** und **5.13** im Vergleich zu **5.5a** und **b** führt. Ein Austausch des Fluors durch ein Chlor wäre denkbar, um die hydrophobe Tasche hinter dem Türsteherrest effektiver auszufüllen und gleichzeitig vorteilhafte hydrophobe Wechselwirkungen zu erzielen.

Tabelle 5.1: Bindungsaffinitäten (K_D -Werte) der 2-Phenylchinazoline.

Verbindung	K_D [nM]		Verbindung	K_D [nM]	
	p38 α			p38 α	
5.5a		2417 \pm 317	5.9		40700 \pm 7400
5.5b		621 \pm 213	5.12		3337 \pm 2289
5.6		1030 \pm 180	5.13		1426 \pm 169
5.7		9800 \pm 3579	5.14		11570 \pm 4230
5.8		284 \pm 150			

5.4.3 Strukturbiologische Validierung der p38 α -Liganden

Um weitere Einblicke in den Bindungsmodus und die Eigenschaften der neuen Verbindungen zu erhalten, und um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklären zu

können, wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt. Diese führten zu der Kristallstruktur des potentesten Liganden **5.8** aus dieser Reihe im Komplex mit p38 α , die einen unerwarteten Bindungsmodus offenbarte (Abb. 5.4).^{*} Zunächst wurde ein zu **5.6** analoger Bindungsmodus erwartet, d.h. dass der Ligand in der ATP-Bindungstasche durch π - π -Wechselwirkungen mit der Seitenkette des Tyr35 der Glycin-reichen Schleife und der Seitenkette des Phe169 des DFG-Motivs stabilisiert wird. Überraschenderweise wies in der ATP-Stelle jedoch keine Elektronendichte auf die Bindung von **5.8** hin. Stattdessen wurde für diesen Liganden eine neue Bindungsstelle im C-terminalen Bereich der Kinase identifiziert – die Lipid-Bindungsstelle. Kürzlich wurde berichtet, dass kleinere pyrazolbasierte Fragmente, das Detergenz β -Octylglucopyranosid sowie verschiedene Fettsäuren ebenfalls diese Bindungsstelle belegen. Allerdings konnte ihr bislang keine biologische Relevanz zugeordnet werden.^{116,118}

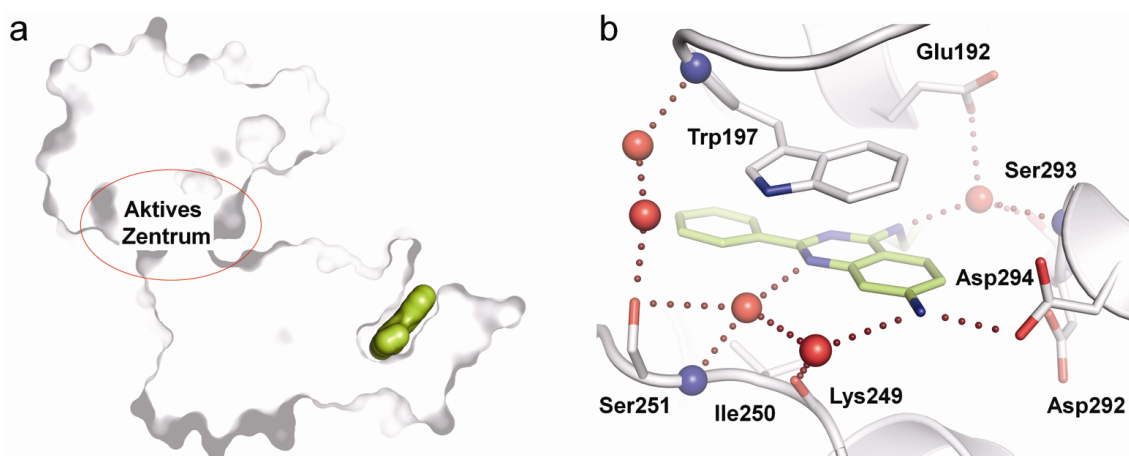


Abb. 5.4: Kristallstruktur von **5.8** (grün) im Komplex mit p38 α (grau). (a) Die Lipid-Bindungsstelle befindet sich am C-terminalen Ende der Kinase und wird vom Liganden **5.8** ausgefüllt. (b) **5.8** bindet in der Lipid-Bindungstasche und bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zu Asp294 aus. Zudem wird die Bindung durch ein dichtes Netzwerk aus wasservermittelten Wasserstoffbrücken sowie π - π -Interaktionen zwischen dem Chinazolinkern und der Seitenkette von Trp197 stabilisiert.

Der p38 α -**5.8**-Komplex wird durch eine Vielzahl von Interaktionen stabilisiert. Das primäre Amin in Position 7 des Chinazolins bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zu der Seitenkette von Asp294. Zusätzlich ist das Chinazolingrundgerüst über zwei vermittelnde Wasseratome an das Peptidrückgrat der Aminosäuren Lys249 und Ile250 gebunden. Des Weiteren ist die Seitenkette von Trp197 planar über dem Chinazolinkern angeordnet, so dass π - π -Wechselwirkungen zwischen diesen Strukturelementen als

^{*} Die Struktur wurde von Dr. Christian Grütter gelöst.

weitere Stabilisatoren des Protein-Ligand-Komplexes zu erwarten sind. Interessanterweise ist die Seitenkette von Ser251 über zwei Wasseratome mit dem Peptidrückgrat von Trp197 verbrückt. Dieses Netzwerk könnte die Konformation der α EF/ α F Schleife weiter festigen, und die Anordnung der Seitenkette von Trp197 unterstützen. Der Cyclopropyl-Substituent belegt eine hydrophobe Seitentasche, die durch vier Leucin-Seitenketten gebildet wird. Das sekundäre Amin, welches Cyclopropylrest und Chinazolingrundgerüst miteinander verbrückt, wechselwirkt über eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Glu192 und dem Peptidrückgrat von Leu291 und Asp292. Durch dieses dichte Netzwerk an Interaktionen wird der Inhibitor in der Lipid-Bindungsstelle gehalten und die Konformation der Kinase stabilisiert.

Nachdem durch den p38 α -**5.8**-Komplex die Bindungsstelle von **5.8** identifiziert werden konnte, sollte im weiteren Verlauf die Selektivität dieses Liganden untersucht werden. Aktivitätsmessungen hatten zuvor ergeben, dass die enzymatische Aktivität von p38 α durch **5.8** nicht gehemmt wird. Auch die Profilierung gegen 94 weitere Kinasen zeigte keine inhibitorische Aktivität von **5.8** (Abb. 5.5). Dieses interessante Selektivitätsprofil bildet zusammen mit dem neuartigen Bindungsmodus für diese Substanzklasse einen hervorragenden Ausgangspunkt für die Untersuchung der biologischen Relevanz der Lipid-Bindungsstelle in p38 α , wobei **5.8** als chemische Sonde eingesetzt werden könnte.

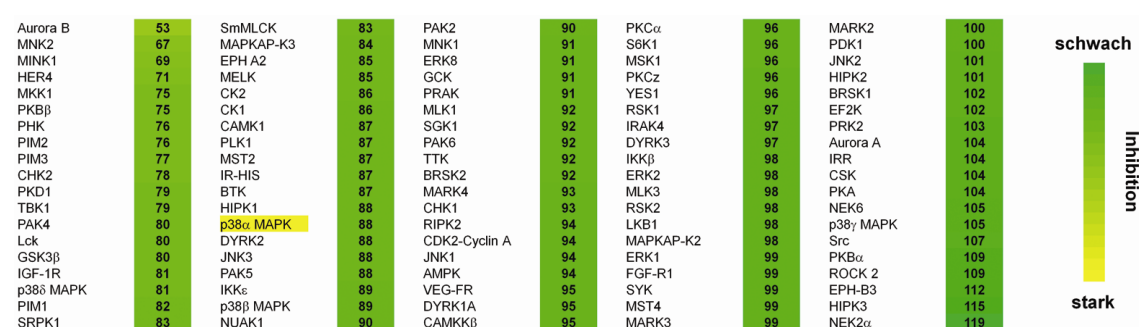


Abb. 5.5: Kinaseaktivitätsprofil von **5.8**. Die Profilierung wurde gegen 95 Kinasen bei einer Konzentration von 10 μ M unter Benutzung eines radioaktiven (33 P-ATP) Filter-Bindungsassays durchgeführt (National Centre for Protein Kinase Profiling, Dundee). Die Zahlenwerte repräsentieren die restliche Kinaseaktivität in %. Die Profilierung zeigt, dass das 2-Phenylchinazolin **5.8** die Aktivität von keiner der getesteten Kinasen potent inhibiert.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Ausgehend von einer Durchmusterungskampagne einer Sammlung kleiner organischer Moleküle, wozu der p38 α -FLiK-Assay verwendet wurde (*hier*: die Glycin-reiche Schleife wurde mit dem Fluorophor markiert⁶³), konnte das 2-Phenylchinazolin **5.6** als Binder der p38 α -Kinase ausgemacht werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Ligand π - π -Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Tyr35 (Glycin-reiche Schleife) und Phe169 (DFG-Motiv) ausbildet, und dadurch die DFG-*out*-Konformation stabilisiert. Diese Ergebnisse initiierten die Synthese weiterer Verbindungen, die im Hinblick auf ihre Bindungsaffinität zu p38 α optimiert wurden. Die Affinität von **5.8** konnte im Vergleich zu der Ausgangsverbindung **5.6** um das 4-fache gesteigert werden. Strukturbiologische Studien legten einen überraschenden Bindungsmodus von **5.8** offen. Der Ligand bindet in die Lipid-Bindungstasche von p38 α und wird dort durch ein Netzwerk an Wechselwirkungen stabilisiert. Vor diesem Hintergrund erscheint es umso erstaunlicher, dass die Bindung von **5.8** mit dem p38 α -FLiK-Assay detektiert wurde, bei dem die Glycin-reiche Schleife mit einem Fluorophor markiert wurde. Mit diesem System wird üblicherweise die Bindung von Liganden detektiert, die eine Konformationsänderung der Glycin-reichen Schleife bewirken oder direkt mit dieser wechselwirken. Somit ist es denkbar, dass die Bindung von **5.8** in der Lipid-Bindungsstelle die Konformation des aktiven Zentrums der Kinase beeinflusst, insbesondere der Glycin-reichen Schleife, und so eine Detektion von **5.8** ermöglicht.

Im Hinblick auf diese Resultate wurden im Rahmen einer Masterarbeit^{120*} in der AG Rauh weitere 2-phenylchinazolinbasierte Liganden mit dem Ziel entworfen und synthetisiert, die Affinität für die Lipid-Bindungsstelle zu verbessern und somit ideale Sondenmoleküle zur Erforschung der biologischen Relevanz der Lipid-Bindungsstelle zu erhalten. Darüber hinaus wurde der Einfluss dieser Verbindungen auf die enzymatische Aktivität von p38 α untersucht, wobei jedoch keine Veränderung der Aktivität beobachtet werden konnte, und die biologische Funktion der Lipid-Bindungsstelle in p38 α weiterhin unklar bleibt.

* Masterarbeit von Martin Termathe

Bekannte Studien zeigen, dass sowohl einige Liganden als auch verschiedene Fettsäuren an die Lipid-Bindungsstelle von p38 α binden, wie durch Protein-Kristallstrukturen als auch durch Oberflächenplasmonresonanz nachgewiesen werden konnte.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Kürzlich wurde von der Entwicklung einiger Liganden berichtet, die an einer analogen Bindungsstelle in Jnk-1 binden, und deren Aktivierung durch die vorgeschaltete Kinase MKK7 inhibieren. Zudem konnte auch eine Inhibition der p38 α -Aktivität durch einen Lipid-Binder gezeigt werden, was jedoch mit der zusätzlichen Bindung an die ATP-Bindungstasche begründet werden kann.¹²¹ Interessanterweise wurden von Collins *et al.* in Hepatocyten erhöhte Level phosphorylierter p38 α in Abhängigkeit einiger Fettsäuren detektiert.¹²² Vor diesem Hintergrund ist es vorstellbar, dass die Lipid-Bindungsstelle in p38 α in diesem Regulationsmechanismus eine wichtige Rolle spielt. Möglicherweise verändert die Bindung von Fettsäuren die Konformation von p38 α dahingehend, dass eine Phosphorylierung durch die vorgeschaltete Kinase MKK6 vereinfacht wird. In weiteren Versuchen könnte daher der Einfluss der Lipid-Binder auf die Aktivierung von p38 α untersucht werden.

5.6 Publikation

Teile dieser Ergebnisse wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

1. Simard J.R., Getlik M., Grütter C., Schneider R., Wulfert S., Rauh D., “Fluorophore-labeling of the glycine-rich loop as a method of identifying inhibitors which bind to active and inactive kinase conformations”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132: 4152-4160.

5.7 Aminoarylpyrimidine als allosterische Inhibitoren der Abl Kinase

Aminoarylpyrimidine stellen eine besonders interessante Klasse von Kinaseinhibitoren dar. 2006 präsentierten Adrian *et al.* GNF-2 als einen hochselektiven, allosterischen Bcr-Abl Inhibitor und konnten seine zelluläre Aktivität gegen Tumorzelllinien nachweisen, diese aber nicht mit aktivitätsbasierten Assays bestätigen.¹¹¹ Nachdem der Bindungsmodus von GNF-2 zunächst durch Mutations-Experimente untersucht wurde,¹¹¹ konnten Zhang *et al.* die Bindung von GNF-2 in der Myristoyl-Bindungsstelle von Abl anhand von Röntgenkristallstrukturen (zuvor auch durch NMR-Studien) bestätigen (Abb. 5.6).¹⁸

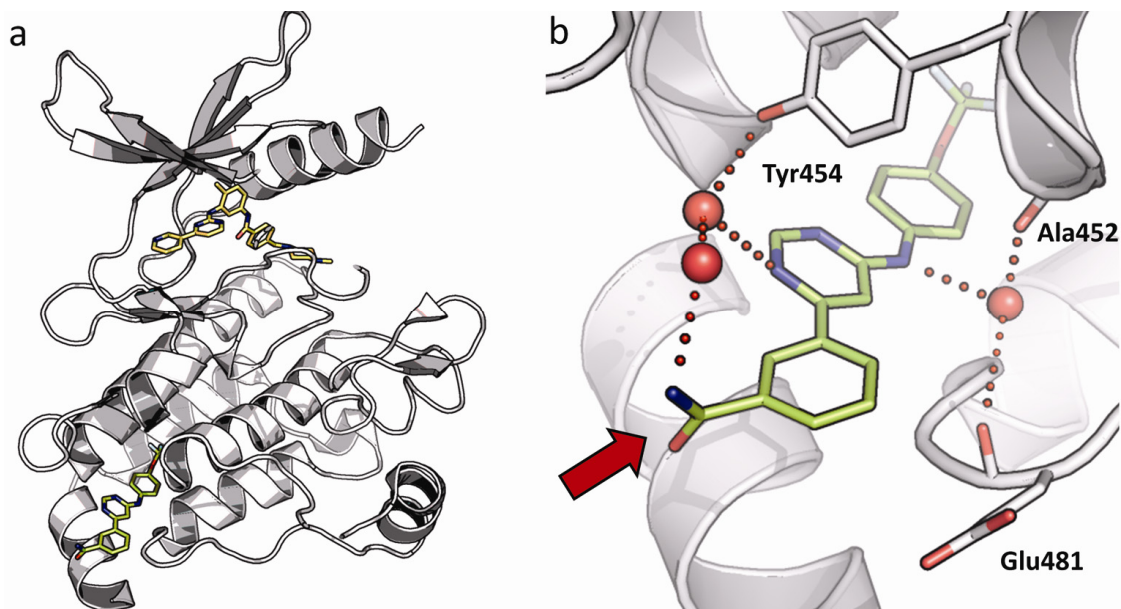


Abb. 5.6: GNF-2 und Imatinib im Komplex mit Abl (PDB-Code: 3K5V). (a) Imatinib (gelb) bindet in der ATP-Bindungstasche sowie der angrenzenden allosterischen Stelle. Gleichzeitig belegt GNF-2 (grün) die Myristoyl-Bindungsstelle in der C-terminalen Domäne. Die Kinase nimmt dabei die DFG-out-Konformation ein. (b) Neben einer essentiellen Wasserstoffbrücke zu dem Peptidrückgrat der Aminosäuren Ala452 und Glu481, die über ein Wassermolekül (rote Kugeln) vermittelt wird, bildet der Ligand überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Leu351, Ile521 und Val525 aus. Das primäre Amid des Liganden ist zum Lösungsmittel gerichtet (roter Pfeil). Diese Position bietet eine Möglichkeit zur Derivatisierung des Liganden.

Weitere Studien mit GNF-2 bzw. GNF-5 (ein GNF-2-Derivat mit gesteigerter Löslichkeit) haben gezeigt, dass in Kombination mit einem Typ-II-Inhibitor (Nilotinib oder Imatinib) Wirkstoffresistenzen umgangen werden können. Darüber hinaus kann die mit der Mutation des Türsteherrestes assoziierte Resistenz in einem T315I Bcr-Abl

Mausmodell durch die Kombinationstherapie umgangen werden, so dass es zu einer vollständigen Krankheitsremission kommt. Die verschiedenen Wirkorte und Bindungsmechanismen der kombinierten Inhibitoren unterdrücken zudem die Entstehung solcher Resistenzen.¹⁸

5.8 Zielsetzung

Nachdem gezeigt wurde, dass GNF-2 bzw. GNF-5 effektive Bcr-Abl Inhibitoren sind, und dass die Myristoyl-Bindungsstelle in Bcr-Abl eine für die Inhibition der Kinasefunktion relevante Stelle ist, motivierten zwei Fragestellungen die weiteren Arbeiten: a) Welches sind die primären Zielproteine von GNF-2 in der Zelle bzw. besitzen auch andere Kinasen adressierbare Lipid-Bindungsstellen und b) können Verbindungen mit alternativen chemischen Strukturen identifiziert werden, die an die Myristoyl-Bindungsstelle binden? Als Ausgangspunkt für die Untersuchungen dieser Fragen sollten GNF-2 sowie GNF-5 als Referenzverbindungen hergestellt werden. Zudem sollte das *N*-methylierte GNF-2-Derivat bereitgestellt werden und als negative Referenz dienen. Die fokussierte Sammlung sollte durch das Carbonsäure-Analogon von GNF-2 komplettiert werden, welches ein ideales Vorläufermolekül für die Synthese chemischer Sonden darstellt (Abb. 5.7).

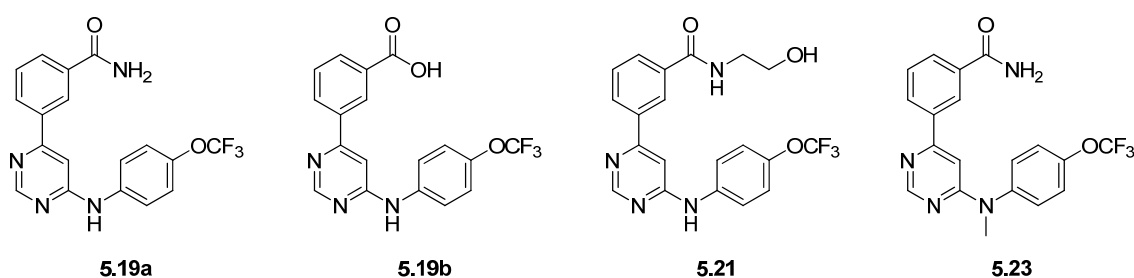


Abb. 5.7: Struktur von GNF-2 (**5.19a**) und der Derivate **5.19b**, GNF-5 (**5.21**) und Me-GNF-2 (**5.23**).

5.9 Ergebnisse

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, sollte für GNF-2 eine Profilierung seiner zellulären Zielproteine mit der „Cellular Target ProfilingTM“-Technologie von Kinaxo durchgeführt werden. Diese Technologie beruht auf der Kombination von Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie, um Zielproteine kleiner

organischer Moleküle aus Zelllysaten zu identifizieren sowie die zugehörigen Bindungsaffinitäten zu bestimmen. Dazu wird das Proteom einer Zelllinie mit der SILAC-Technologie¹²³ durch isotopenmarkierte Aminosäuren verändert und der zu untersuchende Ligand über einen Linker an Sepharoseperlen immobilisiert. Im weiteren Verlauf können nach Inkubation der Zelllysate mit dem immobilisierten Liganden die gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und über LC-MS/MS-Messungen identifiziert werden. Aus der Analyse werden Bindungs- sowie Verdrängungskonzentrationen bestimmt, die über die Cheng-Prusoff-Gleichung zum K_D -Wert für den freien Liganden führen.¹²⁴

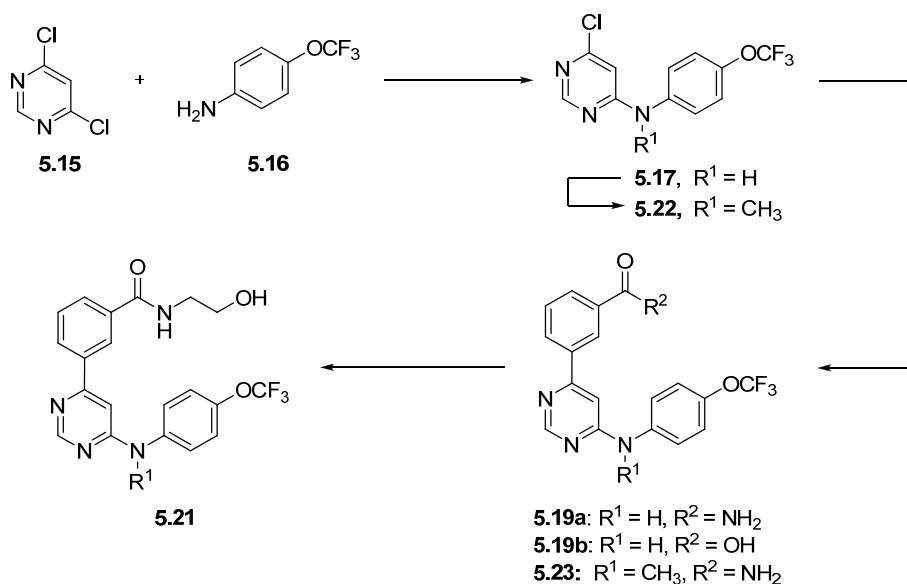
Da für die Anwendung dieser Technologie die zu profilierenden Verbindungen über funktionelle Gruppen zunächst an Linker gebunden und später an Sepharoseperlen immobilisiert werden, musste die ideale Position für eine Immobilisierung von GNF-2 identifiziert werden. Anhand der Proteinkristallstruktur von Abl im Komplex mit GNF-2 stellte sich schließlich die Position des Amids als besonders geeignet heraus, da der Inhibitor mit dieser Gruppe aus der Bindungstasche in Richtung des Lösungsmittels gerichtet ist (Abb. 5.6). Um die problemlose Derivatisierung an dieser Position zu ermöglichen, wurde das Carbonsäure-Derivat **5.19b** von GNF-2 synthetisiert. Die Carbonsäure-Funktionalität sollte weitere Modifizierungen mit Linkermolekülen vereinfachen, die über terminale Amine oder Alkohole verfügen. So wurde mit **5.19b** ein ideales Vorläufermolekül für die Synthese chemischer Sonden synthetisiert.

Neben der Bereitstellung des Carbonsäure-Derivats **5.19b** wurden Referenzverbindungen für die Validierung neuer Assaysysteme benötigt. Zudem wurde für die Bestimmung zellulärer Bindungsaffinitäten mit der „*Cellular Target Profiling*™“-Technologie der freie, ungebundene Ligand benötigt. Daher wurden GNF-2 und GNF-5 sowie das *N*-methylierte GNF-2-Derivat synthetisiert. Me-GNF-2 diente dabei als negative Referenz, da die Methylgruppe die Ausbildung der essentiellen Wasserstoffbrücke zu dem Peptidrückgrat der Kinase verhindert und eine effektive Bindung des Liganden in der Myristoyl-Bindungstasche nicht möglich ist (Abb. 5.6).¹¹¹

5.9.1 Syntheseroute für GNF-2 und einige Analoga

Für die Synthese von GNF-2 sowie dessen Derivate wurde eine bereits veröffentlichte lineare Synthesestrategie verfolgt.¹¹¹ 4,6-Dichloropyrimidin **5.15** und Anilin **5.16** werden in einer nukleophilen Substitution miteinander verknüpft. Das erhaltene sekundäre Amin **5.17** wird entweder direkt in einer Suzuki-Kreuzkupplung eingesetzt, oder alternativ am Stickstoff methyliert und dann für die Suzuki-Kupplung verwendet. Die Kupplung mit Phenylboronsäuren führt zur Darstellung der Biphenylstrukturen **5.19a, b** und **5.22**. Die weitere Umsetzung von **5.19b** mit Ethanolamin führt zu Derivat **5.21**.¹⁸

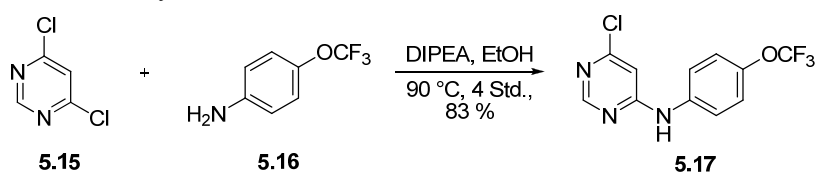
Schema 5.4: Syntheseroute für das Aminoarylpyrimidin GNF-2 (**5.19a**) und seine Derivate.



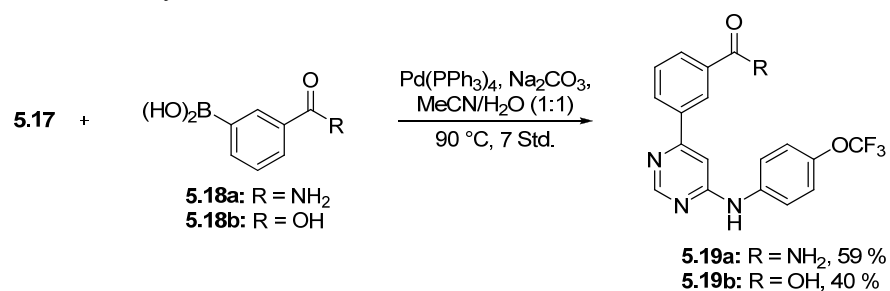
5.9.2 Synthese von GNF-2 und weiterer Analoga

Die Synthese von **5.19a** und den Derivaten wurde in Anlehnung an die literaturbekannte Synthese durchgeführt.^{18,111} In einer nukleophilen Substitution (Ar-S_N) wurden unter basischen Bedingungen das Anilin **5.16** und das 4,6-Dichloropyrimidin **5.15** verknüpft.

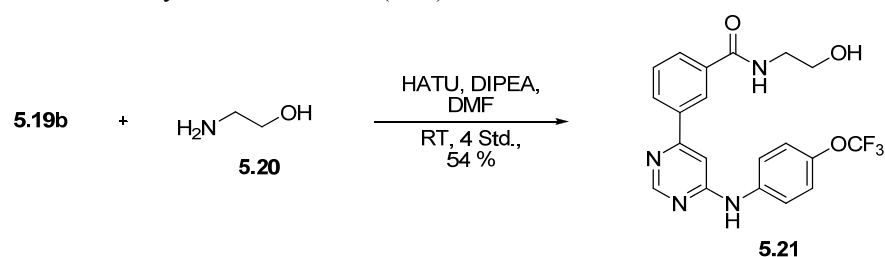
Schema 5.5: Synthese von **5.17**.



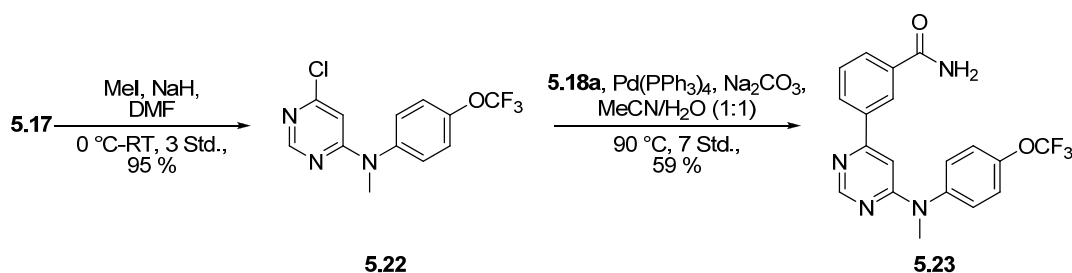
Die Darstellung der Biphenylstruktur von **5.19a** und **b** erfolgte über die Verknüpfung des Pyrimidins **5.17** mit den Phenyl-Boronsäuren **5.18a** und **b** mittels Suzuki-Kupplung. Dazu werden 0.05 mol % Pd(PPh₃)₄ als Katalysator, Na₂CO₃ als Base und Acetonitril/Wasser (1:1) als Lösungsmittel eingesetzt. **5.19a** und **b** wurden mit guten Ausbeuten erhalten.

Schema 5.6: Synthese von **5.19a** und **b**.

Die weitere Umsetzung von **5.19b** mit Ethanolamin unter Peptidkuppelungsbedingungen mit HATU und DIPEA in DMF führte in guten Ausbeuten zu dem Inhibitor GNF-5 (**5.21**) (Schema 5.7).

Schema 5.7: Synthese von GNF-5 (**5.21**).

Des Weiteren wurde die methylierte Variante von GNF-2 synthetisiert und diente als negative Referenzverbindung. Dazu wurde das sekundäre Amin **5.17** zunächst mit NaH deprotoniert und nachfolgend mit Methyljodid mit 95 %-iger Ausbeute umgesetzt. Abschließend wurde Pyrimidin **5.22** unter den zuvor beschriebenen Bedingungen in einer Suzuki-Kupplung mit der Boronsäure **5.18a** verknüpft und führte zu Me-GNF-2 **5.23** mit einer Ausbeute von 59 %.

Schema 5.8: Synthese von Me-GNF-2 (**5.23**).

5.9.3 Verwendung der synthetisierten Verbindungen

GNF-2 und dessen Derivate wurden in erster Linie für die Entwicklung neuer Assaysysteme eingesetzt. So konnte das Carbonsäure-Derivat **5.19b** zur Synthese einer chemischen Sonde verwendet werden, die in einem auf Verdrängung basierendem Fluoreszenzpolarisationsassay zum Einsatz kam. Dazu wurde **5.19b** über einen Linker an den Fluorophor Fluoreszein gekuppelt.¹²⁵ Des Weiteren konnte die biologische Aktivität von GNF-2 nachgewiesen werden, indem die Inhibition der enzymatischen Aktivität der Abl Kinase (Konstrukt mit katalytischer und regulatorischer Domäne) gezeigt werden konnte.¹²⁵ Darüber hinaus dienen die Derivate von GNF-2 der Evaluierung eines alternativen Assaysystems, das auf der FLiK-Technologie beruht.¹²⁶

5.10 Zusammenfassung

Die Aminoarylpyrimidine um GNF-2 stellen eine interessante Substanzklasse dar. Sie belegen die Myristoyl-Bindungsstelle der Abl Kinase und inhibieren deren enzymatische Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Vertreter dieser Klasse synthetisiert. Neben den Inhibitoren GNF-2 (**5.19b**), Me-GNF-2 (**5.23**) und GNF-5 (**5.21**), die als wertvolle Referenzverbindungen zur Validierung neuer Assaysysteme eingesetzt wurden, diente das Carbonsäure-Derivat **5.19b** der Entwicklung eines Fluoreszenzpolarisationsassays.¹²⁵ So wurde mit der erfolgreichen Synthese der Aminoarylpyrimidine ein guter Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Assaysysteme geschaffen, die in Zukunft der Identifizierung neuer bioaktiver Moleküle dienen sollen, welche die Myristoyl-Bindungsstelle adressieren und die enzymatische Aktivität der Abl-Kinase modulieren.

6 Entwicklung kovalenter EGFR-Inhibitoren

6.1 Einleitung

Der Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gehört zu der Familie der EGF Rezeptortyrosinkinasen, die aus EGFR (ErbB1/HER1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) besteht. EGFR setzt sich aus einer extrazellulären, einer transmembranären sowie einer intrazellulären Domäne zusammen. Letztere gliedert sich in die Tyrosinkinasedomäne und den Autophosphorylierungsbereich (C-terminale Domäne). EGFR wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert – vornehmlich in Epithel-, Mesenchym- und Nervenzellen.¹²⁷ Die EGFR-Aktivität wird durch Liganden aus der Familie der Epidermalen-Wachstumsfaktoren (EGF) reguliert, die sich ihrerseits in drei Gruppen gliedert: a) die EGFR-spezifischen EGF, TGF- α und Amphiregulin, b) Betacellulin, Heparin-bindender EGF und Epiregulin, die an EGFR und HER4 binden und c) die Neureguline, die HER3 und HER4 modulieren.¹²⁷ Die Bindung dieser Liganden an die extrazelluläre Domäne induziert eine Konformationsänderung der sogenannten Dimerisierungsschleife, wodurch die Dimerisierung der Rezeptoren ermöglicht und stabilisiert wird.¹²⁷ Es werden sowohl Homo- als auch Heterodimere beobachtet, wobei letztere mit Vertretern aus der EGFR-Familie oder auch mit anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren, z. B. mit dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor (IGFR), gebildet werden. Die Dimerisierung führt aufgrund der intrinsischen Kinaseaktivität zu einer Transphosphorylierung der zytoplasmischen C-terminalen Domäne beider Rezeptoren, was in einer gesteigerten Kinaseaktivität resultiert. Die phosphorylierten Tyrosine dienen als Bindungsstellen für sogenannte Adaptermoleküle, die eine Vielzahl komplexer zellulärer Signalübertragungen regulieren.¹²⁸ In erster Linie werden ausgehend von EGFR der Ras/Raf/Mek/Erk-, der PI3K/Akt-, der PLC γ /PKC- sowie der STAT-Signalweg aktiviert, wodurch Zellproliferation, Zellbeweglichkeit und Zellüberleben hochreguliert werden.¹²⁹ Die Inaktivierung von EGFR wird durch die Dephosphorylierung durch Phosphotyrosin-Phosphatasen bewirkt, oder durch die Internalisierung und den anschließenden Abbau im Lysosom erreicht.¹²⁸

In den 80er Jahren wurde die Überexprimierung von EGFR in einer Vielzahl von Epithelkarzinomen beobachtet, so dass eine Dysregulierung der EGFR Expression mit der Entstehung von humanen Karzinomen in Verbindung gebracht wurde.¹²⁷ Heute ist klar, dass EGFR eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt. Eine gesteigerte Aktivität von EGFR initiiert durch anhaltende Signalübertragung unkontrollierte Zellproliferation, Antiapoptose, Angiogenese und Metastasierung – grundlegende Vorgänge für Tumorentstehung und -wachstum.¹²⁸ Viele Faktoren können zu dieser erhöhten EGFR-Aktivität führen, wie z. B. die Überexpression und/oder die Amplifikation des EGFR-Gens, und sind häufig spezifisch für die jeweilige Krebserkrankung. Eine erhöhte Expression von Liganden wie EGF oder TGF α kann zu der Entstehung von autokrinen Schleifen führen und eine Hyperaktivierung nachgeschalteter Signalwege bewirken.⁷⁹ Des Weiteren werden Mutationen in der Kinasedomäne beobachtet, wie z. B. die L858R-Mutation, die mit einer gesteigerten Kinaseaktivität einhergeht.¹³⁰ Ein weiterer Mechanismus für die onkogene Aktivierung von EGFR ist die Heterodimerisierung mit HER2, die eine länger anhaltende Signalübertragung zur Folge hat.¹²⁸ Auch die fehlregulierte Inaktivierung des Rezeptors kann zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen.¹²⁸

Die offensichtliche Verknüpfung von EGFR mit einer Reihe von Krebserkrankungen (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC), Darmkrebs, Kopf-Hals-Krebs, Pankreaskarzinom)¹²⁷ führte zu der Entwicklung zielgerichteter Therapeutika gegen EGFR, bei der in erster Linie zwei Ansätze verfolgt wurden: Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne von EGFR gerichtet sind, und kleine organische Moleküle, die die Kinaseaktivität hemmen.¹²⁷ Mit der Zulassung von Gefitinib (2003) als Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) gegen NSCLC – der Inhibitor wurde im Schnellverfahren von der FDA zugelassen – und Cetuximab (2004) als monoklonalen Antikörper gegen metastatischen Darm- und Kopf-Halskrebs führten beide Ansätze zu erfolgreichen Therapeutika. Bis heute haben insgesamt drei TKI und zwei monoklonale Antikörper, die zielgerichtet die Aktivität von EGFR hemmen, die Marktzulassung erreicht.

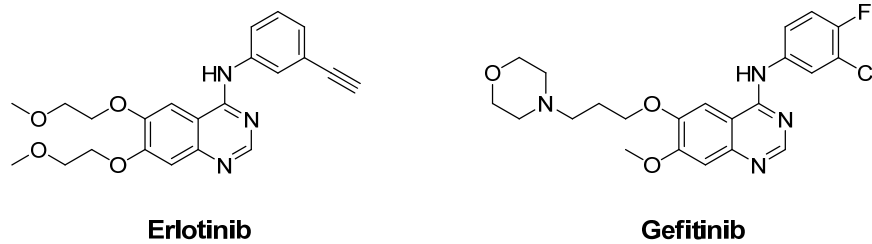


Abb. 6.1: Chemische Strukturen der beiden reversiblen EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib.

Mit den TKI Erlotinib und Gefitinib befinden sich zwei reversible ATP-kompetitive Inhibitoren auf dem Markt, die gegen NSCLC eingesetzt werden und gezielt die Tyrosinkinaseaktivität von EGFR inhibieren, wodurch in den Tumorzellen die Zellproliferation, Angiogenese und Antiapoptose gehemmt wird. Trotz einiger vielversprechender Erfolge bei der Behandlung mit diesen TKI, mit denen ein deutlicher Tumorrückgang in den ersten 6-12 Monaten beobachtet wurde, ergaben klinische Studien lediglich eine Gesamterfolgsrate von 10-20%.¹³⁰ Spätere Untersuchungen der Patientenpopulation haben ergeben, dass bestimmte Mutationen des EGFR die Erfolgsrate für die Behandlung drastisch steigern. Insbesondere die Deletionsmutationen der konservierten ELREA Aminosäuresequenz in Exon 19, und die L858R Punktmutation in der Aktivierungsschleife der Kinase sensibilisieren die Tumore gegenüber den TKI Erlotinib und Gefitinib und führen bei ausgewählten Patientenpopulationen zu Ansprechraten von über 80%.¹³⁰ Die Sensitivität von EGFR gegenüber Inhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib dient damit als wichtiger Marker für die Prognose von Patienten, die im Rahmen der zielgerichteten Therapie mit Kinaseinhibitoren behandelt werden. Interessanterweise erhöhen diese Mutationen die EGFR-Kinaseaktivität und führen zu einer Hyperaktivierung der nachgeschalteten Signalwege, wodurch EGFR jedoch gerade seinen onkogenen Charakter erhält.⁷⁹

Nachdem die genetischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Behandlung mit Erlotinib oder Gefitinib in Form von sensibilisierenden Mutationen der Kinasedomäne identifiziert worden waren – zweifellos ein Meilenstein bei der Behandlung des NSCLC – konnten vielversprechende therapeutische Erfolge erzielt werden, wobei Patienten bis zu drei Jahre auf eine Behandlung mit diesen TKI ansprachen. Allerdings setzte bei der Mehrzahl der Patienten bereits nach 6-8 Monaten ein Fortschreiten der Krankheit wieder ein. Tumorgewebeproben von rückfälligen Patienten führten

schließlich bei etwa 50 % der untersuchten Proben zur Identifizierung einer sekundären Mutation in Exon 20, bei der es an der Türsteherposition zum Austausch der Aminosäure Threonin durch Methionin (T790M) kommt.^{79,130} Die sperrige Methionin-Seitenkette an dieser Position beeinträchtigt nicht nur die Bindung der TKI,¹⁴ sondern erhöht gleichzeitig die ATP-Affinität der Kinase und führt so zu einer Wirkstoffresistenz gegenüber den TKI Erlotinib und Gefitinib.¹⁵ Spätere Studien ergaben, dass diese Mutation bereits vor der Behandlung mit TKI vorliegt, und die Gabe von TKI eine Selektion für diese Mutation bewirkt.¹²⁷ Ein weiterer Resistenzmechanismus als Folge der Behandlung mit TKI, der gemeinsam mit der T790M-Mutation über 60 % der erlangten Wirkstoffresistenzen ausmacht, ist die Amplifikation des MET Onkogens, die zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs führt.¹²⁹ Neben den erlangten Mutationen als Folge einer TKI-Therapie, beeinflussen weitere Mechanismen die Wirksamkeit der TKI. Zu den sogenannten primären Resistenzen werden KRAS-Mutationen, die eine anhaltende Aktivierung des nachgeschalteten MAPK-Signalwegs bewirken, EGFR-Deletionsmutationen, die eine konstitutive Aktivierung von EGFR zur Folge haben, oder auch der Verlust von PTEN, der in einer Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs resultiert, gezählt.^{34,127}

Aufgrund der beobachteten Wirkstoffresistenzen in der zielgerichteten Krebstherapie mit den TKI Erlotinib und Gefitinib, ist die Entwicklung alternativer Therapien unausweichlich. So wurden TKI Inhibitoren der zweiten Generation entwickelt, die entweder einen „*Multitarget*“-Ansatz verfolgen und beispielsweise wie Lapatinib neben EGFR auch HER2 inhibieren, oder die kovalent an EGFR binden und die Kinaseaktivität hemmen.¹²⁷ Kovalente Kinaseinhibitoren basieren überwiegend auf einem Chinolin- oder Chinazolinkern, wie auch die sich in der klinischen Erprobung befindenden HKI-272 und BIBW-2992 (Abb. 6.2),^{131,132} wobei letzterer wie Lapatinib EGFR und HER2 dual-spezifisch inhibiert.¹³² Kovalente EGFR Inhibitoren besitzen ein reaktives Elektrophil (Michael-Akzeptor) und können das Thiol von Cys797 alkylieren, das am C-terminalen Ende der Scharnierregion von EGFR lokalisiert ist (Abb. 6.2). *In vitro*-Studien bestätigten zunächst die Überlegenheit der kovalenten Inhibitoren im Hinblick auf die Inhibition der wirkstoffresistenten EGFR T790M-Variante.¹³²

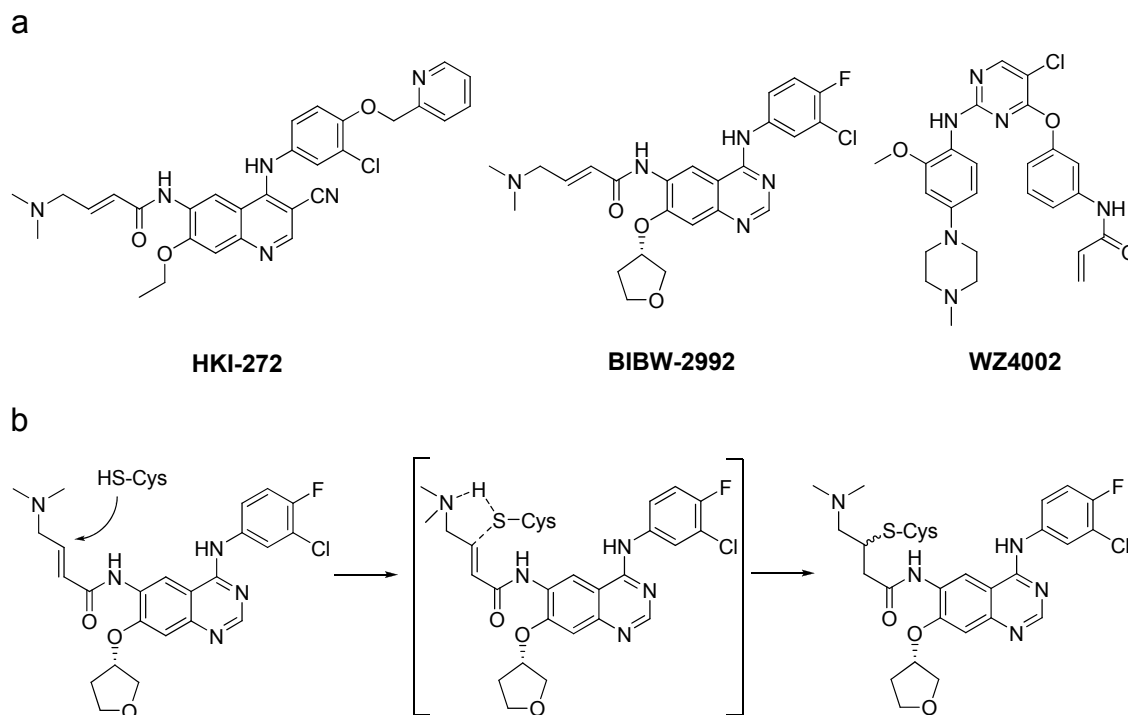


Abb. 6.2: (a) Chemische Strukturen der kovalenten Inhibitoren HKI-272, BIBW-2992 und WZ4002. (b) Schematische Darstellung einer Michael-Addition der Thioleinheit eines Cysteins an BIBW-2992. Der von Wissner und Mansour vorgeschlagene Mechanismus sieht eine intramolekulare basenkatalysierte Michael-Addition vor, wobei die Löslichkeits-vermittelnde Gruppe als Base dient.¹³³

Allerdings zeigen Studien auch mit diesen Inhibitoren in zellulären Systemen und Mausmodellen eine eher moderate Wirksamkeit bei klinisch relevanten Konzentrationen.^{23,130} Vor diesem Hintergrund entwickelten Jänne *et al.* den kovalenten Inhibitor WZ4002 gezielt gegen die wirkstoffresistente T790M-Türstehermutation in EGFR. Dieser Inhibitor hemmt *in vitro* die Aktivität der T790M-Variante bis zu 100-fach stärker als die des Wildtyps und ist insbesondere in T790M-Mausmodellen den chinazolinbasierten kovalenten Inhibitoren überlegen.²¹ Dieser Ansatz des Inhibitor-Designs gilt daher als besonders aussichtsreich, um aufkommende Wirkstoffresistenzen effektiv zu umgehen.

6.2 Motivation und Zielsetzung

In einer Durchmusterungskampagne von 1500 kleinen organischen Molekülen gegen 120 genetisch charakterisierte Tumorzelllinien des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms wurde ein interessantes Wirkprofil für das 2-Phenylchinazolin **5.6** ermittelt. Dabei wurde insbesondere das Wachstum EGFR-abhängiger Zelllinien

inhibiert, die u.a. durch wirkstoffresistente EGFR-Varianten charakterisiert sind. In einer sekundären Charakterisierung wurde das Wachstum von vier unterschiedlichen Zelllinien in Abhängigkeit steigender Inhibitorkonzentrationen untersucht. Dabei wurden die folgenden Zelllinien eingesetzt: a) A549, eine Zelllinie aus einem Lungenkarzinom, die nicht sensitiv gegenüber TKI ist; b) PC9 (EGFR del1), eine Zelllinie mit einer Deletionsmutante in Exon 19 von EGFR, die sensitiv gegenüber TKI ist; c) H3255 (EGFR L858R) eine TKI-sensitive Zelllinie mit der L858R-Mutation in der Aktivierungsschleife von EGFR und d) H1975 (EGFR T790M/L858R), eine Zelllinie, die sowohl die L858R- sowie die Wirkstoffresistenzmutation T790M in EGFR trägt.

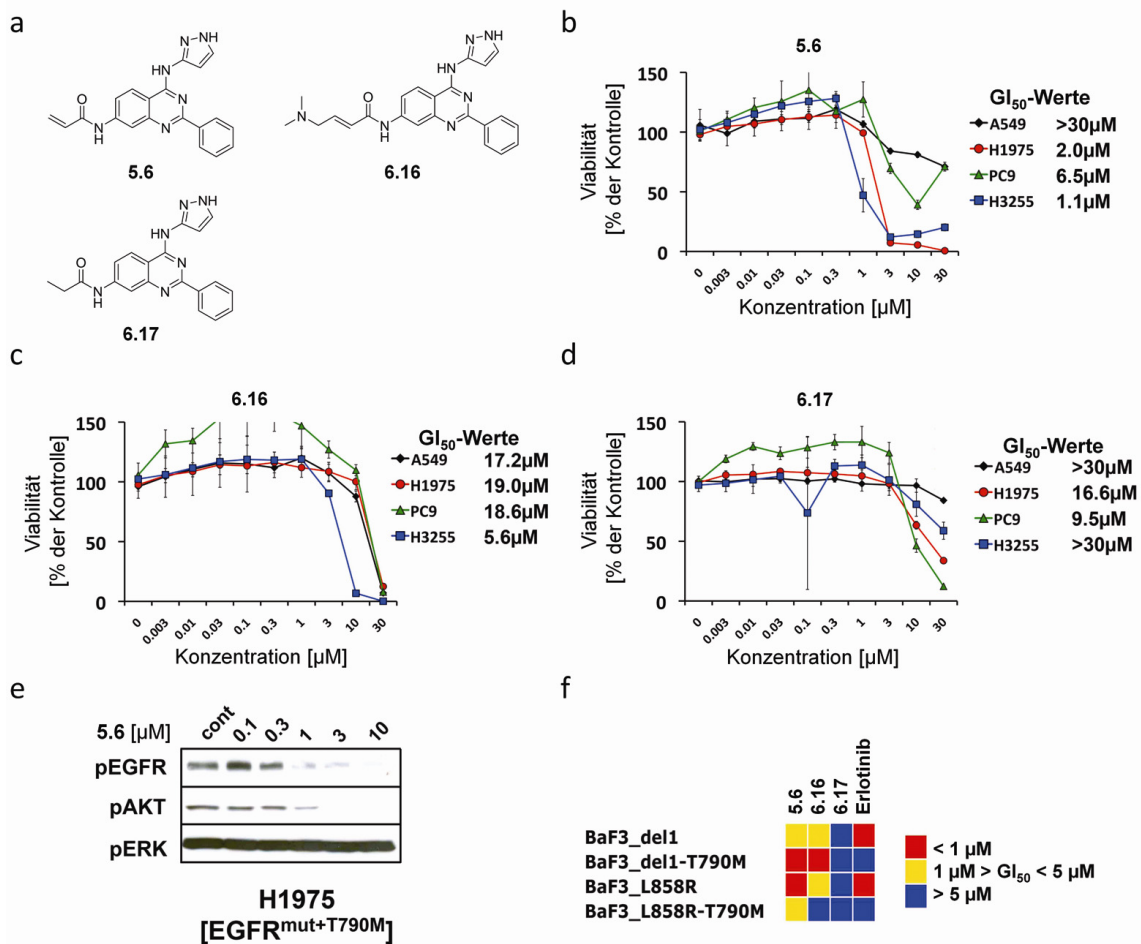


Abb. 6.3: (a) Chemische Strukturen der getesteten Inhibitoren. (b-d) Inhibition (GI₅₀-Werte) des Wachstums verschiedener Tumorzelllinien in Abhängigkeit steigender Inhibitorkonzentrationen. (e) pEGFR-, pAkt- und pERK-Level sind konzentrationsabhängig von **5.6** dargestellt. (f) Inhibition (GI₅₀-Werte) des Wachstums verschiedener EGFR-abhängiger BaF3-Zelllinien.

Interessanterweise inhibiert **5.6** nicht nur das Wachstum der TKI-sensitiven H3255-Zellen, sondern auch der wirkstoffresistenten H1975-Zellen mit einer vergleichbaren Konzentration von 2 μ M. Weiterhin kann auch die Inhibition der Phosphorylierung von EGFR durch **5.6** in H1975-Zellen gezeigt werden (Abb. 6.3). Das reversible Analogon von **5.6** sowie das Derivat **6.16**, das mit einem reaktiveren Elektrophil ausgestattet ist, zeigen deutlich schlechtere Aktivitäten bei der Inhibition des Zellwachstums (Abb. 6.3).^{*†}

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte die Verbindung **5.6** als Ausgangspunkt für die Entwicklung von kovalenten EGFR Inhibitoren dienen, die auf dem 2-Phenyl-Chinazolingrundgerüst oder alternativ auf einem Pyrimidinkern aufgebaut werden sollten. Dabei wurde das Ziel verfolgt, Inhibitoren zu entwickeln, die die klinisch relevante Türstehermutation in EGFR umgehen können. Das Design weiterer Derivate sollte sich auf strukturelle Studien von **5.6** im Komplex mit cSrc stützen. Neben den kovalenten Inhibitoren sollten ihre reversiblen Analoga als Kontrollverbindungen hergestellt werden. Nach der erfolgreichen Synthese sollte die Aktivität der Verbindungen gegenüber den Proteinen EGFR Wildtyp (WT), EGFR L858R und EGFR T790M/L858R biochemisch validiert werden. In Kooperation mit der Forschungsgruppe um PD Dr. Roman Thomas (MPI Köln) sollten die Verbindungen dann auf ihre zelluläre Aktivität getestet werden.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Strukturbasiertes Design kovalenter EGFR-Inhibitoren

2005 publizierten Pierce *et al.* ein 2-Phenylchinazolin als potenten GSK3-Inhibitor,¹¹⁹ auf dessen Struktur **5.6** basiert. Dabei bildet die Pyrazolamineinheit des Inhibitors drei Wasserstoffbrücken zu dem Peptidrückgrat der Scharnierregion aus, die für die Bindung dieser Substanzklasse essentiell sind. Der Inhibitor nimmt somit einen bis dahin für Chinazoline einzigartigen Bindungsmodus an. Andere bekannte Chinazoline binden üblicherweise durch eine Wasserstoffbrücke über das N1 Stickstoffatom an die

* Die Durchmusterung und die anschließende zelluläre Validierung wurden von Dr. Martin Sos in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Roman Thomas am MPI Köln durchgeführt.

† Die Derivate **6.16** sowie **6.17** wurden mit Hilfe von Martin Termathe hergestellt.

Scharnierregion der Kinase. Zwar wurden Atomkoordinaten des Liganden im Komplex mit GSK3 bis heute nicht in der PDB-Datenbank veröffentlicht, allerdings ist der Komplex mit der Calmodulin-abhängigen Protein Kinase 1D (CAMK1D) publiziert und zeigt in der ATP-Bindungstasche einen analogen Bindungsmodus. Um Informationen über den Bindungsmodus von **5.6** in EGFR zu erhalten, wurde für strukturbiochemische Untersuchungen auf cSrc als ein bereits validiertes Modellsystem für die wirkstoffresistente Variante von EGFR zurückgegriffen. Dabei wurde eine Variante von cSrc verwendet, bei der ein Cystein in das C-terminale Ende der Scharnierregion eingefügt wurde – analog zu Cys797 in EGFR. Des Weiteren wurde der Thr-Türsteher durch ein Met ausgetauscht.^{14,*}

Der Inhibitor nimmt in dieser cSrc-Variante einen vergleichbaren Bindungsmodus wie in GSK3¹¹⁹ ein und bindet nicht kovalent an das Cys345 in der ATP-Bindungstasche. Er bildet drei Wasserstoffbrücken zu der Scharnierregion über die Pyrazolamin-Einheit aus, genauer zu dem Peptidrückgrat der Aminosäuren Glu339 und Met341. Der Phenylring des Inhibitors ist in Richtung der ATP-Bindungsstelle gerichtet, wobei das Elektrophil dem Lösungsmittel zugewandt ist. In dieser Konformation ist die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Elektrophil des Inhibitors und dem Thiol von Cys345, zwischen denen eine Distanz von etwa 10 Å liegt, nicht möglich (Abb. 6.4).

* Diese strukturbiochemischen Experimente wurden von André Richters und Dr. Christian Grütter durchgeführt.

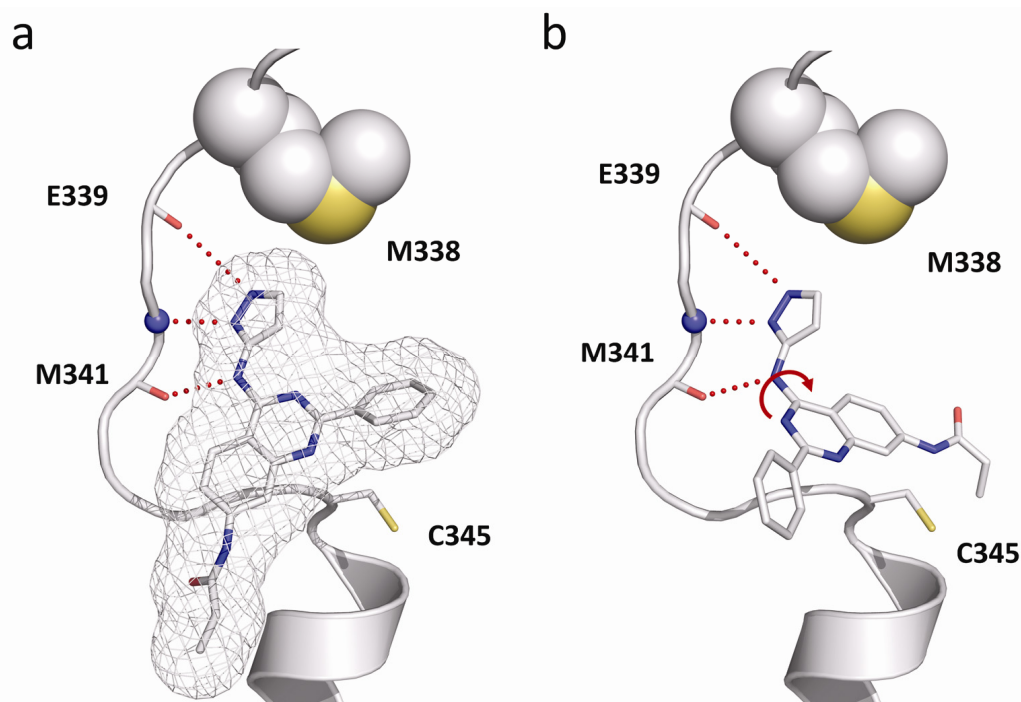


Abb. 6.4: (a) **5.6** im Komplex mit der wirkstoffresistenten Variante cSrc T338M/S345C. Der Inhibitor bindet über drei direkte Wasserstoffbrücken an die Scharnierregion der Kinase. Die Bindung des Inhibitors wird durch die Methionin-Seitenkette des Türsteherrestes nicht verhindert. (b) Modellierter Bindungsmodus von **5.6**, bei dem das Chinazolin um 180 °C gedreht ist. Das Elektrophil und die Seitenkette von Cys345 sind in passender Distanz, um eine kovalente Bindung auszubilden.

Um die stärkere Inhibition des Zellwachstums durch **5.6** verglichen mit seinem reversiblen Analogon zu erklären, wäre es denkbar, dass der Inhibitor bei der Bindung an EGFR eine andere Konformation annimmt. Eine Rotation um 180 °C um die Bindung zwischen Pyrazolamin und Chinazolin würde das Elektrophil des Inhibitors und die Seitenkette von Cys345 in ausreichende Nähe für die Ausbildung einer kovalenten Bindung bringen, wobei die essentiellen Wasserstoffbrücken zu der Scharnierregion erhalten geblieben (Abb. 6.4). Dies könnte zu einer stärkeren Bindung des Inhibitors an EGFR führen und so die effektivere Inhibition des Zellwachstums durch einen kovalenten Bindungsmechanismus erklären. Die wesentlichste Beobachtung bei dieser strukturellen Studie bleibt allerdings die Erkenntnis, dass die Bindung von **5.6** durch den sperrigen Methionin-Türsteherrest toleriert wird, und dass eine Kollision von Inhibitor und Seitenkette ausgeschlossen werden kann. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die T790M-Mutation des Türsteherrestes in EGFR interessant, da die Bindung bekannter chinazolinbasierter Inhibitoren (z. B. Gefitinib, Erlotinib) durch den größeren Türsteherrest erschwert wird, was zusammen mit weiteren Faktoren eine Wirkstoffresistenz hervorruft.^{13,134} Da die Bindung von **5.6**

durch die T790M-Mutation nicht beeinflusst wird, kann dieser Inhibitor das Wachstum der H3255 und H1975 Zelllinien gleichermaßen hemmen.

Aufgrund dieser Beobachtungen und vor dem Hintergrund, dass kovalente Inhibitoren als eine besonders aussichtsreiche Substanzklasse zur Bekämpfung der Türsteher-assoziierten Wirkstoffresistenz im NSCLC gelten,²¹ sollte eine Serie neuartiger kovalenter Inhibitoren entwickelt werden, die die EGFR-Aktivität und somit auch das Zellwachstum der EGFR-abhängigen Tumorzelllinien potent inhibieren.

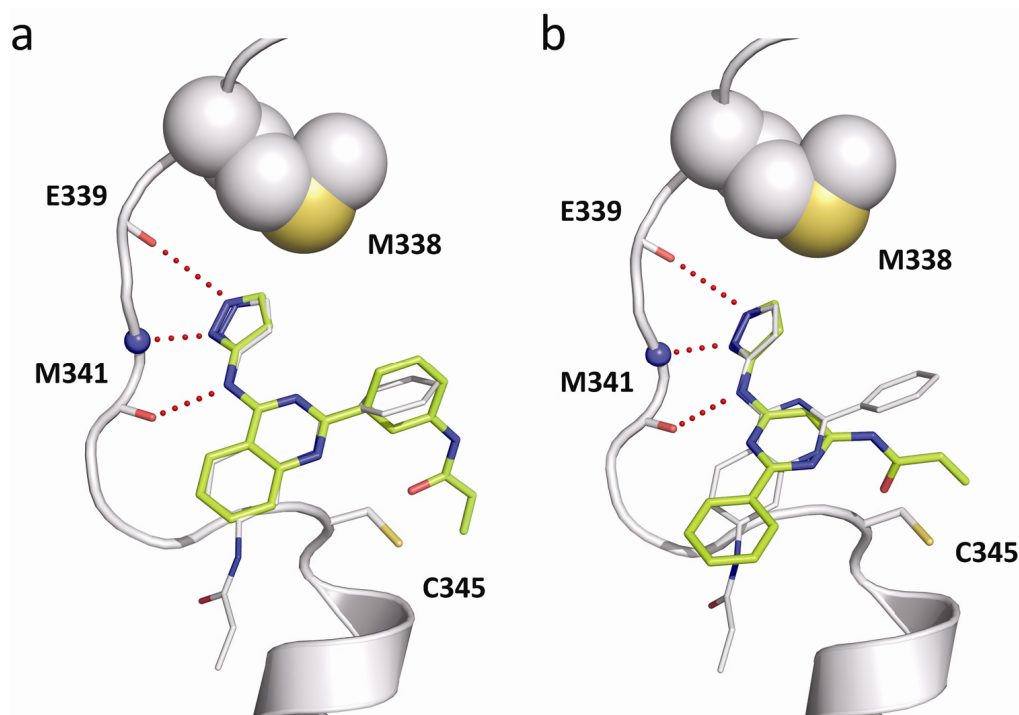


Abb. 6.5: cSrc (grau) im Komplex mit **5.6** (grau). Modellierungsstudien mit den Inhibitoren (grün) **6.10b** (a) und **6.15a** (b).

Basierend auf Modellierungsstudien mit dem cSrc-**5.6**-Komplex erschien in erster Linie der 2-Phenylsubstituent am Chinazolin für die Einführung des Michael-Akzeptorsystems geeignet zu sein (Abb. 6.5). Bei einer Derivatisierung des Phenylrings sollten die essentiellen Wasserstoffbrücken des Pyrazolamins zu der Scharnierregion beibehalten, und gleichzeitig das Elektrophil näher an das Cys345 platziert werden. Dazu sollte das Elektrophil in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position eingeführt werden, wobei die *meta*-Substitution am günstigsten erschien. Aufbauend auf den Überlegungen, dass erst eine Drehung des Chinazolingerüsts von **5.6** die Bildung einer kovalenten Bindung ermöglicht, wurde das Pyrimidin **6.15b** entworfen (Abb. 6.5,

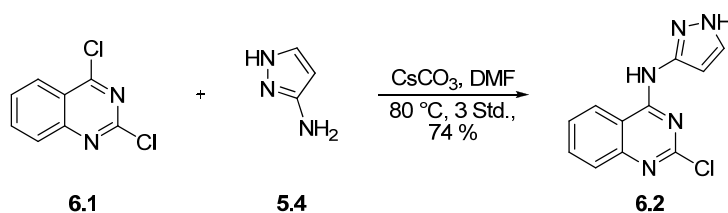
Tabelle 6.2). Dabei sollte zum einen die Rotation des Pyrimidins im Vergleich zum Chinazolin erleichtert, zum anderen das Elektrophil durch die direkte Einführung an den Pyrimidinring näher an das Thiol von Cys345 positioniert werden, um so eine kovalente Modifikation dieser Seitenkette zu erleichtern.

6.3.2 Synthese der 2-Phenylchinazoline

Für die Synthese der 2-Phenylchinazoline wurde zunächst eine Route verfolgt, bei der das Chinazolin-Grundgerüst aufgebaut wird, und anschließend über eine Suzuki-Kreuzkupplung Phenylboronsäuren in Position 2 eingeführt werden können. Dieser Weg bringt den Vorteil mit sich, dass das gemeinsame Grundgerüst für alle Inhibitoren aufgebaut wird, und die weitere Diversifizierung gegen Ende der Synthese modular vorgenommen werden kann.

2,4-Dichlorochinazolin **6.1** wurde in Gegenwart von DIPEA mit 3-Aminopyrazol **5.4** versetzt und das Chinazolin-Grundgerüst **6.2** dargestellt (Schema 6.1). Bei dieser Reaktion war auf eine ausreichende Verdünnung der Reaktionsmischung sowie auf ein äquimolares Verhältnis der Reaktanden zu achten, da bei hoher Konzentration sowie überschüssigem 3-Pyrazolamin zusätzlich eine Substitution des Chloratoms in 2-Position beobachtet wurde.

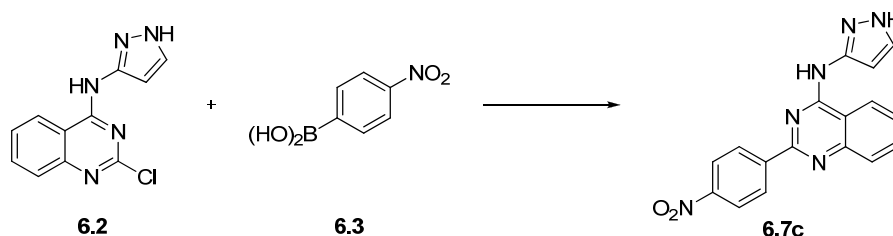
Schema 6.1: Synthese von 2-Chloro-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin **6.2**.



Nachdem **6.2** mit einer Ausbeute von 74 % isoliert werden konnte, sollte nun die weitere Derivatisierung der 2-Position vorgenommen werden. Dabei wurde stellvertretend für weitere Kupplungen versucht, 4-Nitro-phenylboronsäure **6.3** über eine Suzuki-Kupplung mit dem Chinazolin zu verknüpfen. Da mit Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃ und MeCN/H₂O keine Produktbildung erreicht werden konnte, wurde eine Reihe von Reaktionsbedingungen durchgemustert (Tabelle 6.1). Es ist anzunehmen, dass die Reaktivität des Chlorochinazolins **6.2** als elektrophile Spezies bei dieser Reaktion nicht

ausreicht, auch wenn die Suzuki-Kupplung für Chloride von elektronenarmen Heteroaromaten beschrieben ist.¹³⁵

Tabelle 6.1: Durchmusterung einiger Reaktionsbedingungen für die Suzuki-Kupplung.



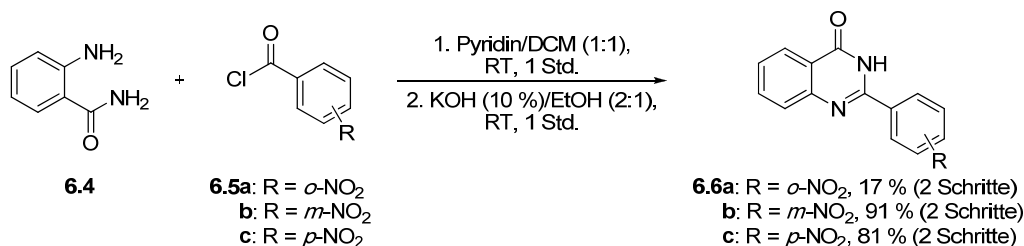
6.3	Katalysator [10 mol%]	Base	LM	T [°C]	Ausbeute [%]
1.1 Äq.	Pd(PPh ₃) ₄	3 Äq. K ₂ CO ₃	Toluol/DMF (9:1)	150	0
1.1 Äq.	Pd(PPh ₃) ₄	3 Äq. K ₂ CO ₃	MeCN/H ₂ O (1:1)	90	0
2.0 Äq.	PdCl ₂ (dppf) ₂	1 Äq. Na ₂ CO ₃	MeCN/H ₂ O (1:1)	90	0
1.5 Äq.	PdCl ₂ (dppf) ₂	1 Äq. Na ₂ CO ₃	DME/H ₂ O (9:1)	100	0
4.0 Äq.	Pd(PPh ₃) ₄	3 Äq. Na ₂ CO ₃	Toluol/ <i>n</i> -BuOH (9:1)	120	0
2.0 Äq.	Pd(OAc) ₂ /SPhos	3 Äq. K ₃ PO ₄	Toluol	120	0
2.0 Äq.	Pd(OAc) ₂ /SPhos	3 Äq. K ₃ PO ₄	<i>n</i> -BuOH	120	0
2.0 Äq.	PdCl ₂ (dppf) ₂ /(<i>tert</i> -Bu) ₃ P	6 Äq. Na ₂ CO ₃	DMF/H ₂ O (2:1)	80	0
2.0 Äq.	PdCl ₂ (dppf) ₂ /(<i>tert</i> -Bu) ₃ P	6 Äq. Na ₂ CO ₃	<i>n</i> -BuOH	80	0

Daher wurden verschiedene Katalysator-/Base-/Lösungsmittelsysteme untersucht, die insbesondere reaktivere Palladium-Katalysatoren verwenden. Dazu wurden sperrige Phosphin-Liganden eingesetzt, die eine Anlagerung von nur einem Liganden (L) an das Palladiumzentrum erlauben, und so eine sehr reaktive LPd(0)-Spezies generieren. Jedoch führte keine dieser Bedingungen zur Produktbildung, so dass auf einen alternativen Syntheseweg ausgewichen wurde. Dieser basiert auf dem linearen Aufbau der 2-Phenylchinazoline und hat den Nachteil, dass die Einführung des Substituenten an dem 2-Phenylring jeweils eine eigenständige Synthese erfordert.^{136,137}

2-Aminobenzamid wurde in Pyridin/DCM mit den Nitro-Benzoylchloriden **6.5a-c** zu den entsprechenden Benzamiden umgesetzt. Ohne weitere Aufreinigung wurden diese zu den 2-Phenylchinazolinonen **6.6a-c** kondensiert. Die Cyclisierung wurde durch die Base KOH initiiert. Die Chinazolinone **6.6b** und **c** konnten in guten Ausbeuten (91 bzw. 81 %) isoliert werden. **6.6a** hingegen wurde in weitaus geringerer Ausbeute (17 %) erhalten (Schema 6.2). Eine mögliche Erklärung liefert der *o*-Nitrosubstituent, der den

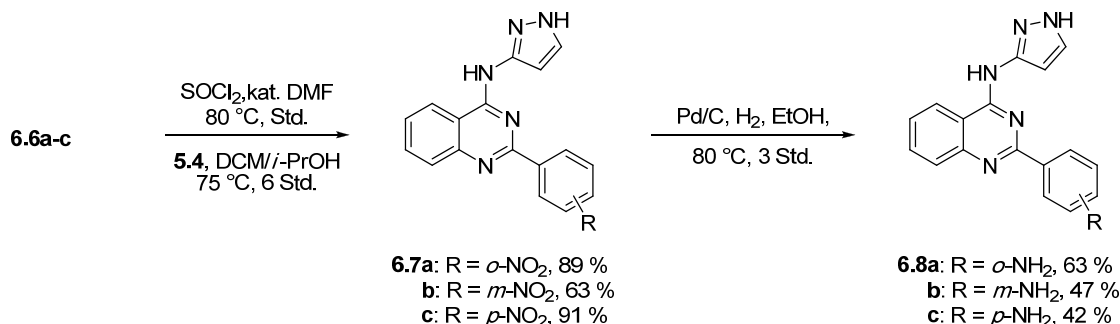
nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff des *N*-Benzylbenzamids durch das primäre Amid sterisch hindern könnte.

Schema 6.2: Synthese der Chinazolinone **6.6a-c**.



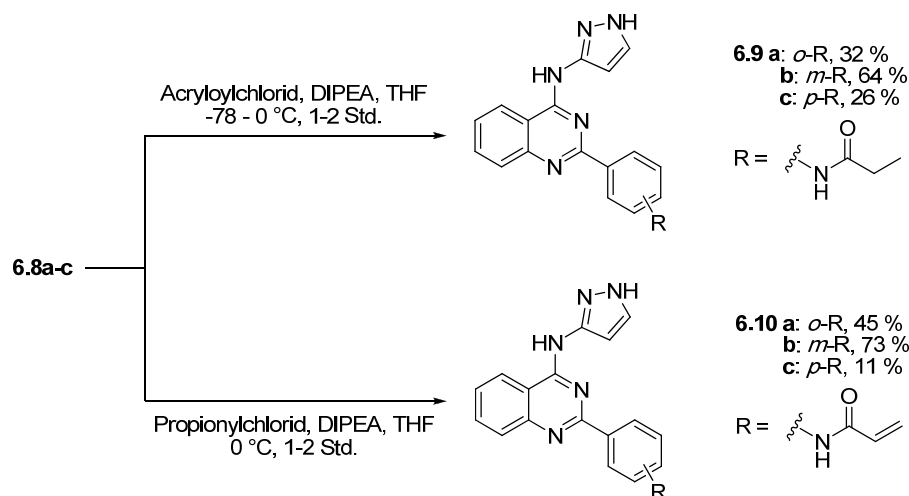
Im weiteren Verlauf wurden die Chinazolinone **6.6a-c** an der 4-Position chloriert. Dazu wurde Thionylchlorid und eine katalytische Menge DMF verwendet. Die Chlorierung erfolgte letztlich über das intermediär gebildete Vilsmeier-Haack-Reagenz und ergab die korrespondierenden Chlorochinazoline in quantitativen Ausbeuten. Unter basischen Bedingungen (DIPEA) wurden die Chlorochinazoline dann mit dem nukleophilen 3-Aminopyrazol **5.4** mit durchgehend guten Ausbeuten substituiert. Die Nitroverbindungen **6.7a-c** wurden mit Pd/C und H₂ zu den entsprechenden Aminen reduziert (Schema 6.3).

Schema 6.3: Synthese der 2-Aminophenylchinazoline **6.8a-c**.

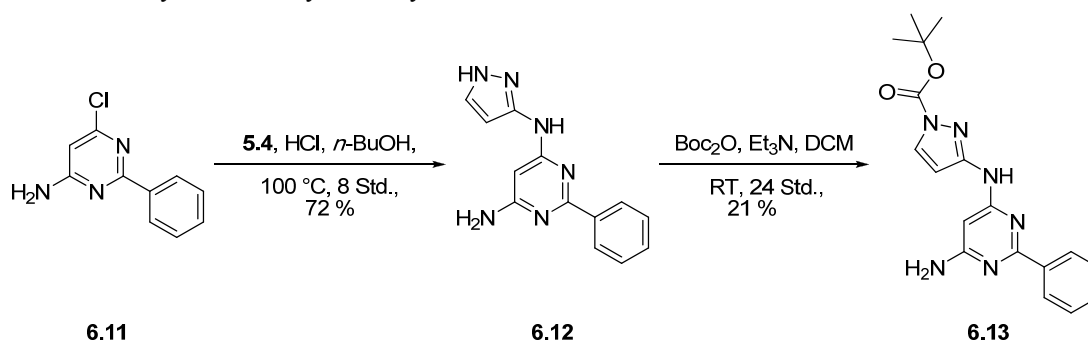


Die primären Amine boten nun die Möglichkeit, Michael-Akzeptorsysteme bzw. ihre gesättigten Analoga einzuführen. So wurden die Amine und DIPEA in THF vorgelegt, und 0.1-molare Lösungen von Acryloylchlorid bzw. Propionylchlorid in THF langsam zugegeben. Die finalen Produkte wurden in akzeptablen Ausbeuten erhalten (Schema 6.4).

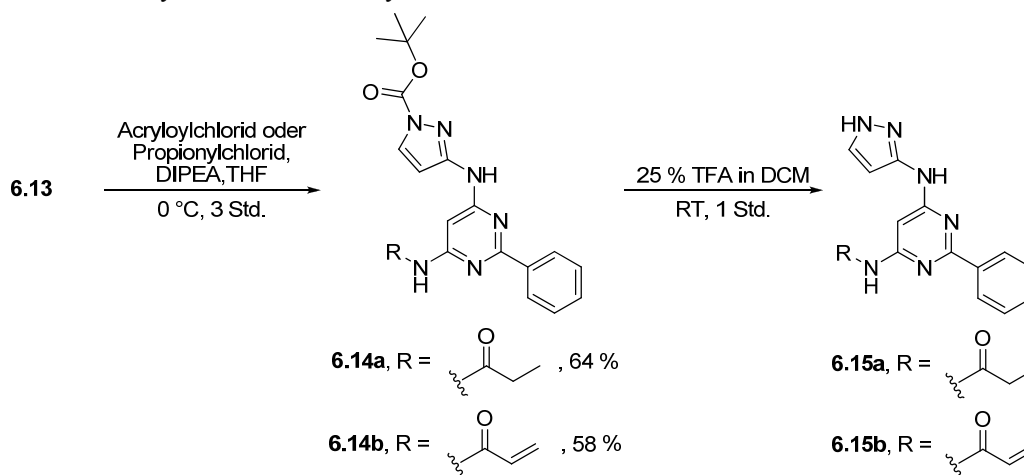
Schema 6.4: Synthese der finalen Verbindungen.



Neben den 2-Phenylchinazolinen gingen aus unseren Modellierungsstudien 2-Phenylpyrimidine als aussichtsreiche Verbindungen für die Inhibition der EGFR-Kinaseaktivität hervor (Abb. 6.5). Im Gegensatz zu den Chinazolinen sollten die Pyrimidine jedoch den reaktiven Michaelakzeptor nicht an dem Phenylring, sondern in 6-Position tragen. Die Substitution in 4-Position mit 3-Aminopyrazol wurde beibehalten, da diese Einheit für die Bindung essentielle Wasserstoffbrücken zu der Scharnierregion ausbildet. Ausgehend von Pyrimidin **6.11** wurde das 3-Aminopyrazol **5.4** in einer aromatischen Substitution (S_NAr) mit guter Ausbeute (72 %) eingeführt. Dabei wurde Salzsäure in katalytischen Mengen eingesetzt.¹³⁸ Anschließend wurde das N1 Stickstoffatom des Pyrazols mit Di-*tert*-butyldicarbonat in Gegenwart von TEA in das *tert*-Butylcarbammat **6.13** mit einer Ausbeute von 21 % überführt, da in Vorversuchen eine Addition des Acryloylchlorids an diese Position beobachtet wurde. Um diese Addition zu verhindern, wurde die Schutzgruppenstrategie verfolgt, so dass eine selektive Derivatisierung des primären 4-Pyrimidinamins erfolgen konnte (Schema 6.5).

Schema 6.5: Synthese des Pyrazolo-Pyrimidins **6.13**.

Unter basischen Bedingungen konnten die *N*-Alkylierungen mit Propionyl- bzw. Acryloylchlorid mit guten Ausbeuten durchgeführt werden, bevor im finalen Schritt die *tert*-Butylcarbonyl-Schutzgruppe mit TFA (25 % in DCM) quantitativ wieder entfernt wurde und die Verbindungen **6.15a** und **b** erhalten wurden (Schema 6.6).

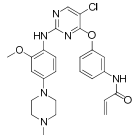
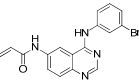
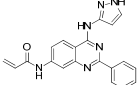
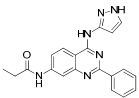
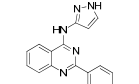
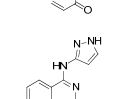
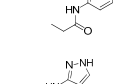
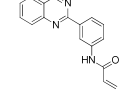
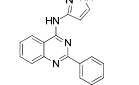
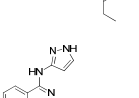
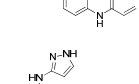
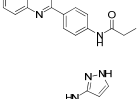
Schema 6.6: Synthese der finalen Pyrimidine **6.15a** und **b**.

6.4 Diskussion

Basierend auf dem cSrc-**5.6**-Komplex und Modellierungsstudien wurde eine gerichtete Substanzbibliothek entworfen und synthetisiert. Die neuartigen Verbindungen wurden im Hinblick auf ihre Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht, wobei insbesondere der Einfluss der Türsthermutation in EGFR im Fokus stand. So wurden neben dem WT von EGFR auch die Varianten EGFR L858R (sensitiv gegenüber bisherigen TKI) und EGFR T790M/L858R (wirkstoffresistente Variante) mit dem Aktivitäts-basierten HTRF[®]-Assay vermessen und IC₅₀-Werte bestimmt (Tabelle 6.2). Die gemessenen IC₅₀-

Werte zeigen eine klare Struktur-Wirkungs-Beziehung. **5.6** und sein reversibles Analogon inhibieren die enzymatische Aktivität des Wildtyps von EGFR nicht. Hingegen ergaben sich für die beiden Varianten von EGFR IC_{50} -Werte im Bereich um $2 \mu\text{M}$ sowohl für den kovalenten als auch für den nicht-kovalenten Inhibitor. Dies deutet darauf hin, dass der reversible Bindungsmodus von **5.6** in cSrc möglicherweise auch auf EGFR übertragen werden kann, und **5.6** keine kovalente Bindung mit Cys797 in EGFR ausbildet. Um eine kovalente Bindung zwischen dem Liganden und der Kinase zu ermöglichen, wurde das Elektrophil von dem Chinazolinkern entfernt und auf den Phenylring übertragen. Die Einführung in *ortho*- und *para*-Position des Phenylrings führte letztlich zu inaktiven Substanzen. Lediglich **6.10a** (*ortho*-substituiert) inhibierte die Kinaseaktivität der EGFR Varianten im niederen mikromolaren Bereich. Wie schon aufgrund der Modellierungsstudien anzunehmen war, konnte durch die Einführung des Elektrophils in *meta*-Position der wirksamste Inhibitor (**6.10b**) dieser Serie generiert werden. **6.10b** inhibiert den Wildtyp von EGFR mit einem IC_{50} -Wert von etwa $1 \mu\text{M}$. Gegenüber der sensibilisierenden Variante (EGFR L858R) ist **6.10b** mit 500 nM noch etwas potenter. Interessanterweise zeigt **6.10b** seine beste Wirkung ($IC_{50} = 120 \text{ nM}$) gegenüber der wirkstoffresistenten Variante von EGFR (T790M/L858R). Das reversible Analogon **6.9b** inhibiert ebenfalls alle drei Enzyme, allerdings mit 3-4 fach höheren IC_{50} -Werten als **6.10b**. Gemeinsam mit den Modellierungsstudien weisen diese Ergebnisse auf eine kovalente Bindung zwischen EGFR und **6.10b** hin. Auch die Überlegungen, den Chinazolinkern durch ein Pyrimidin auszutauschen, führten zu einem potenten Inhibitor. **6.15b** hemmt die enzymatische Aktivität des Wildtyps und der sensibilisierenden Variante von EGFR mit IC_{50} -Werten von etwa 800 nM und die wirkstoffresistente Variante sogar mit 300 nM . Das reversible Analogon **6.15a** zeigt lediglich eine schwache Inhibition der EGFR L858R-Variante (ca. $3 \mu\text{M}$), ist aber gänzlich inaktiv gegenüber der T790M Mutationsvariante.

Tabelle 6.2: IC₅₀-Werte für die EGFR-Varianten WT, L858R und T790M/L858R.^a

Verbindung	IC ₅₀ EGFR [nM]			
	WT	L858R	T790M/L858R	
WZ4002		8 ± 1	<1	<1
PD168393		9 ± 1	<1	2 ± 1
5.6		>100	1905 ± 285	2202 ± 69
6.17		>100	2129 ± 117	2219 ± 67
6.10a		>100	2746 ± 871	1119 ± 114
6.9a		>100	>100	>100
6.10b		1116 ± 162	534 ± 32	119 ± 17
6.9b		3652 ± 238	1926 ± 284	398 ± 49
6.10c		>100	>100	>100
6.9c		>100	>100	>100
6.15b		845 ± 85	761 ± 188	275 ± 69
6.15a		>100	3422 ± 2487	>100

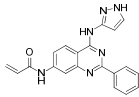
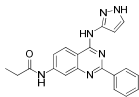
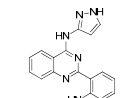
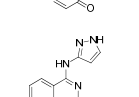
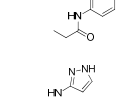
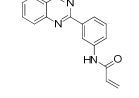
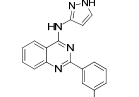
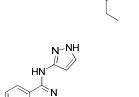
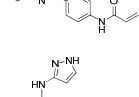
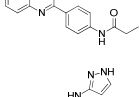
^aDie IC₅₀-Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Wiederholungen, die jeweils in Dreifachbestimmung generiert wurden.

Möglicherweise führt der Austausch des Chinazolins durch ein Pyrimidin zu einer erhöhten Flexibilität des Inhibitorgerüsts, insbesondere um die Pyrazolamin-Pyrimidin-Bindung, so dass das Pyrimidin die postulierte Drehung um 180° durchführt, und das Elektrophil ausreichend nah an das Cys797 positioniert wird, um eine kovalente Bindung auszubilden. Die Bindung des reversiblen Analogons **6.15a** wird hingegen nicht weiter durch eine kovalente Bindung zum Protein stabilisiert und resultiert daher in dem Verlust der inhibitorischen Aktivität.

Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die sich aus den biochemischen IC_{50} -Werten ableiten, werden weitestgehend auch von den zellulären Daten untermauert. Um die zelluläre Aktivität der Verbindungen zu ermitteln, wurde die Hemmung des Zellwachstums in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration untersucht. Dabei wurde die Wirkung auf die bereits erwähnten Zelllinien PC9, H1975, A549 sowie auf die Zelllinie H1781 studiert, welche sich durch eine Insertion in Exon 20, kodierend für HER2, auszeichnet und aufgrund einer erhöhten EGFR-Aktivität zu einer Resistenz gegenüber den traditionellen TKI führt (Tabelle 6.3). Des Weiteren wurde die Hemmung des Zellwachstums von drei BaF3-Zelllinien untersucht, welche in ihrem Wachstum abhängig von EGFR sind (Tabelle 6.4). Dabei trugen die Zellen folgende EGFR-Varianten: EGFR del11, EGFR R108K und EGFR vIII. **5.6** inhibiert das Wachstum der Zellen mit GI_{50} -Werten zwischen 1 und $2 \mu\text{M}$, wobei das reversible Analogon **6.17** kaum Aktivität zeigt. Interessanterweise hat die Türstehermutation in EGFR keinerlei Einfluss auf die zelluläre Potenz von **5.6**. Wie auch bei den biochemischen IC_{50} -Werten beobachtet wurde, bewirken die Derivate **6.10a** und **6.10c** sowie ihre reversiblen Analoga keine Hemmung des Zellwachstums und bestätigen den beobachteten Trend aus den biochemischen Messungen. Von allen Verbindungen zeigt **6.10b** die beste Wirksamkeit bei der Inhibition des Zellwachstums mit GI_{50} -Werten zwischen 2 und $6 \mu\text{M}$. Auffallend ist, dass das Wachstum der Zelllinie H1975, die die T790M Türstehermutation in EGFR trägt, wirksam ($3 \mu\text{M}$) unterdrückt wird, und die Mutation nicht etwa zu einer Resistenz gegenüber dieser Verbindung führt. Zudem wird das Wachstum der BaF3-Zelllinien mit GI_{50} -Werten um $0.5 \mu\text{M}$ gehemmt. Diese Ergebnisse bestätigen den Ansatz aus den Modellierungsstudien, und weisen auf EGFR auch als zelluläres Zielprotein hin. Die deutlich geringere Aktivität von **6.9b** deutet darüber hinaus auf eine Bindungsbildung zwischen **6.10b** und dem Cys797 hin. Neben dem

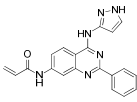
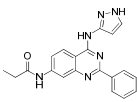
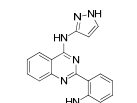
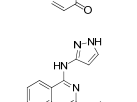
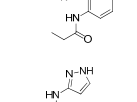
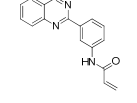
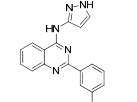
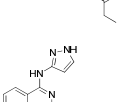
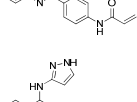
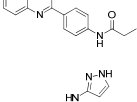
Chinazolin **6.10b** inhibiert auch das Pyrimidin **6.15b** das Zellwachstum aller Zelllinien mit etwas geringerer Effektivität (GI_{50} -Werte zwischen 4 und 8 μM). Interessanterweise zeigt das gesättigte Analogon **6.15a** eine vergleichbare Aktivität, die bei den biochemischen Messungen nicht beobachtet wurde. Möglicherweise hemmt **6.15a** in der Zelle die Wirkung anderer Enzyme, wodurch die GI_{50} -Werte erklärt würden.

Tabelle 6.3: GI₅₀-Werte für die Zelllinien PC9 (EGFR del1), H1975 (EGFR T790M/L858R), H1781 (HER2/neu G776 InsV) und A549 (KRAS G12S).^a

Verbindung	GI ₅₀ [μM]				
	PC9	H1975	H1781	A549	
5.6		1.9	1.6	0.7	1.7
6.17		9.5	16.6	>30	>30
6.10a		>30	>30	>30	>30
6.9a		>30	>30	>30	>30
6.10b		5.9	2.6	1.9	5.5
6.9b		12.8	8.4	3.3	14.1
6.10c		>30	>30	>30	>30
6.9c		>30	>30	>30	>30
6.15b		5.1	4.4	4.1	7.9
6.15a		>30	1.7	1.3	3.2

^aDie GI₅₀-Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Messungen.** Die GI₅₀-Werte wurden von Dr. Martin Sos aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Roman Thomas (MPI Köln) bestimmt.

Tabelle 6.4: GI₅₀-Werte für die BaF3-Zelllinien mit den folgenden EGFR-Varianten: EGFR del1, EGFR R108K und EGFR vIII.^a

Verbindung	GI ₅₀ [μM]			
	EGFR del1	EGFR R108K	EGFR vIII	
5.6		2.4	1.7	2.1
6.17		>30	>30	>30
6.10a		>30	>30	>30
6.9a		>30	>30	>30
6.10b		0.2	0.6	0.3
6.9b		20.2	>30	>30
6.10c		>30	>30	>30
6.9c		>30	>30	>30
6.15b		7.0	9.6	18.6
6.15a		0.8	0.8	>30

^aDie GI₅₀-Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Messungen.** Die GI₅₀-Werte wurden von Dr. Martin Sos aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Roman Thomas (MPI Köln) bestimmt.

6.5 Zusammenfassung

Das Rational für das strukturbasierte Design der vorgestellten Verbindungen wird durch die Struktur-Wirkungs-Beziehungen bestätigt. Wie zuvor aus strukturbioologischen Betrachtungen hervorging, war die 7-Position des Chinazolins, an der das Elektrophil zunächst positioniert war (**5.6**), nicht geeignet, um eine kovalente Bindung mit Cys797 in EGFR einzugehen. Modellierungsstudien führten zu der Entwicklung von 2-Phenylchinazolinen, an deren Phenylring das Elektrophil eingeführt wurde, um für die Ausbildung einer kovalenten Bindung näher an die Seitenkette des Cysteins gebracht zu werden. Dieser Ansatz führte zu Verbindung **6.10b**, die das Elektrophil in *meta*-Position des Phenylrings trägt, und sowohl biochemisch als auch zellulär die höchsten Aktivitäten in der fokussierten Substanzbibliothek zeigt. Das reversible Analogon **6.9b** zeigt im Vergleich dazu eine deutlich reduzierte Aktivität, was auf eine kovalente Modifizierung von EGFR durch **6.10b** hinweist. Besonders hervorzuheben ist die effektive Hemmung der Türstehermutante (T790M) von EGFR, die auch zellulär untermauert wird. Dabei zeigt der Inhibitor sogar eine stärkere Wirkung gegen die wirkstoffresistente EGFR-Variante bzw. die H1975-Zelllinie, die diese EGFR-Variante trägt. Diese Daten beweisen, dass die gezielte Entwicklung von Liganden im Hinblick auf wirkstoffresistente Zielproteine zu potenten Inhibitoren führen kann, die Wirkstoffresistenzen erfolgreich umgehen können. In der kürzlich erschienenen Studie von Jänne *et al.* wird die Entwicklung des kovalenten EGFR-Inhibitors WZ4002 berichtet, der die EGFR T790M/L858R-Variante deutlich stärker inhibiert als den Wildtyp von EGFR und in Lungenkrebs Mausmodellen der EGFR T790M Variante zu einer deutlichen Tumorregression führt.²¹ Diese vielversprechenden Ergebnisse unterstreichen, dass kovalente Inhibitoren eine aussichtsreiche Alternative darstellen, um gezielt mutationsbedingt veränderte Zielproteine zu inhibieren. So ist eine weiterführende Entwicklung der gezeigten Inhibitoren denkbar. Die gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Position des Elektrophils könnten vom Chinazolin- auf den Pyrimidinkern übertragen werden, um beispielsweise die Orientierung des Elektrophils zum reaktiven Cys797 zu optimieren. Dazu wäre die Einführung eines Heteroatoms zwischen den Inhibitorkern und den Phenylsubstituenten in 2-Position von Vorteil. Des Weiteren könnten hydrophobe Substituenten am Pyrazolring die Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Methionin-Türsteherrest verbessern. Zudem

wäre eine Steigerung der teilweise moderaten Löslichkeit der Chinazoline durch Einführung Löslichkeits-vermittelnder Substituenten denkbar.

7 PIK-75

7.1 Einleitung

Tumorentstehung und -wachstum sind häufig von der gesteigerten Aktivität eines Onkoproteins abhängig. Die therapeutische Hemmung aktivierter Onkoproteine kann eine massive Apoptose von Tumorzellen induzieren und eine deutliche Tumorregression in Patienten zur Folge haben. Allerdings weisen aktuelle Studien darauf hin, dass viele somatische Veränderungen des Krebsgenoms lediglich in der Aktivierung einer begrenzten Anzahl an nachgeschalteten onkogenen Signalwegen resultieren. Die PI3K- und MAPK-Signalwege sind zentrale Regulatoren solcher onkogenen Veränderungen. So weisen Bronchialkarzinome mit KRAS-Mutationen eine Abhängigkeit sowohl von dem PI3K- als auch MAPK-Signalweg auf.¹³⁹ Nahezu alle Tumore mit EGFR-Mutationen, die eine erworbene Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren aufweisen, können die PI3K-Signalübertragung aufrechterhalten und somit das Überleben der Zelle sichern. Das gezielte Ausschalten zentraler Modulatoren nachgeschalteter Signalwege erscheint daher zunehmend attraktiv, auch wenn das alleinige Ausschalten des PI3K- oder des MAPK-Signalwegs häufig nicht zu einem Tumorrückgang führt. Nur die Kombination von Inhibitoren, durch die beide Signalwege ausgeschaltet werden, ist den einzelnen Substanzen überlegen.¹⁴⁰

7.2 Zielsetzung

Durch die systematische Anwendung eines chemo-genomischen Ansatzes sollten genetische Läsionen in Verbindung mit der Aktivierung der PI3K- und MAPK-Signalwege identifiziert werden und eine Begründung für die vorteilhafte kombinierte Inhibition beider Signalwege liefern. Um die Abhängigkeit der NSCLC-Tumorzelllinien von der PI3K-Signalübertragung untersuchen zu können, wurde eine chemische Sonde benötigt, welche möglichst selektiv die Aktivität der PI3-Kinase inhibiert. Ein solcher PI3K-Inhibitor ist PIK-75, der selektiv die PI3K α -Isoform inhibiert.^{141,142} Im Rahmen

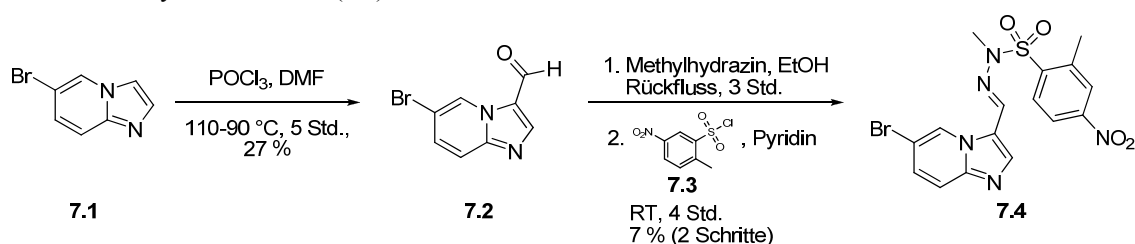
dieser Arbeit sollte PIK-75 synthetisiert, und für weitere Untersuchungen PD Dr. Roman Thomas und Mitarbeitern (MPI Köln) zur Verfügung gestellt werden.

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Synthese

Die Synthese des PI3K-Inhibitors PIK-75 wurde entsprechend der bereits publizierten Synthese von Hakayawa *et al.* durchgeführt.¹⁴² Das Bromo-imidazol-pyridin **7.1** wurde zunächst mit POCl₃ und DMF formyliert. Dabei reagiert das *in situ* gebildete Vilsmeier-Reagenz in einer elektrophilen aromatischen Substitution mit **7.1**. Nach wässriger Aufarbeitung wurde der Aldehyd **7.2** in 27 %-iger Ausbeute isoliert. Im nächsten Schritt wurde **7.2** mit Methylhydrazin aminiert. Ohne weitere Aufreinigung folgte die Umsetzung mit 2-Methyl-5-nitrobenzen-1-sulfonylchlorid, so dass letztlich PIK-75 (**7.4**) in 7 %-iger Ausbeute (2 Schritte) erhalten wurde.

Schema 7.1: Synthese PIK-75 (**7.4**).



7.3.2 Zelluläre Validierung von PIK-75

Im weiteren Verlauf sollte der Inhibitor PIK-75 verwendet werden, um die PI3-Kinase in NSCLC-Tumorzellen spezifisch auszuschalten. Diese gezielte Perturbation der Aktivität der PI3-Kinase sollte die Untersuchung des nachgeschalteten Signalwegs ermöglichen. Infolgedessen wurde die Wirkung des Inhibitors auf eine Reihe von Tumorzelllinien untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das Wachstum nahezu aller überprüften Zellen sehr potent inhibiert wird (Abb. 7.1). Diese Resultate deuten auf eine zelltoxische Wirkung des Inhibitors PIK-75 hin, die möglicherweise in der starken

7.5 Publikation

Teile dieser Ergebnisse wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

1. Sos M.L., Fischer S., Ullrich R., Peifer M., Heuckmann J.M., Koker M., Heynck S., Stückrath I., Weiss J., Fischer F., Michel K., Goel A., Regales L., Politi K.A., Perera S., Getlik M., Heukamp L.C., Ansén S., Zander T., Beroukhim R., Kashkar H., Shokat K.M., Sellers W.R., Rauh D., Orr C., Hoefflich K.P., Friedman L., Wong K.K., Pao W., Thomas R.K., “Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106: 18351-18356.

8 Zusammenfassung

Als zentrale Signalmoleküle steuern Kinasen zahlreiche zelluläre Prozesse und stellen ein äußerst attraktives Gebiet für die akademische und industrielle Forschung dar. In der chemischen Biologie bilden Kinaseinhibitoren eine wichtige Grundlage für die Entwicklung molekularer Sonden, die mittels gezielter Perturbation zu einem detaillierten Verständnis der Funktion einer Kinase in einem biologischen System beitragen. Darüber hinaus zeigte die Marktzulassung von Kinase-Hemmstoffen, dass die Inhibition von Kinasen vor allem in der zielgerichteten Tumormedizin ein vielversprechender und in Teilen erfolgreicher Therapieansatz sein kann.²⁵ Verglichen mit traditionellen ATP-kompetitiven Inhibitoren versprechen insbesondere allosterische und kovalente Inhibitoren Vorteile im Hinblick auf ihre Selektivität sowie Pharmakokinetik und stellen daher besonders aussichtsreiche Ansätze in der Kinaseforschung dar.^{18,21} Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die strukturbasierte Entwicklung und die Synthese von Kinasemodulatoren gelegt, die allosterische Bereiche innerhalb der Kinasedomäne adressieren und so enzymatisch inaktive Konformationen stabilisieren oder kovalent an Kinasen binden.

Als Ausgangspunkt für die Untersuchung der enzymatisch inaktiven DFG-*out*-Konformation verschiedener Kinasen wurde zunächst eine fokussierte Substanzbibliothek von *N*-Aryl-*N'*-Pyrazolharnstoffen synthetisiert. Diese Verbindungen waren essentiell für die Entwicklung und Validierung der p38 α -FLiK- und p38 α -EFC-Assaysysteme, welche die Identifikation von DFG-*out*-Stabilisatoren ermöglichen.^{62,69} Mit der Etablierung dieser neuartigen Assaysysteme wurde der Grundstein für die Identifikation neuer Leitstrukturen mit unterschiedlichen chemischen Grundgerüsten gelegt.

So konnten mittels des p38 α -FLiK-Systems bei der Durchmusterung einer Substanzbibliothek von 35.000 Verbindungen mehrere Thiazolharnstoffe als schwache Binder/Inhibitoren von p38 α identifiziert werden.¹⁰² Ausgehend von diesen Treffern wurden in der vorliegenden Arbeit niedrig nanomolare Typ-III-Inhibitoren entwickelt, die erstmals auf dem Thiazolharnstoff-Pharmakophor aufbauen und p38 α in der

enzymatisch inaktiven DFG-*out*-Konformation stabilisieren. Die hohe inhibitorische Aktivität dieser Verbindungen konnte durch die Einführung funktioneller Gruppen und die Ausbildung zusätzlicher Interaktionen mit der allosterischen Tasche von p38 α erreicht werden. Detaillierte röntgenkristallographische Untersuchungen einiger Inhibitoren aus dieser Reihe ergaben, dass eine Bindung in die bei Kinasen hoch konservierte ATP-Bindungsstelle gänzlich vermieden wird. Daher bietet diese vielversprechende Substanzklasse zukünftig die Möglichkeit, potente Kinaseinhibitoren mit vorteilhaften Selektivitätsprofilen zu entwickeln.

Der Transfer der FLiK-Technologie auf cSrc ermöglichte die Identifizierung der eingangs hergestellten Pyrazolharnstoffe als schwache Binder dieser Tyrosinkinase.⁶⁴ Letztere wurden in einem fragmentbasierten Ansatz über einen zentralen Phenylring mit einer Chinazolineinheit verknüpft und führten zu neuartigen nanomolaren Typ-II-Hybridinhibitoren. Darüber hinaus stellen diese Verbindungen die ersten hoch potenten Typ-II-Inhibitoren der wirkstoffresistenten Türstehermutante (T338M) von cSrc dar. Diese Wirkstoffresistenz resultiert aus dem Austausch einer kleinen Aminosäure durch größere hydrophobe Reste an der Türsteherposition und ist aktuell ein zentrales Problem in der klinischen Kinaseforschung, da bislang keine wirksamen Ansätze entwickelt werden konnten, mit denen sich diese Form der Resistenz bei der Behandlung von Tumorpatienten umgehen lässt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte der Wirkmechanismus der hergestellten Typ-II-Hybridinhibitoren aufgeklärt werden. Interessanterweise weichen die 1,4-verknüpften Inhibitoren einem sperrigen Türsteherrest durch Rotation ihres zentralen Phenylrings aus und inhibieren so effektiv die wirkstoffresistente T338M-Variante von cSrc.⁷⁰ Ferner überwinden diese Verbindungen die klinisch relevante wirkstoffresistente Türstehermutation T315I in Abl, so dass in fortführenden Arbeiten die Weiterentwicklung zu hoch wirksamen Inhibitoren von Abl T315I gelang.¹⁴³ Typ-II-Inhibitoren, die anstelle des flexiblen Phenylrings ein Alkin tragen und so einem sperrigen Türsteherrest ausweichen, hemmen ebenfalls potent die Aktivität der wirkstoffresistenten T315I-Variante von Abl und befinden sich aktuell in Phase II der klinischen Erprobung im Einsatz gegen die chronische myeloische Leukämie.¹⁴⁴ Der Erfolg solcher Wirkstoffe bestätigt, dass aus der in dieser Arbeit beschriebenen Studie möglicherweise ein genereller Ansatz zur effektiven Hemmung von Wirkstoffresistenzen in Kinasen abgeleitet werden kann.

Durch den Einsatz flexibler Strukturelemente in unmittelbarer Nähe zu mutationsanfälligen Positionen kann sich ein Inhibitor verändernden Bedingungen in einer Bindungstasche anpassen, ohne an Aktivität zu verlieren.

Die mit der Mutation des Türsteherrestes assoziierte Wirkstoffresistenz wird auch bei der Rezeptortyrosinkinase EGFR beobachtet und tritt als Folge der Therapie mit reversiblen EGFR-Inhibitoren bei Patienten auf, die unter dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom leiden. Die Resistenz bildet sich bei etwa 50 % der behandelten Patienten aus und resultiert in einem aggressiven Fortschreiten der Erkrankung.¹³⁰ Daher stellt die Suche nach neuen Methoden und Ansätzen, mit denen diese Resistenz überwunden werden kann, eine wichtige Herausforderung in der Kinaseforschung dar. In der vorliegenden Arbeit diente zunächst ein chinazolinbasierter GSK3-Inhibitor¹¹⁹ als Grundlage für die chemische Sonde **5.6**, die für die Untersuchung des GSK3-Signalwegs synthetisiert wurde. Bei einer Durchmusterungskampagne inhibierte das thiolreaktive 2-Phenylchinazolin **5.6** überraschenderweise das Wachstum einiger Tumorzelllinien des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms. Besonders auffällig war die Effektivität gegenüber Zelllinien mit der wirkstoffresistenten Türstehermutation (T790M) der Rezeptortyrosinkinase EGFR. Daraufhin wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit das Ziel verfolgt, in einem strukturbasierten Ansatz erstmals eine fokussierte Substanzbibliothek kovalenter EGFR-Inhibitoren auf Grundlage des 2-Phenylchinazolin-Grundgerüsts zu entwerfen. Die synthetisierten Verbindungen sollten insbesondere die T790M Türstehermutante von EGFR potent inhibieren. Die biochemische Validierung bestätigte die hervorragende nanomolare Aktivität des Inhibitors **6.10b** gegen EGFR T790M/L858R. So konnte die Potenz dieses Inhibitors im Vergleich zu dem ursprünglichen Treffer **5.6** erfolgreich gesteigert werden. Darüber hinaus stellt die zelluläre Aktivität von **6.10b** einen wesentlichen Vorteil der hier dargestellten kovalenten Inhibitoren dar. So inhibiert **6.10b** das Wachstum der Zelllinien mit der Resistenzvariante EGFR T790M/L858R deutlich stärker als das von Zelllinien, die ausschließlich gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren sensibilisierende Mutationen enthalten. Hingegen verlieren mit Ausnahme des Pyrimidins WZ4002 alle bisher bekannten kovalenten EGFR-Inhibitoren deutlich an Aktivität in Tumorzelllinien mit der Resistenzvariante EGFR T790M/L858R und stellen bei klinisch relevanten Konzentrationen *in vitro* keine Inhibitoren von EGFR T790M/L858R dar.²¹ Des

Weiteren weist die stärkere Inhibition der Resistenzvariante EGFR T790M/L858R im Vergleich zum Wildtyp von EGFR einen zusätzlichen Vorteil der hier entwickelten Inhibitoren auf. Die Hemmung des EGFR Wildtyps geht üblicherweise mit starken Nebenwirkungen einher, welche durch eine spezifische Inhibition der Resistenzvariante möglicherweise vermindert werden könnten (*on-target toxicity*). In der vorliegenden Arbeit konnte mit den kovalenten EGFR-Inhibitoren ein vielversprechender Ansatz vorgestellt werden, mit dem klinisch relevante Wirkstoffresistenzen der Rezeptortyrosinkinase EGFR umgangen werden können. So bieten die hier erstmals beschriebenen kovalenten Inhibitoren einen ausgezeichneten Ausgangspunkt für eine weitere medizinalchemische Optimierung und stellen möglicherweise Leitstrukturen für neue Wirkstoffe in der Tumormedizin dar.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das 2-Phenylchinazolin **5.6** zudem als ein mikromolarer Binder von p38 α identifiziert und dessen neuartiger Bindungsmodus aufgeklärt.⁶³ So nimmt **5.6** eine zu traditionellen chinazolinbasierten Inhibitoren alternative Orientierung in der ATP-Bindungsstelle ein und stabilisiert zudem die DFG-*out*-Konformation durch direkte Wechselwirkung mit dem DFG-Motiv. Ausgehend von diesem Bindungsmodus wurde eine gezielte Substanzbibliothek entworfen und synthetisiert, um die Affinität dieser Substanzklasse zu verbessern und potente p38 α -Inhibitoren zu generieren. Nach der erfolgreichen Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek von 2-Phenylchinazolinen, wurde überraschenderweise für den potentesten Binder **5.8** aus dieser Reihe eine neue Bindungsstelle identifiziert. So bindet **5.8** nicht wie sein Vorläufer **5.6** im aktiven Zentrum, sondern in der Lipid-Bindungsstelle von p38 α mit einer Affinität im mittleren nanomolaren Bereich. Im Gegensatz zu den wenigen bisher bekannten Lipid-Bindern, die sowohl die Lipid-Bindungsstelle als auch das aktive Zentrum von p38 α belegen,^{116,118,121} bindet **5.8** ausschließlich in der Lipid-Bindungsstelle und zeigt keine Hemmung der enzymatischen Aktivität von p38 α . Darüber hinaus ergab die Profilierung von **5.8** gegen 94 weitere Kinasen für diese Verbindung keine inhibitorische Aktivität. So wurde mit dem 2-Phenylchinazolin **5.8** zum ersten Mal eine Substanz identifiziert, die aufgrund ihrer Spezifität einen idealen Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung der biologischen Aufgabe der Lipid-Bindungsstelle von p38 α darstellt, welche bisher nicht aufgeklärt werden konnte.

Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Projekte durch die Synthese und Bereitstellung chemischer Sondenmoleküle unterstützt. So wurde eine Reihe von Aminoarylpyrimidinen synthetisiert, die als aussichtsreiche allosterische Inhibitoren der klinisch relevanten, wirkstoffresistenten T315I-Variante von Bcr-Abl gelten.^{18,111} Diese Verbindungen waren entscheidend für die Entwicklung und Evaluierung von Assaysystemen, die zukünftig der Identifikation von Verbindungen mit neuer chemischer Struktur dienen werden.¹²⁵ Des Weiteren wurde der isoformspezifische PI3K-Inhibitor PIK-75 synthetisiert, der für die Untersuchung der Signalwege der PI3K in NSCLC-Tumorzelllinien eingesetzt wurde.¹⁴⁰

9 Experimenteller Teil

9.1 Vorbemerkungen

Die verwendeten **Chemikalien** und **Lösungsmittel** wurden kommerziell bei den Firmen Acros, Alfa Aesar, Bionet, Fluka, Fluorchem, Maybridge, Merck, Novabiochem, Roth, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

NMR-Spektren wurden auf den Spektrometern Bruker DRX 400 (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -NMR) und DRX 500 (500 MHz für ^1H - und 125 MHz für ^{13}C -NMR) sowie einem Varian Mercury 400 (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -NMR) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und der interne Standard der chemischen Verschiebungen bezieht sich auf die Lösungsmittel Deuteriochloroform (CDCl_3 , $\delta = 7.24$ ppm bzw. $\delta = 77.23$ ppm), Deuteromethanol (CD_3OD $\delta = 4.87$ ppm bzw. 49.15 ppm) und Deuterodimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$ $\delta = 2.50$ ppm bzw. 39.51 ppm). Die Kopplungskontanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die in den ^1H -NMR-Spektren auftretenden Spinmultiplizitäten wurden in folgender Weise abgekürzt: (s) Singulett (q) Quartett (d) Dublett (dd) Doppeldublett (m) Multipllett (t) Triplet (b) breit.

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit dem Spektrometer LTQ Orbitrap der Firma Thermo Electron Corporation aufgenommen.

Die (Flash-) **Säulenchromatographie** erfolgte an Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße 40-60 μm).

Die **analytische Dünnschichtchromatographie** wurde auf mit Kieselgel 60 F_{254} beschichteten Aluminium- oder Glasplatten (Merck) durchgeführt. Die Produkte wurden mittels UV-Licht ($\lambda = 254$ bzw. 366 nm) oder durch Anfärbereagenzien (Lösungen von Anisaldehyd, Ninhydrin oder Phosphomolybdänsäure) sichtbar gemacht.

LC-MS-Spektren wurden an dem HPLC-System LCQ Advantage Max (1200 Serie) von Agilent auf einer Eclipse XDB-C18-Säule (5 μM , 150×4.6 mm) von Phenomenex aufgenommen.

Die Aufreinigung mittels **präparativer HPLC** wurde überwiegend an dem Gerät LC-8A (Shimadzu) und einer Nuleodur C-18 Gravity (5 μm) Säule mit einer VP50/21 Vorsäule durchgeführt (Machery Nagel). Alternativ wurde ein Gerät aus der 1200er Serie der Firma Agilent eingesetzt, wobei eine Chromolith SemiPrep C-18e 100-10mm Säule von Merck verwendet wurde.

Mikrowellen-unterstützte Reaktionen wurden mit Hilfe eines Discover[®] Reaktors der Firma CEM Corporation durchgeführt.

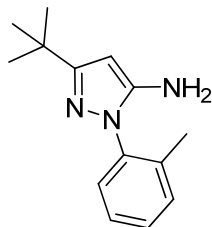
Der **HTRF**[®]-Assay wurde mit dem Assaykit HTRF[®]-KinEASE[™]-TK bzw. -STK auf auf 384-Mikrotiterplatten (Greiner bio-one) mit einem Kavitätvolumen von 20 μL ausgeführt.

9.2 Herstellung der Pyrazolharnstoffe

9.2.1.1 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der 3-*tert*-Butyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-5-amine (2.3).

Eine Lösung aus dem entsprechenden Phenylhydrazin oder Phenylhydrazin Hydrochlorid, 4,4-Dimethyl-3-oxopentannitril und HCl (konz.) in EtOH wurde für 24 Std. bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT herunter gekühlt, und die wässrige Phase mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaHCO₃-Lsg. (ges.) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Die detaillierte Aufreinigung ist für jedes Derivat separat beschrieben.

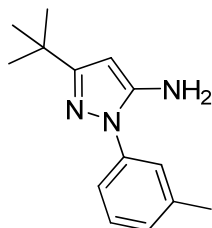
9.2.1.2 Herstellung von 3-*tert*-Butyl-1-*o*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-amin (2.3a).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *o*-Tolylhydrazin Hydrochlorid (0.5 g, 3.2 mmol), 4,4-Dimethyl-3-oxopentan-nitril (0.4 g, 3.2 mmol), EtOH (10 mL) und HCl (konz., 2 mL) umgesetzt. Umkristallisation des Rohproduktes aus PE/MeOH

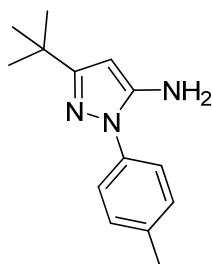
lieferte 318 mg (44 %) farblose, nadelförmige Kristalle: ^1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6) δ 7.30 (m, 4H), 5.42 (s, 1H), 4.42 (s, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.25 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.69, 147.94, 139.11, 137.57, 131.84, 129.25, 128.57, 127.25, 85.52, 32.84, 30.89, 17.91; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 230.16517 für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 230.16504.

9.2.1.3 Herstellung von 3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-amin (2.3b).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *m*-Tolylhydrazin (0.5 g, 3.2 mmol), 4,4-Dimethyl-3-oxopentannitril (0.5 g, 4.0 mmol), EtOH (10 mL) und HCl (konz., 2 mL) umgesetzt. Umkristallisation des Rohproduktes aus PE/MeOH lieferte 668 mg (74 %) farblose Kristalle: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34 (s, 1H), 7.30 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 7.10 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.49 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 162.23, 145.11, 139.80, 138.50, 129.34, 128.18, 125.20, 121.22, 87.67, 32.44, 30.51, 21.60; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 230.16517 für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 230.16503.

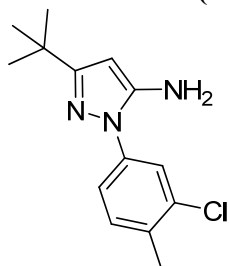
9.2.1.4 Herstellung von 3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-amin (2.3c).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *p*-Tolylhydrazin Hydrochlorid (0.5 g, 3.2 mmol), 4,4-Dimethyl-3-oxopentannitril (0.4 g, 3.2 mmol), EtOH (10 mL) und HCl (konz., 2 mL) umgesetzt. Umkristallisation des Rohproduktes aus PE/MeOH lieferte 423 mg (84 %) farblose, kubische Kristalle: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.47 (s, 1H), 3.75 (bs, 2H), 2.35 (s, 3H),

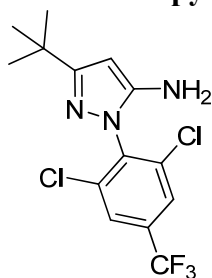
1.29 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.19, 145.04, 137.23, 136.17, 130.14, 124.33, 87.55, 32.42, 30.52, 21.28; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 230.16517 für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 230.16508.

9.2.1.5 Herstellung von 3-*tert*-Butyl-1-(3-chloro-4-methylphenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin (2.3d).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden (3-Chloro-4-methyl)phenylhydrazin Hydrochlorid (0.5 g, 2.6 mmol), 4,4-Dimethyl-3-oxopentannitril (0.4 g, 2.6 mmol), EtOH (10 mL) und HCl (konz., 2 mL) umgesetzt. Umkristallisation des Rohproduktes aus PE/MeOH lieferte 306 mg (45 %) weiße Kristalle: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.54 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 2.0, 8.1$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 3.83 (s, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.26 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.65, 145.23, 137.45, 135.04, 135.03, 131.51, 124.71, 122.11, 88.12, 32.42, 30.41, 19.87; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 264.12620 für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClN}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 264.12636.

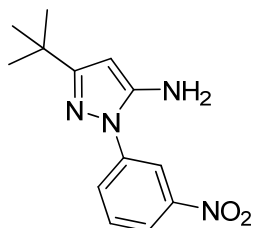
9.2.1.6 Herstellung von 3-*tert*-Butyl-1-(2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin (2.3e).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden (2,6-Dichloro-4-trifluoromethyl)phenylhydrazin (0.2 g, 0.8 mmol), 4,4-Dimethyl-3-oxopentannitril (0.1 g, 0.8 mmol), EtOH (10 mL) und HCl (konz., 2 mL) umgesetzt. Umkristallisation des Rohproduktes aus PE/MeOH lieferte 262 mg (94 %) weiße Kristalle: ^1H NMR

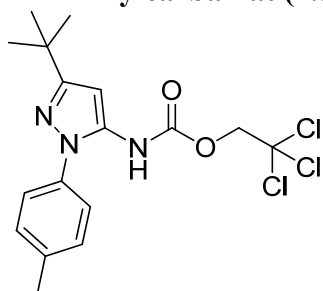
(400 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (s, 2H), 5.57 (s, 1H), 3.58 (bs, 2H), 1.29 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.40, 146.35, 137.27, 126.11, 123.75, 121.03, 118.31, 88.12, 32.66, 30.36; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 352.05896 für $\text{C}_{14}\text{H}_{15}^{35}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ und 354.06147 für $\text{C}_{14}\text{H}_{15}^{35}\text{Cl}^{37}\text{ClF}_3\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 352.05925 und 354.05587.

9.2.1.7 Herstellung von 3-*tert*-Butyl-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin (2.3f).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden 3-Nitrophenylhydrazin Hydrochlorid (2 g, 11 mmol), 4,4-Dimethyl-3-oxopentannitril (1.5 g, 12 mmol), EtOH (10 mL) und HCl (konz., 2 mL) umgesetzt. Es wurden 1.6 g (57 %) eines gelben Feststoffs erhalten, der ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.45 (t, $J = 2.1, 2.1$ Hz, 1H), 8.09 (m, 2H), 7.73 (t, $J = 8.2$ Hz, 8.2 Hz, 1H), 5.48 (bs, 2H), 5.47 (s, 1H), 1.23 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.12, 148.09, 147.96, 140.59, 130.48, 127.70, 119.59, 115.99, 88.22, 31.93, 30.03; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 261.13460 für $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 261.13456.

9.2.1.8 Herstellung von 2,2,2-Trichloroethyl 3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-ylcarbammat (2.5).



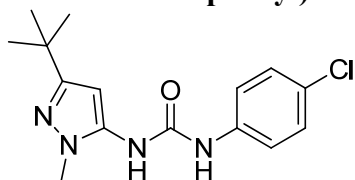
Eine Lösung aus **2.3c** (200 mg, 0.87 mmol), H_2O (6 mL), EtOAc (10 mL) und NaOH (52 mg, 1.3 mmol) wurde für 30 Min. bei 0°C gerührt und dann tropfenweise mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat (381 μL , 2.7 mmol) versetzt. Das Eisbad wurde entfernt und nach weiteren 2 Std. die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung (ges.) gewaschen (2 x

30 mL) über Na₂SO₄ getrocknet, und im Vakuum entfernt. Nach Kristallisation aus Hexan wurden 273 mg (78 %) farbloser Kristalle erhalten: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.72 (bs, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.32 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.37, 150.94, 138.62, 135.34, 134.99, 130.52, 125.11, 95.01, 94.91, 75.03, 32.63, 30.05, 21.36; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 404.06939 für C₁₇H₂₁Cl₃N₃O₂ [M+H⁺], Gefunden: 404.06895.

9.2.1.9 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der 1-(3-*tert*-Butyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoffe.

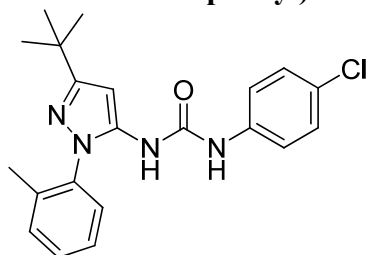
Eine Lösung aus Pyrazolamin und Isocyanat in abs. Toluol wurde für 24 Std. unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT herunter gekühlt und mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung (ges.) gewaschen (2 x 30 mL), über Na₂SO₄ getrocknet, und im Vakuum entfernt. Die detaillierte Aufreinigung ist für jedes Derivat separat beschrieben.

9.2.1.10 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (2.14).



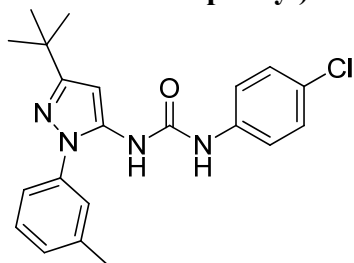
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde 3-*tert*-Butyl-1-methyl-1*H*-pyrazol-5-amin (0.2 g, 1.3 mmol) mit 4-Chlorophenylisocyanat (0.2 g, 1.3 mmol) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (20-60 % EtOAc/PE) und anschließender präparativer HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) wurden 91 mg (23 %) eines weißen Feststoffs isoliert: ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ 9.59 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.03 (s, 1H), 3.59 (s, 3H), 1.21 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ 158.31, 151.62, 138.32, 136.65, 128.45, 125.34, 119.52, 93.57, 34.74, 31.62, 30.18; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 307.13202 für C₁₅H₂₀³⁵ClN₄O [M+H⁺], Gefunden: 307.13214.

9.2.1.11 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*o*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (2.4a).



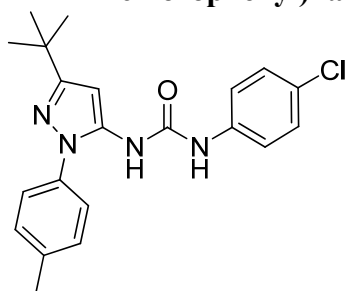
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde **2.3a** (30 mg, 0.13 mmol) mit 4-Chlorophenylisocyanat (21 mg, 0.13 mmol) umgesetzt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) wurden 32 mg (65 %) eines weißen Feststoffs isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.03 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 7.39 (m, 8H), 6.35 (s, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.26 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.37, 150.76, 138.36, 138.09, 137.88, 136.78, 130.83, 129.03, 128.46, 127.87, 126.58, 119.66, 119.38, 91.78, 31.85, 30.11, 16.81; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 383.1633 für C₂₁H₂₄³⁵ClN₄O [M+H⁺], Gefunden: 383.1641.

9.2.1.12 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (2.4b).



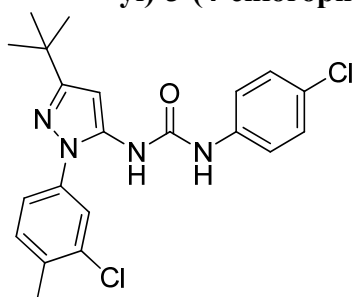
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde **2.3b** (37 mg, 0.16 mmol) mit 4-Chlorophenylisocyanat (25 mg, 0.16 mmol) umgesetzt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) wurden 39 mg (63 %) eines weißen Feststoffs isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.31 (m, 4H), 7.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.61, 151.46, 138.83, 138.39, 138.36, 136.97, 129.03, 128.61, 127.95, 125.58, 124.95, 121.38, 119.65, 95.28, 31.99, 30.18, 20.91; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 383.1633 für C₂₁H₂₄³⁵ClN₄O [M+H⁺], Gefunden: 383.1641; Berechnet: 385.1604 für C₂₁H₂₄³⁷ClN₄O [M+H⁺], Gefunden: 385.1612.

9.2.1.13 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (2.4c).



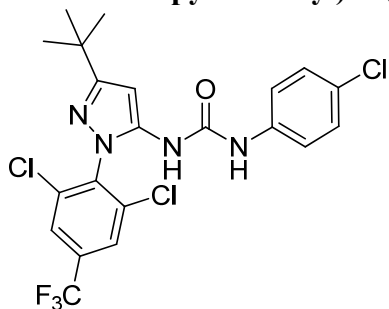
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde **2.3c** (50 mg, 0.2 mmol) mit 4-Chlorophenylisocyanat (34 mg, 0.2 mmol) umgesetzt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) wurden 58 mg (69 %) eines weißen Feststoffs isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.17 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.36 (m, 8H), 6.32 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.31 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.47, 151.51, 138.42, 136.90, 136.73, 136.04, 129.62, 128.60, 125.52, 124.26, 119.58, 95.33, 31.98, 30.18, 20.56; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 383.1633 für C₂₁H₂₄³⁵ClN₄O [M+H⁺], Gefunden: 383.1641.

9.2.1.14 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-(3-chloro-4-methylphenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (2.4d).



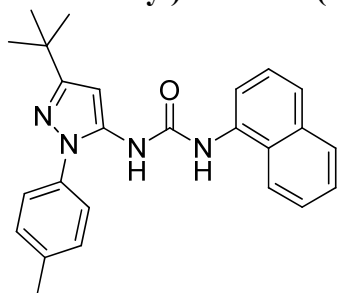
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde **2.3d** (48 mg, 0.2 mmol) mit 4-Chlorophenylisocyanat (29 mg, 0.2 mmol) umgesetzt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) wurden 32 mg (43 %) eines weißen Feststoffs isoliert: ¹H NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ 9.15 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.43 (m, 3H), 7.31 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.36 (s, 1H), 2.37 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz; DMSO-*d*₆) δ 161.06, 151.72, 138.36, 137.56, 137.17, 134.45, 133.40, 131.61, 128.65, 125.66, 124.21, 122.71, 119.74, 96.53, 32.08, 30.13, 19.18; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 417.12434 für C₂₁H₂₃³⁵Cl₂N₄O [M+H⁺], Gefunden: 417.12402.

9.2.1.15 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-(2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chloro-phenyl)harnstoff (2.4e).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde **2.3e** (50 mg, 0.14 mmol), mit 4-Chlorophenylisocyanat (22 mg, 0.14 mmol). Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) wurden 54 mg (77 %) eines weißen Feststoffs isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.83 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.42 (s, 1H), 1.26 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.91, 150.64, 139.28, 138.10, 138.00, 136.96, 136.96, 136.84, 136.29, 126.34, 125.80, 119.74, 91.40, 32.23, 30.08; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 505.0571 für C₂₁H₁₉³⁵Cl₃N₄OF₃ [M+H⁺], Gefunden: 505.0568.

9.2.1.16 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (2.4f).



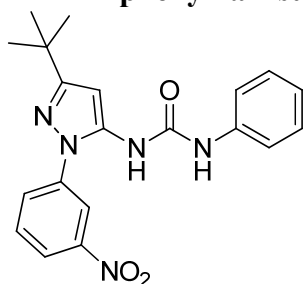
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde **2.3c** (49 mg, 0.22 mmol) mit Naphthylisocyanat (37 μL, 0.26 mmol) umgesetzt. Nach Umkristallisation (5 % EtOAc/Hexan) und anschließender Säulenchromatographie (20 % EtOAc/PE) wurden 33 mg (66 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.08 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.46 (m, 3H), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.40 (s, 1H), 2.39 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ 160.57, 152.07, 137.33, 136.85, 136.13, 134.02, 133.68, 129.75, 128.39, 126.09, 125.96, 125.82, 125.71, 124.44,

123.34, 121.51, 117.69, 94.84, 32.04, 30.25, 20.65; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 399.21794 für $C_{25}H_{27}N_4O_1$ $[M+H^+]$, Gefunden: 399.21710.

9.2.1.17 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der 1-(3-*tert*-Butyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoffe.

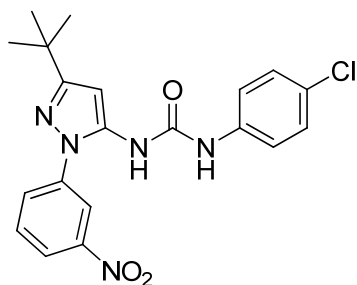
Eine Lösung aus Pyrazolamin und Isocyanat in abs. DCM wurde für 12 Std. bei RT umgesetzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach Umkristallisation (5 % EtOAc/Hexan) wurde ein weißer Feststoff erhalten. Abweichende Aufreinigungsschritte werden für jedes Derivat separat beschrieben.

9.2.1.18 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-phenylharnstoff (2.16a).



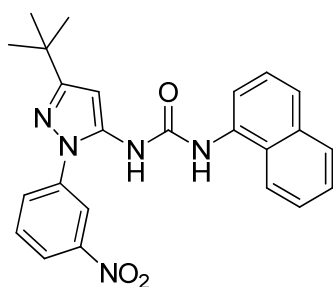
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurde **2.3f** (400 mg, 1.5 mmol) mit Phenylisocyanat (184 μ L, 1.7 mmol) umgesetzt. Nach Umkristallisation (5 % EtOAc/Hexan) wurden 312 mg (55 %) eines weißen Feststoffs erhalten: 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.00 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.38 (t, $J = 2.1, 2.1$ Hz, 1H), 8.22 (ddd, $J = 0.8, 2.2, 8.2$ Hz, 1H), 8.06 (ddd, $J = 0.9, 2.1, 8.1$ Hz, 1H), 7.81 (t, $J = 8.2, 8.2$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 1.1, 8.6$ Hz, 2H), 7.26 (m, 2H), 6.97 (t, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 1.31 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.89, 152.03, 148.11, 139.67, 139.26, 137.71, 130.78, 129.49, 128.78, 126.23, 121.35, 118.37, 117.84, 98.10, 32.18, 30.05; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 380.17172 für $C_{20}H_{22}N_5O_3$ $[M+H^+]$, Gefunden: 380.17200.

9.2.1.19 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (2.16b).



Eine Lösung des Amins **2.3f** (400 mg, 1.5 mmol) in DCM (5 mL) wurde mit 4-Chlorophenylisocyanat (265 mg, 1.7 mmol) für 12 Std. bei RT umgesetzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Feststoff in EtOAc/Hexan umkristallisiert, wobei 463 mg (73 %) eines weißen Feststoffs erhalten wurden: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.16 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.37 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.21 (ddd, $J = 0.94, 2.3, 8.3$ Hz, 1H), 8.05 (ddd, $J = 1.0, 2.1, 8.1$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.42 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 6.43 (s, 1H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.89, 152.05, 148.11, 139.65, 138.25, 137.50, 130.81, 129.45, 128.64, 125.78, 121.38, 119.92, 117.78, 98.49, 32.19, 30.04; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 414.13274 und 416.12979 für $\text{C}_{20}\text{H}_{21}^{35}\text{ClN}_5\text{O}_3$ und $\text{C}_{20}\text{H}_{21}^{37}\text{ClN}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 414.13240 und 416.12945.

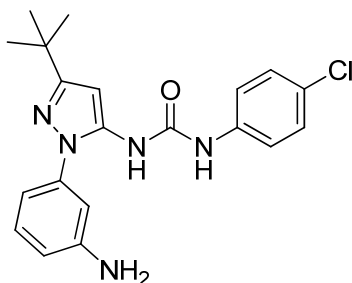
9.2.1.20 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (2.16c).



Eine Lösung des Amins **2.3f** (400 mg, 1.5 mmol) in DCM (5 mL) wurde mit 1-Naphthylisocyanat (242 μL , 1.7 mmol) für 12 Std. bei RT umgesetzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Feststoff wurde aus EtOAc/Hexan umkristallisiert, wobei 448 mg (69 %) eines weißen Feststoffs erhalten wurden:

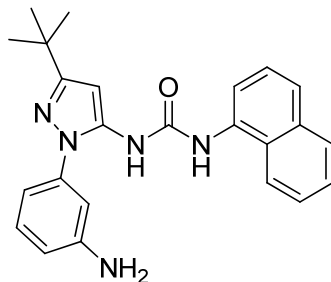
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.06 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.24 (t, J = 1.4, 8.2 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.84 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.45 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 1.31 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.92, 152.69, 148.13, 139.77, 137.77, 133.83, 133.68, 130.84, 129.54, 128.34, 126.68, 126.00, 125.78, 125.74, 123.89, 121.66, 121.37, 118.94, 117.74, 98.26, 32.20, 30.06. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 430.18737 für $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 430.18691.

9.2.1.21 Herstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-*tert*-butyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (2.17b).



In einem mit Argon gespülten Schlenkkolben wurde eine Lösung aus **2.16b** (108 mg, 0.26 mmol), Ammoniumchlorid (42 mg, 0.78 mmol) und Raney-Nickel (2 mL einer wässrigen Dispersion) in DMF (2 mL) für 1 Std. auf 45 °C erhitzt. Der Reaktionslösung wurden Wasser und EtOAc hinzugefügt, und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, bevor die Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurden. Nach Kristallisation aus MeOH/Hexan und Waschen mit Hexan wurden 61 mg (62 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.24 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 5.43 (bs, 2H), 1.26 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.20, 151.16, 149.73, 139.02, 138.44, 136.87, 129.53, 128.68, 125.53, 119.55, 112.97, 111.42, 109.97, 93.87, 31.99, 30.26; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 384.15856 für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}^{35}\text{ClN}_5\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 384.15938. Berechnet: 386.15561 für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}^{37}\text{ClN}_5\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 386.15635.

9.2.1.22 Herstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-*tert*-butyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (2.17c).

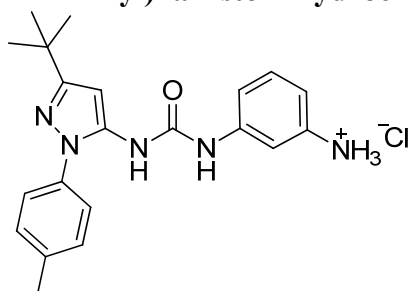


Eine Lösung aus **2.16c** (100 mg, 0.23 mmol), Ammoniumformiat (88.1 mg, 1.4 mmol) und Pd/C in absolutem EtOH (5 mL) wurde für 3 Std. bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert, und die Lösungsmittel wurden am Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) wurden 43 mg (44 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.12 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 7.9, 21.3 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.47 (td, *J* = 2.1, 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 2.1, 7.9, 7.8 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.64 (dd, *J* = 7.8, 15.0 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.4 (s, 2H), 1.28 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.21, 151.76, 149.74, 139.15, 137.19, 134.01, 133.64, 129.49, 128.33, 125.98, 125.87, 125.76, 125.64, 123.20, 121.43, 117.72, 112.91, 111.44, 109.94, 93.71, 31.94, 30.22; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 400.21319 für C₂₄H₂₆N₅O [M+H⁺], Gefunden: 400.21217.

9.2.1.23 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der Aminophenyl-3-(3-*tert*-butyl-1-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochloride.

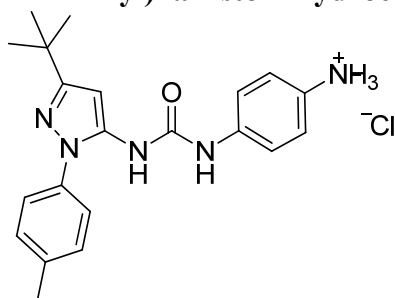
Zu einer Lösung *N*-Boc-phenylendiamin und DIPEA in abs. DMSO wurde unter Schutzgas Pyrazolamin **2.3c** zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 Std. auf 60 °C erhitzt, bevor Wasser und EtOAc hinzugegeben wurden. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit NaCl-Lösung (ges.) (2 x 30 mL) und Wasser (2 x 30 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt. Eine Lösung des Carbonats in Dioxan wurde mit HCl (4 M Lösung in Dioxan) umgesetzt. Nach 30 Min. wurde das Dioxan im Vakuum entfernt und das Produkt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

9.2.1.24 Herstellung von 1-(3-Aminophenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochlorid (2.19a).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *N*-Boc-*m*-phenylendiamin (21 mg, 0.1 mmol), DMSO (2 mL), DIPEA (40 μ L, 0.2 mmol) und **2.5** (40 mg, 0.1 mmol) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (30-100 % EtOAc/PE) wurde *tert*-Butyl 3-(3-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)phenylcarbamat (48 mg) erhalten, welches anschließend mit HCl (4 mL, 4 M Lösung in Dioxan) und Dioxan (1 mL) umgesetzt wurde, um ohne weitere Aufreinigung 35 mg (97 %) eines weißen Feststoffs zu liefern: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6) δ 8.20 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.93 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.46 (s, 2H), 6.32 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 2.40 (s, 3H), 1.33 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, Aceton- d_6) δ 152.11, 145.43, 140.19, 139.05, 135.76, 130.09, 125.95, 122.05, 117.23, 113.25, 101.99, 101.58, 95.19, 29.75, 24.23, 20.17. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 364.2059 für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 364.2132.

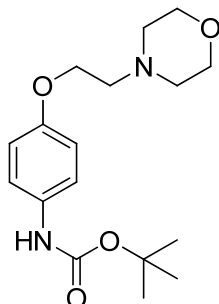
9.2.1.25 Herstellung von 1-(4-Aminophenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochlorid (2.19b).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *N*-Boc-*p*-phenylendiamin (129 mg, 0.6 mmol), DMSO (2 mL), DIPEA (400 μ L, 2.3 mmol) und **2.5** (250 mg, 0.6 mmol) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (30-100 % EtOAc/PE) wurde *tert*-Butyl-4-(3-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)phenylcarbamat (339 mg, 96 %) erhalten, welches anschließend mit HCl (4 mL, 4 M Lösung in Dioxan) und

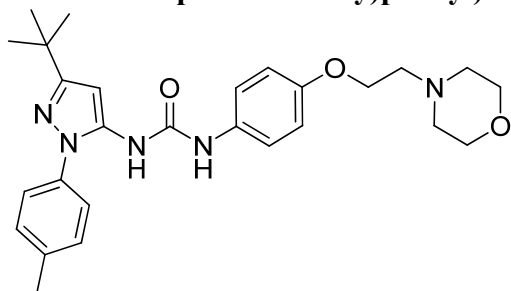
Dioxan (1 mL) umgesetzt wurde, um ohne weitere Aufreinigung 239 mg (97 %) eines weißen Feststoffs zu liefern: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.30 (s, 2H), 9.47 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 8.1$, 8.8 Hz, 4H), 6.36 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.38, 151.83, 139.41, 137.28, 137.03, 135.56, 129.73, 125.20, 124.41, 123.89, 118.69, 95.93, 32.06, 30.16, 20.68; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 364.21319 für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 364.21316.

9.2.1.26 Herstellung von *tert*-Butyl-4-(2-morpholinoethoxy)phenylcarbammat (2.9b).



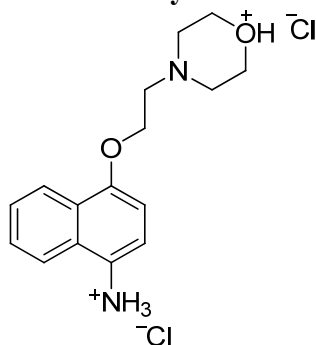
N-Boc-4-aminophenol (150 mg, 0.7 mmol) wurde mit 4-(2-Chloroethyl)morpholin Hydrochlorid (116 mg, 0.8 mmol) und K_2CO_3 (210 mg, 1.5 mmol) in MeCN (10 mL) bei 80 °C umgesetzt. Nach 3 Std. wurde die Reaktionsmischung auf RT herunter gekühlt und mit EtOAc und H_2O verdünnt. Die organischen Phasen wurden mit H_2O (2 x 10 mL) und ges. NaCl.-Lsg. (2 x 10 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (80 % EtOAc/PE) wurden 203 mg (90 %) eines Feststoffs erhalten: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.26 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 4.09 (t, $J = 5.2$, 5.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 4H), 2.80 (s, 2H), 2.60 (s, 4H), 1.50 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 154.94, 153.35, 131.94, 120.74, 115.27, 67.00, 66.24, 60.59, 57.86, 54.24, 28.59; MS (ESI) m/z 323 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

9.2.1.27 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-morpholinoethoxy)phenyl)harnstoff (2.11).



2.9b (190 mg, 0.6 mmol) wurde in Dioxan (2 mL) gelöst und mit HCl (4 M in Dioxan, 1 mL) umgesetzt. Nach 16 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene 4-(2-Morpholinoethoxy)anilin Hydrochlorid wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Anschließend wurde **2.5** (70 mg, 0.17 mmol) mit 4-(2-Morpholinoethoxy)anilin Hydrochlorid (45 mg, 0.17 mmol) und DIPEA (113 μ L, 0.7 mmol) in abs. DMSO (1 mL) umgesetzt. Nach 5 Std. bei 60 °C wurde die Reaktionsmischung auf RT herunter gekühlt und mit EtOAc (10 mL) und H₂O (10 mL) verdünnt. Die organischen Phasen wurden mit H₂O (2 x 10 mL) und ges. NaCl.-Lsg. (2 x 10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) wurden 46 mg (59 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.79 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.38 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 4.02 (t, J = 5.7, 5.7 Hz, 2H), 3.57 (m, 4H), 2.66 (t, J = 5.6, 5.6 Hz, 2H), 2.46 (bs, 4H), 2.37 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.43, 153.70, 151.60, 137.30, 136.67, 136.05, 132.45, 129.61 (2C), 124.30 (2C), 119.77 (2C), 114.68 (2C), 94.75, 66.13 (2C), 65.51, 57.02, 53.58 (2C), 31.94, 30.17 (3C), 20.54; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 478.28127 für C₂₇H₃₆N₅O₃ [M+H⁺], Gefunden: 478.28069.

9.2.1.28 Herstellung von 1-Amino-4-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)naphthalen Dihydrochlorid (2.9a).



2.9a wurde in drei Schritten (i-iii) hergestellt.

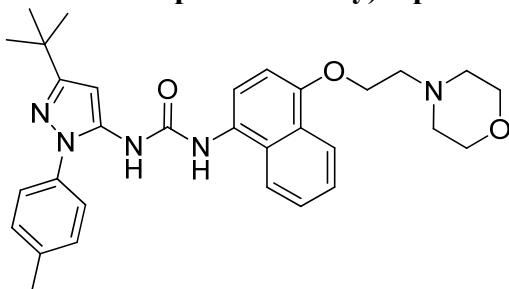
i) **Herstellung von *tert*-Butyl-4-hydroxynaphthalen-1-ylcarbamat.** 4-Amino-1-naphthol Hydrochlorid (1.1 g, 5.1 mmol), Di-*tert*-butyl-dicarbonat (2.4 mL, 10.2 mmol) und TEA (1 mL, 7.2 mmol) wurden in abs. MeOH (15 mL) über Nacht bei RT umgesetzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (30 % EtOAc/PE) gereinigt. Nach Umkristallisation (Chloroform) wurde *tert*-Butyl-4-hydroxynaphthalen-1-ylcarbamat in Form von rosa Kristallen erhalten.

ii) **Herstellung von *tert*-Butyl 4-(2-morpholinoethoxy)naphthalen-1-ylcarbamat.** *tert*-Butyl 4-hydroxynaphthalen-1-ylcarbamat (100 mg, 0.4 mmol) wurde mit 4-(2-Chloroethyl)morpholin Hydrochlorid (78 mg, 0.4 mmol) und K₂CO₃ (213 mg, 1.5 mmol) in MeCN (10 mL) umgesetzt. Nach 3 Std. bei 80 °C wurde die Reaktionsmischung auf RT herunter gekühlt und mit EtOAc und H₂O verdünnt. Die organischen Phasen wurden mit H₂O (2 x 10 mL) und ges. NaCl.-Lsg. (2 x 10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (80 % EtOAc/PE) wurde *tert*-Butyl 4-(2-morpholinoethoxy)-naphthalen-1-ylcarbamat erhalten.

iii) **Herstellung von 1-Amino-4-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)naphthalen Dihydrochlorid (2.9a).** *tert*-Butyl 4-(2-morpholinoethoxy)naphthalen-1-ylcarbamat (100 mg, 0.28 mmol) und HCl (4 M in Dioxan, 1 mL) wurden in Dioxan (2 mL) umgesetzt. Nach 16 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel entfernt und der erhaltene Feststoff ohne weitere Aufreinigung verwendet: ¹H NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆) δ

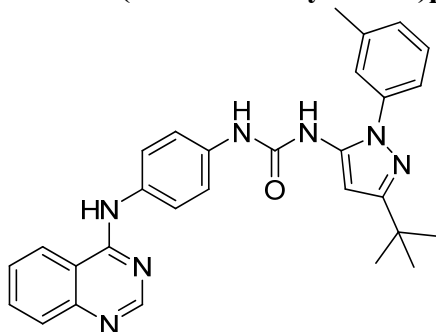
10.83 (bs, 2H), 8.41 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.69 (m, 3H), 7.07 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.69-4.61 (m, 2H), 3.94 (bs, 4H), 3.75-3.66 (m, 2H), 3.41 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz; DMSO- d_6) δ 152.71, 127.45, 126.55, 125.10, 122.55, 122.02, 121.49, 120.66, 109.28, 104.64, 63.14, 62.84, 54.68, 51.47; MS (ESI) m/z 273 (MH^+).

9.2.1.29 Herstellung von 1-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-morpholinoethoxy)naphthalen-1-yl)harnstoff (2.10, BIRB-796).



2.5 (113 mg, 0.3 mmol), **2.9a** (86 mg, 0.3 mmol) und DIPEA (148 μL , 0.8 mmol) wurden in abs. DMSO (1 mL) umgesetzt. Nach 5 Std. bei 60 $^{\circ}\text{C}$ wurde die Reaktionsmischung auf RT herunter gekühlt und mit EtOAc (10 mL) und H_2O (10 mL) verdünnt. Die organischen Phasen wurden mit H_2O (2 x 10 mL) und ges. NaCl.-Lsg. (2 x 10 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/ H_2O mit 0.1 % TFA) wurden 65 mg (44 %) eines rosa Feststoffs erhalten: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.77 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.57 (m, 3H), 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 4.26 (t, $J = 5.6, 5.6$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J = 4.6, 4.7$ Hz, 4H), 2.86 (t, $J = 5.4, 5.4$ Hz, 2H), 2.55 (bs, 4H), 2.39 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 160.41, 152.61, 150.57, 137.34, 136.47, 136.18, 129.50, 128.27, 126.80, 126.13, 125.16, 125.14, 124.15, 121.93, 121.85, 120.11, 104.98, 94.96, 65.60, 56.56, 53.15, 31.90, 30.13, 20.56; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 528.29692 für $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 528.29629.

9.2.1.30 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(chinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (2.6f).



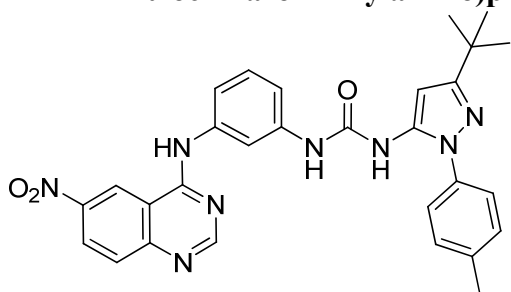
Ein Zweihalskolben wurde unter Schutzgas mit Chinazolin-4-ol (400 mg, 2.7 mmol) und Thionylchlorid (5 mL) befüllt. DMF (kat.) wurde zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht unter Rückfluss bei 78 °C erhitzt. Das Thionylchlorid wurde am Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und über Silicagel filtriert, was zum 4-Chloro-6-nitrochinazolin führte und anschließend am Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde. Eine Lösung aus dem Pyrazolharnstoff **2.3a** (14 mg, 0.04 mmol) DIPEA (15 µL, 0.1 mmol) in DCM (2 mL) wurde für 10 Min. gerührt und dann mit dem 4-Chloro-6-nitrochinazolin (6.5 mg, 0.04 mmol) umgesetzt. Nach 16 Std. bei RT wurde die Reaktionsmischung mit NaHCO₃ (ges., 20 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurden 15 mg (77 %) eines Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆) δ 9.10 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.88-7.77 (m, 4H), 7.58 (m, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.36 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 6.48 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.32 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, Aceton-*d*₆) δ 162.09, 158.79, 155.62, 152.42, 151.22, 140.10, 140.00, 138.17, 136.63, 135.10, 133.52, 129.93, 129.30, 128.82, 127.09, 125.98, 123.62, 122.32, 119.63, 116.40, 96.10, 33.06, 30.79, 21.42; MS (ESI) *m/z* 492 [M+H⁺].

9.2.1.31 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der 1-(3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(3-(6-nitrochinazolinyl-amino)phenyl)harnstoffe (2.18a,d).

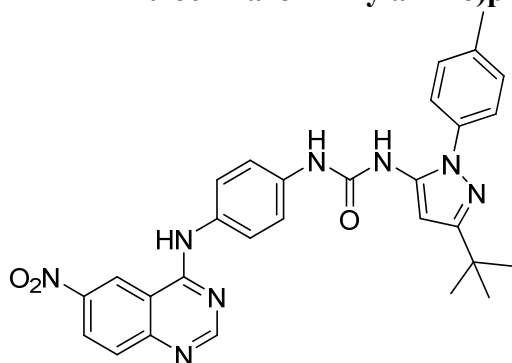
Ein Zweihalskolben wurde unter Schutzgas mit **2.5** und Thionylchlorid befüllt. DMF (kat.) wurde zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht unter Rückfluss bei 78 °C erhitzt. Das Thionylchlorid wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM

aufgenommen und über Silicagel filtriert, was zum 4-Chloro-6-nitrochinazolin führte und anschließend am Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde. Eine Lösung aus dem Pyrazolharnstoff **2.19a** oder **b** und DIPEA in DCM wurde mit dem 4-Chloro-6-nitrochinazolin versetzt und für 24 Std. bei RT gerührt. Anschließend wurde NaHCO₃-Lösung (ges.) zugegeben und die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung wird für jede Verbindung separat beschrieben.

9.2.1.32 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(3-(6-nitrochinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (**2.18c**).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **2.19a** (100 mg, 0.3 mmol), DIPEA (140 μ L, 1 mmol) und 4-Chloro-6-nitrochinazolin (58 mg, 0.3 mmol) in DCM (5 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurden 102 mg (69 %) eines gelben Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.45 (s, 1H), 9.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.56 (dd, *J* = 2.4, 9.2 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.38 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.53, 158.87, 157.69, 153.12, 151.42, 144.54, 139.64, 138.80, 137.18, 136.87, 136.01, 129.74, 129.50, 128.82, 126.66, 124.47, 120.99, 116.80, 114.45, 114.36, 112.64, 94.68, 32.03, 30.24, 20.64; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 537.23571 für C₂₉H₂₉N₈O₃ [M+H⁺], Gefunden: 537.23513.

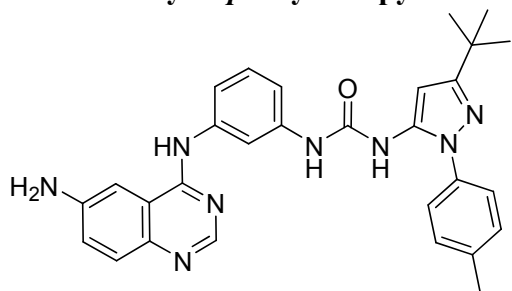
9.2.1.33 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(6-nitrochinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (2.18a).

Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **2.19b** (132 mg, 0.3 mmol), DIPEA (170 μ L, 1 mmol) und 4-Chloro-6-nitrochinazolin (69.2 mg, 0.3 mmol) in DCM (2 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurden 140 mg (79 %) eines orangen Feststoffs erhalten: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.41 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.53 (dd, $J = 2.3, 9.2$ Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160.54, 158.69, 157.85, 153.12, 151.50, 144.40, 137.32, 136.85, 136.18, 136.05, 132.58, 129.74, 129.40, 126.55, 124.46, 123.69, 120.83, 118.13, 114.38, 94.78, 32.05, 30.26, 20.65; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 537.23571 für $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 537.23513.

9.2.1.34 Allgemeine Beschreibung für die Herstellung von (6-Aminochinazolin-4-ylamino)phenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoffe (2.18b,d).

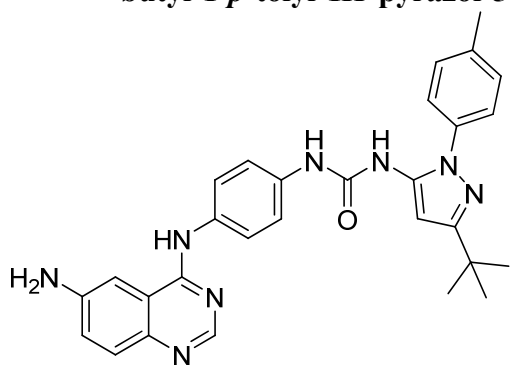
Eine Lösung von **2.18a** oder **c**, Ammoniumformiat und Pd/C in abs. EtOH wurde für 3 Std. bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Für die Säulenchromatographie wurde zuvor das Silicagel mit 5 % Et_3N in DCM neutralisiert.

9.2.1.35 Herstellung von 1-(3-(6-Aminochinazolin-4-ylamino)phenyl)-3-(3-tert-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff (2.18d).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **2.18b** (80 mg, 0.15 mmol), Ammoniumformiat (66 mg, 1 mmol) und Pd/C (kat.) in EtOH (1.5 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (2-5 % MeOH/DCM) wurden 54 mg (72 %) eines gelben Feststoffs erhalten: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.30 (s, 1H), 9.16 (bs, 1H), 8.48 (bs, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.37 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.21 (dd, $J = 9.1, 16.5$ Hz, 3H), 6.36 (s, 1H), 5.56 (s, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.70, 156.21, 151.73, 149.99, 147.43, 142.78, 140.56, 139.71, 137.14, 136.97, 136.28, 129.91, 128.83, 128.37, 124.63, 123.77, 116.94, 115.83, 112.96, 111.67, 101.38, 94.91, 32.23, 30.45, 20.84; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 507.26153 für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 507.26088.

9.2.1.36 Herstellung von 1-(4-(6-Aminochinazolin-4-ylamino)phenyl)-3-(3-tert-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff (2.18c).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **2.18a** (100 mg, 0.2 mmol), Ammoniumformiat (82.3 mg, 1.3 mmol) und Pd/C (kat.) in EtOH (3 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (2-5 % MeOH/DCM) wurden 51 mg (54 %) eines gelben Feststoffs erhalten: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.24 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.32 (s,

1H), 8.23 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.38-7.30 (m, 7H), 7.18 (dd, $J = 1.4, 8.9$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.24 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.52, 156.03, 151.56, 149.99, 147.13, 142.44, 137.33, 136.80, 136.07, 134.73, 134.33, 129.72, 128.59, 124.44, 123.41, 122.58, 118.20, 116.58, 101.13, 94.74, 32.04, 30.26, 20.65; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 507.26153 für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 507.26083.

9.2.2 Expression und Aufreinigung von p38 α

Das p38 α -Konstrukt wurde in einen pNFG-Vektor geklont und mit einem N-terminalen His-Tag und einer Thrombin-Schnittstelle in BL21 (DE3) Rosetta *E. coli* transformiert (Jeffrey Simard). Zunächst wurden über Nacht Vorkulturen in Erlenmeyerkolben (2 x 200 mL) bei 37 °C in LB (*Lysogeny Broth*)-Medium herangezogen. Nach der Inkubation wurden die Bakterienkulturen mit 2.1 L vorgewärmtem Medium (37 °C) verdünnt und anschließend bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.6 angezüchtet (1.5 Std.), bevor die Kulturen im Eisbad auf 18 °C herunter gekühlt und dann die Proteinexpression (~20 Std.) mit IPTG (0.5 mM) induziert wurde. Die Bakterienkulturen wurden bei 4000 rpm für 45 Min. zentrifugiert und das entstandene Zellpellet bei -80 °C gelagert.

Für die Proteinaufreinigung wurden die Zellen zunächst in Puffer A (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl + 5 % Glycerol + 25 mM Imidazol) wieder aufgenommen, mit Endonuklease (Benzonase[®], 20 U/mL) versetzt und mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax[®]) dispergiert. Schließlich wurden die Zellen mit einem Mikrofluidizer[®] aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert, und das Zellysate vor der weiteren Aufreinigung filtriert (0.45 μm Sterilfilter).

Das Lysat wurde auf eine 30 mL-Ni-Säule (selbstgepackt) geladen, mit 3 Säulenvolumina (SV) Puffer A gewaschen und dann mit einem 0-50 % linearen Gradienten mit Ni-Puffer B (Puffer A + 500 mM Imidazol) eluiert (2 SV). Das Protein wurde über Nacht gegen Dialysepuffer (25 mM HEPES, pH 7.0, 5 % Glycerol, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) dialysiert und anschließend mit Thrombin (0.2 U/mg ungespaltenes Protein) gespalten (über Nacht in einem 50 mL Falcon bei 4 °C). Um gebildetes Präzipitat abzutrennen, wurde das Protein zentrifugiert (15 Min. bei 13000 rpm).

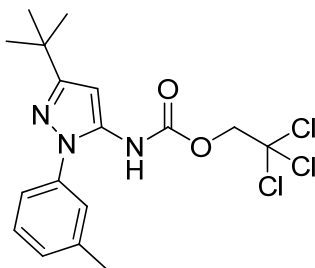
Der Überstand wurde verdünnt (4-fach mit Anionenaustausch-Puffer A (50 mM Tris, pH 7.4, 5 % Glycerol, 50 mM NaCl, 1 mM DTT)), auf eine QFF-Säule (GE Healthcare) geladen und mit 10 SV Anionenaustausch-Puffer A gewaschen. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0-100 % Anionenaustausch-Puffer B (Anionenaustausch-Puffer A + 600 mM NaCl) mit 20 SV eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt, auf 3 mL konzentriert und die Probe über einer Sephadex (HiLoad 26/60 Superdex 75) Säule bei einer Flussrate von 2 mL/Min. aufgetrennt. Die Säule wurde zuvor mit Gelfiltrationspuffer (20 mM HEPES, pH 7.1, 5 % Glycerol, 50 mM NaCl, 100 mg/L Methionin, 10 mM DTT) äquilibriert. Das eluierte Protein wurde auf ~15 mg/mL konzentriert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. (Die Expression und Aufreinigung erfolgte unter der Anleitung von Christian Grütter und Jeffrey Simard.)

9.2.3 Kristallisation der p38 α -Inhibitor-Komplexe

Die verschiedenen Inhibitoren wurden mit der aufgereinigten p38 α -Kinase unter publizierten Bedingungen co-kristallisiert.⁶¹ Die Protein-Inhibitor-Komplexe wurden durch die Inkubation (1-2 Std.) von 40 μ L p38 α (10-12 mg/mL) mit 0.4-0.6 μ L Inhibitor (100 mM in DMSO) auf Eis erhalten. Die Kristalle wurden in 24-well-Kristallisationsplatten unter Verwendung der Wasserdampfdiffusionsmethode mit hängenden Tropfen erhalten, wobei 1.6 μ L Protein-Inhibitor-Lösung mit 0.4 μ L Reservoir-Lösung (100 mM MES, pH 5.6-6.2, 20-30 % PEG4000 und 50 mM β -Octylglucopyranosid) gemischt wurden.

9.3 Herstellung der Typ-II-Hybridinhibitoren

9.3.1.1 Herstellung von 2,2,2-Trichloroethyl 3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-ylcarbammat (3.3).^{60,145}

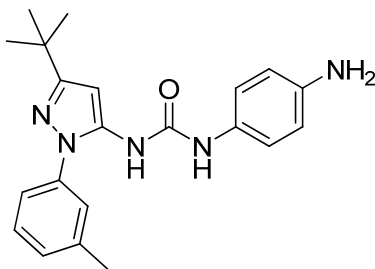


Eine Lösung aus **2.3b** (500 mg, 2.2 mmol), H₂O (6 mL), EtOAc (10 mL) und NaOH (130 mg, 3.3 mmol) wurde für 30 Min. bei 0 °C gerührt und dann tropfenweise mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat (440 µL, 3.3 mmol) versetzt. Das Eisbad wurde nach 30 Min. entfernt und nach weiteren 2 Std. wurde die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung (ges.) gewaschen (2 x 30 mL) und über Na₂SO₄ getrocknet, bevor die Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurden. Nach Kristallisation aus Hexan wurden 536 mg (61 %) farbloser Kristalle erhalten: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.33 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.52, 150.98, 140.32, 137.78, 134.97, 129.70, 129.37, 126.09, 121.99, 95.04, 75.05, 32.65, 30.51, 21.59, HRMS (ESI-MS) Berechnet: 404.06393 für C₁₇H₂₁O₂N₃³⁵Cl₃ und 406.06644 für C₁₇H₂₁O₂N₃³⁵Cl₂³⁷Cl [M+H⁺], Gefunden 404.06900 und 406.06556.

9.3.1.2 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der Aminophenyl-3-(3-*tert*-butyl-1-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochloride (**3.4a,b**).^{60,145}

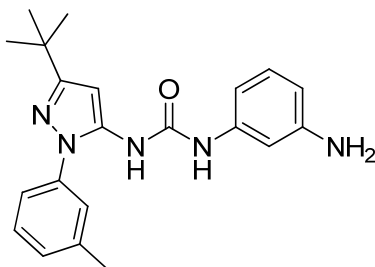
Zu einer Lösung *N*-Boc-phenylendiamin und DIPEA in abs. DMSO wurde unter Schutzgas **3.3** zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 Std. auf 60 °C erhitzt, bevor Wasser und EtOAc hinzugegeben wurden. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit NaCl-Lösung (ges.) (2 x 30 mL) und Wasser (2 x 30 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt. Eine Lösung des Carbonats in Dioxan wurde mit HCl (4 M Lösung in Dioxan) umgesetzt. Nach 30 Min. wurde das Dioxan im Vakuum entfernt und das Produkt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

9.3.1.3 Herstellung von 1-(4-Aminophenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochlorid (**3.4a**).



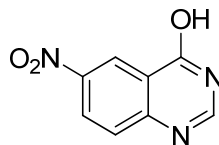
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *N*-Boc-*p*-phenylendiamin (157 mg, 0.8 mmol), DMSO (2 mL), DIPEA (400 μ L, 2.3 mmol) und **3.3** (305 mg, 0.8 mmol) verwendet. Nach Säulenchromatographie (30-100 % EtOAc/PE) wurden 339 mg (96 %) *tert*-Butyl-4-(3-(3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)-phenyl-carbamat erhalten, die anschließend mit HCl (4 mL, 4 M Lösung in Dioxan) und Dioxan (1 mL) umgesetzt wurden, um ohne weitere Aufreinigung 249 mg (86 %) **3.4a** zu erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.27 (bs, 2H), 9.78 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.35 (m, 5H), 7.21 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 2.37 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.54, 151.83, 139.44, 138.87, 138.08, 137.18, 129.06, 128.08, 125.14, 124.94, 123.86, 121.41, 118.72, 95.96, 32.06, 30.18, 20.99; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 364.21319 für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 364.21315.

9.3.1.4 Herstellung von 1-(3-Aminophenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochlorid (**3.4b**).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *N*-Boc-*m*-phenylendiamin (92 mg, 0.4 mmol), DMSO (2 mL), DIPEA (150 μ L, 0.9 mmol) und **3.3** (180 mg, 0.6 mmol) verwendet. Nach Säulenchromatographie (30-50 % EtOAc/PE) wurden 150 mg (74 %) *tert*-Butyl-3-(3-(3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)phenyl-carbamat erhalten, die anschließend (150 mg, 0.3 mmol) mit HCl (3 mL, 4 M Lösung in Dioxan) und Dioxan (1 mL) umgesetzt wurden, um ohne weitere Aufreinigung 120 mg (92 %) des weißen Feststoffs **3.4b** zu erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.98 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.40-7.32 (m, 5H), 7.21 (d, $J = 7.35$ Hz, 1H), 6.98 (m, 1H), 6.38 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.55, 151.81, 140.76, 138.90, 138.06, 137.09, 132.08, 130.14, 129.08, 128.10, 124.91, 121.37, 117.26, 116.49, 112.44, 96.07, 32.07, 30.18, 21.01; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 364.21319 für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 364.21316.

9.3.1.5 Herstellung von 6-Nitrochinazolin-4-ol (3.6).

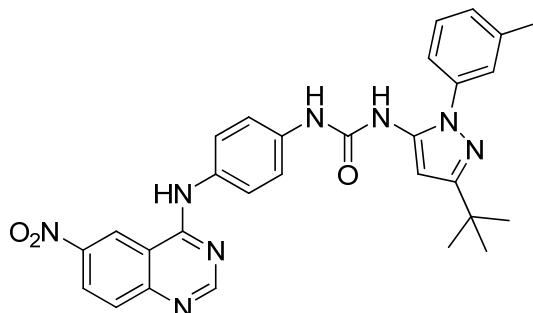


2-Amino-5-nitrobenzoesäure **3.5** (9.5 g, 52 mmol) wurde mit Formamidinacetat (22 g, 210 mmol) in 2-Methoxyethanol (300 mL) unter Rückfluss bei 132 °C über Nacht umgesetzt, und dann im Vakuum eingengt. Das Präzipitat wurde filtriert, mit MeOH gewaschen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum, wurden 7.95 g (79 %) eines braunen Feststoffs erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.70 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.48 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.54, 152.89, 148.92, 144.88, 129.00, 128.18, 126.64, 121.86; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 192.04037 für $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 192.04018.

9.3.1.6 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der 1-(3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-((6-nitrochinazolinyl-amino)phenyl)harnstoffe (3.7a,b).

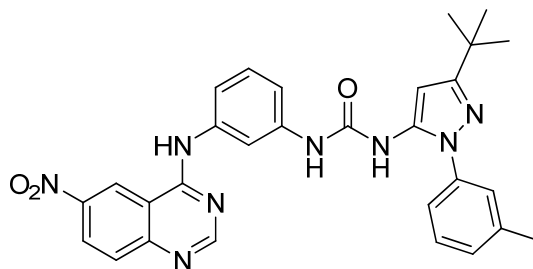
Ein Zweihalskolben wurde unter Schutzgas mit **3.6** und Thionylchlorid befüllt. DMF (kat.) wurde zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht unter Rückfluss bei 78 °C erhitzt. Das Thionylchlorid wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und über Silicagel filtriert, was zum 4-Chloro-6-nitrochinazolin führte und anschließend am Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde. Eine Lösung aus dem Pyrazolharnstoff **3.4a** oder **b** und DIPEA in DCM wurde mit dem 4-Chloro-6-nitrochinazolin versetzt und für 24 Std. bei RT gerührt. Anschließend wurde NaHCO_3 -Lösung (ges.) zugegeben und die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung wurde für jede Verbindung separat beschrieben.

9.3.1.7 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(6-nitrochinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (3.7a).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **3.4a** (100 mg, 0.3 mmol), DIPEA (171 μ L, 1 mmol), DCM (2 mL) und 4-Chloro-6-nitrochinazolin (52 mg, 0.3 mmol) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurden 98 mg (73 %) eines orangen Feststoffs erhalten: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.40 (s, 1H), 9.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.54 (dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.42 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.24 (d, $J = 7.43$ Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 2.40 (s, 3H), 1.29 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160.11, 158.70, 157.86, 153.13, 151.54, 144.43, 138.91, 138.43, 137.26, 136.17, 132.59, 129.42, 129.11, 128.01, 126.57, 125.06, 123.69, 121.51, 120.85, 118.12, 114.39, 94.95, 32.05, 30.24, 20.99; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 537.23571 für $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 537.23518.

9.3.1.8 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(3-(6-nitrochinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (3.7b).



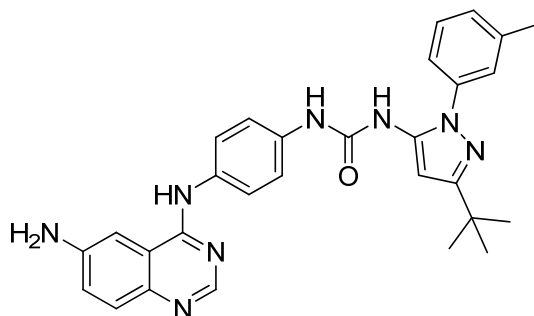
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **3.4b** (120 mg, 0.3 mmol), DIPEA (154 μ L, 0.9 mmol), DCM (2 mL) und 4-Chloro-6-nitrochinazolin (63 mg, 0.3 mmol) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurden 78 mg (49 %) eines orangen Feststoffs erhalten: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.44 (s, 1H), 9.68

(d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.55 (dd, $J = 2.2, 9.2$ Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 7.5, 15.7$ Hz, 3H), 7.24 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 6.40 (s, 1H), 2.40 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.67, 158.86, 157.68, 153.11, 151.41, 144.52, 139.62, 138.94, 138.81, 138.39, 137.24, 129.49, 129.13, 128.82, 128.05, 126.64, 125.12, 121.56, 120.98, 116.81, 114.45, 114.38, 112.64, 94.73, 32.05, 30.24, 20.99; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 537.23571 für $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 537.23513.

9.3.1.9 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der (6-Aminochinazolin-4-ylamino)phenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoffe (3.7c, d).

Eine Lösung von **3.7a** oder **b**, Ammoniumformiat und Pd/C in abs. EtOH wurde für 3 Std. bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Für die Säulenchromatographie wurde zuvor das Silicagel mit 5 % Et_3N in DCM neutralisiert. Die weitere Aufreinigung wurde für jede Verbindung separat beschrieben.

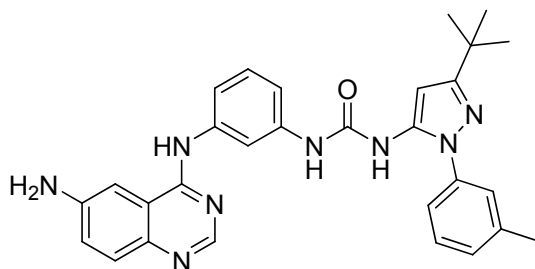
9.3.1.10 Herstellung von 1-(4-(6-Aminochinazolin-4-ylamino)phenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff (3.7b).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **3.7a** (86 mg, 0.16 mmol), Ammoniumformiat (71 mg, 1.1 mmol), EtOH und Pd/C verwendet. Nach Säulenchromatographie (2-5 % MeOH/DCM) wurden 80 mg (98 %) eines gelben Feststoffs erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.25 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.36 (m, 5H), 7.28 (d, $J = 25.1$ Hz, 1H), 7.22 (dd, $J = 2.3, 8.9$ Hz, 1H), 6.38 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.29 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ

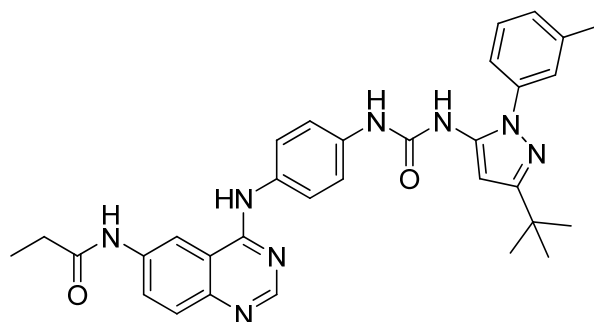
160.64, 156.02, 151.57, 149.97, 147.13, 142.40, 138.89, 138.45, 137.36, 134.70, 134.34, 129.09, 128.57, 127.98, 125.05, 123.41, 126.58, 121.50, 118.25, 116.57, 101.12, 94.88, 32.05, 30.24, 20.99; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 507.26153 für $C_{29}H_{31}N_8O$ $[M+H^+]$, Gefunden: 507.26084.

9.3.1.11 Herstellung von 1-(3-(6-Aminochinazolin-4-ylamino)phenyl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff (3.7d).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **3.7b** (50 mg, 0.09 mmol), Ammoniumformiat (41 mg, 0.7 mmol), EtOH und Pd/C verwendet. Nach der Säulenchromatographie (2-5 % MeOH/DCM) wurden nach einem zweiten Aufreinigungsschritt mittels präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) 17 mg (36 %) eines grünen Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.31 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.38 (m, 5H), 7.23 (m, 4H), 6.40 (s, 1H), 5.57 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.66, 156.00, 151.36, 149.76, 147.14, 142.55, 140.38, 139.39, 138.93, 138.38, 137.34, 129.12, 128.62, 128.05, 125.14, 123.58, 121.58, 116.75, 116.55, 115.66, 112.78, 111.46, 101.16, 94.54, 32.04, 30.24, 20.98; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 507.26153 für $C_{29}H_{31}N_8O$ $[M+H^+]$, Gefunden: 507.26083.

9.3.1.12 Herstellung von *N*-(4-(4-(3-(3-*tert*-Butyl-1-*m*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)phenylamino)chinazolin-6-yl)propionamid (3.7e).



Unter Schutzgas wurde ein Schlenkkolben mit **3.7c** (15 mg, 30 μmol), abs. THF (1 mL) und DIPEA (13 μL , 74 μmol) befüllt und auf 0 °C herunter gekühlt. 10 μL Propionylchlorid wurden in 10 mL abs. THF gelöst. Diese Lösung (190 μL) wurde zu der Reaktionslösung getropft und das Eisbad entfernt. Nach 1.5 Std. wurden nochmals 100 μL zugetropft bis ein vollständiger Umsatz beobachtet wurde. Die Reaktionsmischung wurde mit Et_3N alkalisiert bevor ges. NaCl-Lösung und EtOAc zugegeben wurden. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit Wasser gewaschen (2 x 10 mL). Letztere wurden über Na_2SO_4 getrocknet, die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurden 12 mg (72 %) des gelben Feststoffs isoliert: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.31 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 9.39 (bs, 1H), 8.89 (bs, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 8.9, 16.8$ Hz, 3H), 7.40 (m, 5H), 7.20 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 2.43 (m, 5H), 1.28 (s, 9H), 1.13 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.49, 160.92, 157.82, 153.61, 152.38, 146.63, 139.11, 138.92, 137.74, 137.18, 135.86, 133.95, 129.34, 128.46, 128.12, 127.19, 125.14, 123.58, 121.59, 118.40, 115.73, 112.26, 96.12, 32.40, 30.60, 29.71, 21.35, 10.01; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 563.28775 für $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 563.28726.

9.3.2 Zellkultur und Immunoblots

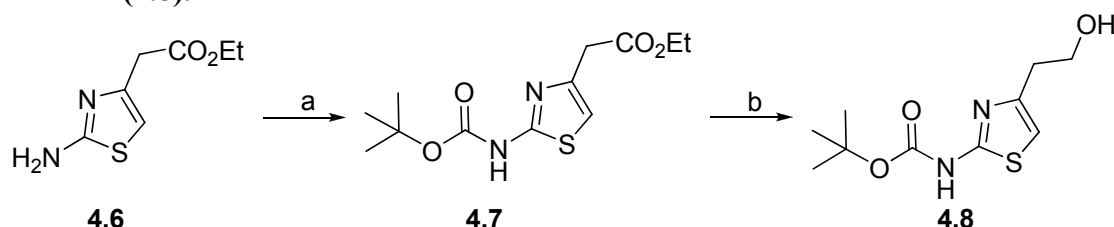
Die PC3 und DU145 Zellen wurden in großzügiger Weise von Roman Thomas (MPI Köln) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) angereichert mit 10 % inaktiviertem fötalem Rinderserum (FBS) und 100 u/mL Penicillin/Streptomycin kultiviert (bei 37 °C in befeuchteter Warmluft mit 5 % CO_2). Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Inhibitor (5 Std.) inkubiert und mit kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen (2x) und dann für 10 Min. bei 0 °C in Lysis-Puffer (Lysis Puffer von Cell Signaling Technology (10x)/ H_2O (1:10), 0.4 mM PMSF) lysiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (20 Min. bei 20000g und 4 °C). Der Überstand wurde für die Immunoblots verwendet.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit einem Spektrophotometer ND-1000 (peQLab) bestimmt, so dass eine gleichmäßige Auftragung für die Trennung mittels SDS-PAGE gewährleistet war. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

übertragen. Die Blots wurden dann 1 Std. lang in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween-20 (TBST) und 5 % fettfreier Milch (Konzentrat) geblockt. Anschließend wurden sie über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern (anti-phospho-FAK, anti-phospho-Src, anti-FAK, anti-Src) inkubiert. Die Antikörper wurden von Cell Signaling Technology bezogen. Die Blots wurden gewaschen (TBST) und mit den sekundären Antikörpern inkubiert (1 Std.). Nach erneutem Waschen (TBST) wurden die Blots dann mittels ECL-Technologie auf Filme übertragen.

9.4 Herstellung der Thiazolharnstoffe

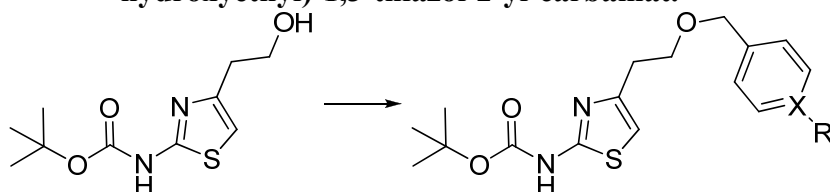
9.4.1.1 Herstellung von *tert*-Butyl 4-(2-hydroxyethyl)-1,3-thiazol-2-yl-carbamat (4.8).



Zu einer Lösung aus Ethyl-(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)acetat (3.72 g, 20 mmol) in THF (100 mL) wurde bei 0 °C portionsweise innerhalb von 5 Min. Boc_2O (4.3 g, 20 mmol) zugegeben. Et_3N (5.6 mL, 40 mmol) wurde zugetropft, sowie eine katalytische Menge DMAP zugegeben (0.1 g).¹⁴⁶ Nach 18 Std. bei RT wurde EtOAc (200 mL) zugegeben und die organische Phase nacheinander mit wässr. HCl (1 N, 300 mL) und ges. NaCl-Lsg. (2 x 200 mL) gewaschen, bevor sie über (MgSO_4) getrocknet wurde. Die organische Phase wurde über Silicagel filtriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reaktion wurde zweimal durchgeführt und die Produkte vereinigt. Nach Flash-Säulenchromatographie (20 % EtOAc/Cyclohexan) wurden 5.6 g (49 %) Ethyl-{2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1,3-thiazol-4-yl}acetat **4.7** erhalten und direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt. **4.7** (5.6 g, 20 mmol) wurde in EtOH (90 mL) gelöst und im Eisbad gekühlt. NaBH_4 (2.2 g, 60 mmol) wurde portionsweise zugegeben und der Ansatz für 18 Std. bei RT gerührt, bevor die Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurden.¹⁴⁷ Der Rückstand wurde in EtOAc (200 mL) aufgenommen, die organische Phase mit ges. NaCl-Lsg. (2 x 50 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach Flash-Säulenchromatographie

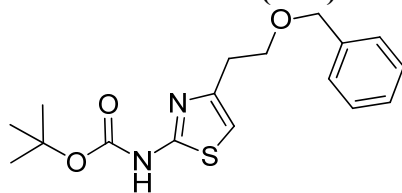
wurden 2.18 g (47 %) **4.7** erhalten: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.09 (bs, 1H), 6.52 (s, 1H), 3.89 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.87 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 1.53 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 160.5, 152.4, 149.2, 107.3, 82.2, 61.9, 33.3, 28.2. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 335.14239 für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 335.14247.

9.4.1.2 Allgemeine Beschreibung für die Alkylierung von *tert*-Butyl 4-(2-hydroxyethyl)-1,3-thiazol-2-yl-carbamat.



4.8 wurde in abs. THF (~ 5 mL/mmol) gelöst, NaH (60 %, 3 mol Äquiv.) zugegeben und der Reaktionsansatz für 10 Min. unter Schutzgas gerührt, bevor das Benzylbromid (1-1.2 mol Äquiv.) zugegeben wurde. Nach 48-72 Std. bei RT wurde H_2O (10-20 mL) zugegeben, und das THF im Vakuum entfernt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc oder DCM (3 x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Flashchromatographie wurde das alkylierte Produkt erhalten. Weitere Details sind in den jeweiligen Durchführungen beschrieben.

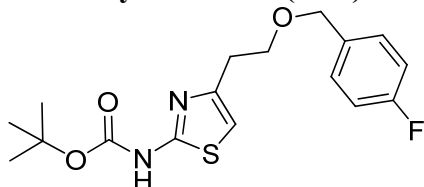
9.4.1.3 Herstellung von *tert*-Butyl 4-[2-(benzyloxy)ethyl]-1,3-thiazol-2-yl-carbamat (**4.8a**).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.8** (1.0 g, 4.1 mmol), NaH (0.49 g, 12.2 mmol) und Benzylbromid (0.49 mL, 4.1 mmol) in THF (20 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (10 % EtOAc/Cyclohexan) wurde das Produkt **4.9a** (1.05 g, 76 %) als klares Öl erhalten: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.94 (bs, 1H), 7.38-7.19 (m, 5H), 6.57 (s, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.75 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.54 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 161.5, 154.4, 149.8, 139.6,

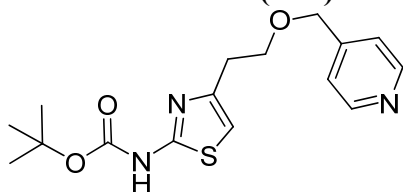
129.3, 128.8, 128.6, 108.9, 82.8, 73.8, 70.1, 32.8, 28.5. ESI: 335 ($[M+H]^+$, 100 %), 278 (85); HRMS (ESI-MS) Berechnet: 335.14239 für $C_{17}H_{23}N_2O_3S$ $[M+H]^+$, Gefunden: 335.14247.

9.4.1.4 Herstellung von *tert*-Butyl 4-{2-[(4-fluorobenzyl)oxy]ethyl}-1,3-thiazol-2-ylcarbammat (4.9b).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.8** (0.20 g, 0.82 mmol), NaH (0.098 g, 2.5 mmol) und Fluorobenzylbromid (0.11 mL, 0.90 mmol) in THF (4 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (30 % EtOAc/Cyclohexan) wurde das Produkt **4.9b** (0.16 g, 55 %) als klares Öl erhalten: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.88 (bs, 1H), 7.15-7.12 (m, 2H), 6.85-6.89 (m, 2H), 6.47 (s, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.63 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.96 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 162.1 ($^1J_{C-F} = 249.1$ Hz, 2C), 160.8, 152.6, 148.4, 133.9, 129.2 ($^3J_{C-F} = 8.0$ Hz, 2C), 115.0 ($^2J_{C-F} = 21.0$ Hz, 2C), 107.3, 82.3, 72.1, 68.9, 31.6, 28.1; ESI: 375 (40 %), 353 ($[M+H]^+$, 100), 296 (45); HRMS (ESI-MS) Berechnet: 353.13297 für $C_{17}H_{22}FN_2O_3S$ $[M+H]^+$, Gefunden: 353.13307.

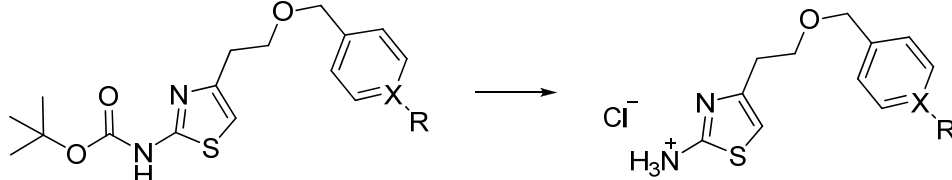
9.4.1.5 Herstellung von *tert*-Butyl 4-[2-(4-pyridinylmethoxy)ethyl]-1,3-thiazol-2-ylcarbammat (4.9c).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.8** (0.20 g, 0.82 mmol), NaH (0.13 g, 4.0 mmol) und 4-(Bromomethyl)pyridin Hydrobromid (0.23 g, 0.90 mmol) in THF (4 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (EtOAc) wurde das Produkt **4.9c** (0.13 g, 50 %) als klares Öl erhalten: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.50 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 6.55 (s, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.75 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.03 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.50 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.6, 152.6, 149.8,

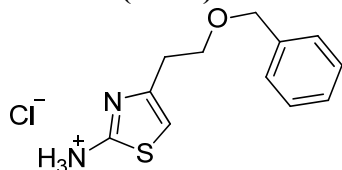
148.2, 147.6, 121.5, 107.5, 82.3, 71.0, 69.6, 31.7, 28.2; ESI: 670 ($2[M+H^+]$, 50 %), 336 (100), 235 (30); HRMS (ESI-MS) Berechnet: 336.13764 für $C_{16}H_{22}N_3O_3S$ $[M+H^+]$, Gefunden: 336.13772.

9.4.1.6 Allgemeine Beschreibung für die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe



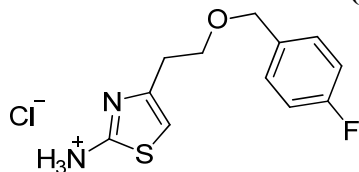
Das *tert*-Butyl-carbamate wurde in Dioxan (evtl. etwas MeOH) gelöst und HCl (4 M in Dioxan) hinzugegeben. Nach 14-96 Std. bei RT und unter Schutzgas wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

9.4.1.7 Herstellung von 4-[2-(Benzyloxy)ethyl]-1,3-thiazol-2-aminiumchlorid (4.10a).



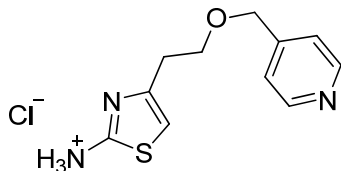
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.9a** (0.30 g, 0.90 mmol) und HCl in Dioxan (4 M, 4 mL) und MeOH (2 mL) umgesetzt, was letztlich **4.10a** (0.24 g, quantitativ) als weißes Harz lieferte: 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.31-7.25 (m, 5H), 6.54 (br s, 1H), 4.54 (s, 2H), 3.70 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 139.5, 139.3, 129.5, 129.0, 128.9, 104.0, 74.0, 68.4, 68.1, 29.5; ESI: 235 ($[M+H^+]$, 100 %), 91 (20); HRMS (ESI-MS) Berechnet: 235.08996 für $C_{12}H_{15}N_2OS$ $[M+H^+]$, Gefunden: 235.08982.

9.4.1.8 Herstellung von 4-{2-[(4-Fluorobenzyl)oxy]ethyl}-1,3-thiazol-2-aminiumchlorid (4.10b).



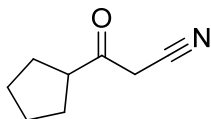
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.9b** (0.15 g, 0.43 mmol) und HCl in Dioxan (4 M, 10 mL) in Dioxan (4 mL) umgesetzt, was letztlich **4.10b** (0.12 g, quantitativ) als weißes Harz lieferte: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7.34-7.31 (m, 2H), 7.07-7.02 (m, 2H), 6.55 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.70 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 171.9, 163.7 ($^1J_{\text{C-F}} = 245.0$ Hz), 139.3, 135.4, 130.9 ($^3J_{\text{C-F}} = 8.0$ Hz, 2C), 116.0 ($^2J_{\text{C-F}} = 23.0$ Hz, 2C), 104.0, 73.1, 68.4, 29.5; ESI: 504 (10 %), 253 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, 100). HRMS (ESI-MS) Berechnet: 253.08054 für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 253.08060.

9.4.1.9 Herstellung von 4-[2-(4-Pyridinylmethoxy)ethyl]-1,3-thiazol-2-aminiumchlorid (**4.10c**).



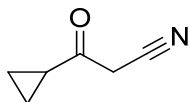
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.9c** (0.13 g, 0.39 mmol), HCl in Dioxan (4 M, 10 mL) in MeOH (2 mL) umgesetzt, was letztlich **4.10b** (0.12 g, quantitativ) als weißes Harz lieferte: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8.85 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.95 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 172.0, 162.2, 142.3, 138.3, 125.8, 104.5, 69.9, 68.1, 29.3; ESI: 470 ($2[\text{M}+\text{H}^+]$, 50 %), 236 (100); HRMS (ESI-MS) Berechnet: 236.08521 für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 236.08532.

9.4.1.10 Herstellung von 3-Cyclopentyl-3-oxopropan-nitril (**4.14b**).



4.14b wurde ausgehend von Methylcyclopentancarboxylat (5.3 mL, 38 mmol), NaH (1.7 g, 42 mmol) und abs. Acetonitril (2.4 mL, 46 mmol) in abs. THF (20 mL) entsprechend der Patentliteratur hergestellt.¹¹⁰ Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und das Produkt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

9.4.1.11 Herstellung von 1-Cyclopropylbut-3-yn-1-on (4.14a).

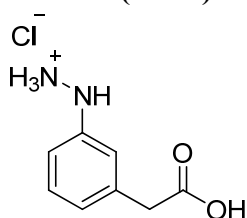


Zu einer Suspension aus NaH (4.2 g, 110 mmol) in THF (15 mL) wurde bei 70 °C eine Lösung aus Methylcyclopropancarboxylat (10 mL, 96 mmol) und abs. Acetonitril (6.1 mL, 116 mmol) in abs. THF (10 mL) zugetropft. Nach 16 Std. bei 70 °C wurde die Lösung auf RT herunter gekühlt und mit EtOAc und wässr. HCl verdünnt. Die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Der orange Feststoff wurde für 30 Min. in PE unter Rückfluss erhitzt und anschließend filtriert, was zu dem Produkt **4.14a** (10.1 g, 96 %) führte: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.59 (s, 2H), 2.11-2.05 (m, 1H), 1.19-1.15 (m, 2H), 1.09-1.04 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 197.82, 114.11, 32.87, 20.33, 13.13.

9.4.1.12 Allgemeine Beschreibung für die Herstellung der Hydrazinoessigsäure Hydrochloride 4.16a und b.

Die Herstellung der Hydrazinoessigsäure Hydrochloride erfolgte gemäß der Patentliteratur.¹¹⁰ Zu einer Lösung der Aminoessigsäure in HCl (konz.) wurde bei 0 °C eine wässr. Lösung von NaNO₂, und nach einer weiteren Stunde eine Lösung von SnCl₂ x 2 H₂O in HCl (konz.) zugegeben. Nach 2 Std. bei RT wurde mit EtOAc (4 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, und das Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum lieferte das gewünschte Produkt, das ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet wurde.

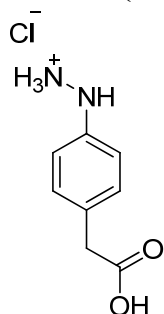
9.4.1.13 Herstellung von 2-(3-(Carboxymethyl)phenyl)hydrazinium Chlorid (4.16a).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *m*-Aminoessigsäure (9.8 g, 63 mmol) in HCl (konz., 10 mL), NaNO₂ (4.3 g, 63 mmol) in H₂O (10 mL) und

$\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (28.4 g, 126 mmol) in HCl (konz., 5 mL) umgesetzt, und ein braunes Öl gewonnen, das ohne weitere Aufreinigung eingesetzt wurde.

9.4.1.14 Herstellung von 2-(4-(Carboxymethyl)phenyl)hydrazinium Chlorid (4.16b).

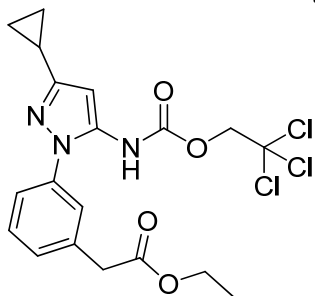


Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden *p*-Aminoessigsäure (9.8 g, 63 mmol) in HCl (konz., 10 mL), NaNO_2 (4.3 g, 63 mmol) in H_2O (10 mL) und $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (28.4 g, 126 mmol) in HCl (konz., 5 mL) umgesetzt, und ein brauner Feststoff gewonnen, der ohne weitere Aufreinigung eingesetzt wurde.

9.4.1.15 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der Carbamate 4.17a-e.

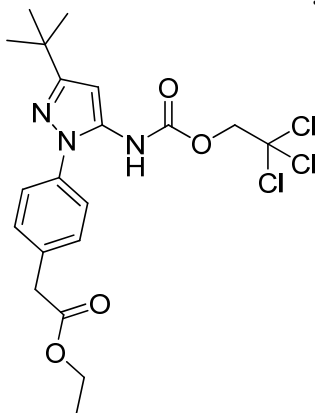
Eine Lösung aus Hydrazin Hydrochlorid und Nitril in EtOH wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und lieferte ein Pyrazolamin, welches anschließend in EtOAc gelöst, und mit H_2O und NaOH für 30 Min. bei 0 °C umgesetzt wurde. Zu dieser Reaktionslösung wurde 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat getropft. Nach 30 Min. bei 0 °C und weiteren 2 Std. bei RT wurde die wässrige Phase mit EtOAc (4 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lsg. (2 x 10 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, und im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung ist für jede Verbindung separat beschrieben.

9.4.1.16 Herstellung von Ethyl 2-(3-(3-cyclopropyl-5-((2,2,2-trichloroethoxy)carbonylamino)-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (4.17a).



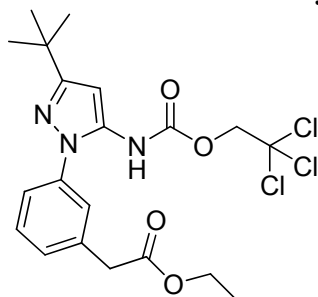
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.16a** (4.1 g, 20 mmol) und **4.14a** (2.2 g, 20 mmol) zu 2-(3-(5-Amino-3-cyclopropyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat umgesetzt, von dem anschließend 3.3 g (10 mmol) mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat (1.6 mL, 12 mmol), NaOH (0.7 g, 20 mmol), H₂O (10 mL) und EtOAc (15 mL) zur Reaktion gebracht wurden. Nach Säulenchromatographie (20 % EtOAc/PE) wurden 418 mg (9 %, 3 Stufen) **4.17a** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.46-7.37 (m, 2H), 7.35-7.27 (m, 2H), 7.07 (bs, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.14 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 1.98-1.89 (m, 1H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.95-0.89 (m, 2H), 0.80-0.73 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.29, 156.30, 155.63, 137.97, 136.22, 135.46, 130.04, 129.40, 126.03, 123.41, 95.00, 94.90, 75.12, 61.39, 41.07, 14.41, 9.74, 8.16; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 460.05922 für C₁₉H₂₁O₄N₃³⁵Cl₃ [M+H⁺], Gefunden: 460.05880 und Berechnet: 462.05627 für C₁₉H₂₁O₄N₃³⁵Cl₂³⁷Cl [M+H⁺], Gefunden: 462.05542.

9.4.1.17 Herstellung von Ethyl 2-(4-(3-*tert*-butyl-5-((2,2,2-trichloroethoxy)carbonylamino)-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (4.17c).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.16b** (4.0 g, 20 mmol) und Pivaloylacetonitril (2.7 g, 20 mmol) zu Ethyl 2-(4-(5-amino-3-*tert*-butyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat umgesetzt, das in PE unter Rückfluss erhitzt wurde und 3.8 g (63 %) eines orangen Feststoffs lieferte. Von diesem wurden 2.0 g (6.6 mmol) mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat (912 μ L, 6.6 mmol), NaOH (0.4 g, 10 mmol), H₂O (10 mL) und EtOAc (15 mL) zur Reaktion gebracht. Nach Säulenchromatographie (20 % EtOAc/PE) wurden 3.1 g (97 %) **4.17c** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.43-7.34 (m, 4H), 6.98 (bs, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.12 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 1.31 (s, 9H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.57, 162.83, 151.29, 137.12, 135.29, 134.74, 131.08, 125.42, 95.66, 95.21, 75.27, 61.56, 41.31, 32.86, 30.67, 14.59; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 476.09052 für C₂₀H₂₅O₄N₃³⁵Cl₃ [M+H⁺], Gefunden: 476.09025 und Berechnet: 478.08757 für C₂₁H₂₅O₄N₃³⁵Cl₂³⁷Cl [M+H⁺], Gefunden: 478.08683.

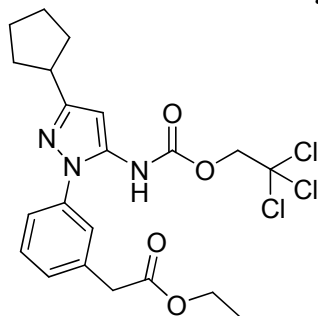
9.4.1.18 Herstellung von Ethyl 2-(3-(3-*tert*-butyl-5-((2,2,2-trichloroethoxy)carbonylamino)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (**4.17b**).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.16a** (4.0 g, 20 mmol) und Pivaloylacetonitril (2.7 g, 20 mmol) zu Ethyl 2-(3-(5-amino-3-*tert*-butyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat umgesetzt, von dem anschließend 6.0 g (20 mmol) mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat (3 mL, 20 mmol), NaOH (1.6 g, 40 mmol), H₂O (20 mL) und EtOAc (20 mL) zur Reaktion gebracht wurden. Die Umkristallisation des Feststoffs aus EtOAc/PE lieferte 3.55 g (37 %) von **4.17c**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.46-7.38 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.97 (bs, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.79 (2H), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 1.32 (s, 9H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.24, 162.73, 151.05, 138.18, 136.19, 135.01, 130.01, 129.29, 126.11, 123.50, 95.41, 95.03, 75.07, 61.35, 41.12, 32.65, 30.48, 14.40; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 476.09052 für C₂₀H₂₅O₄N₃³⁵Cl₃ [M+H⁺],

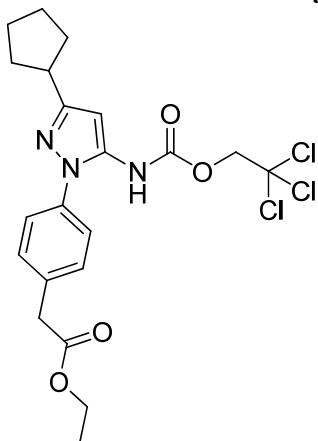
Gefunden: 476.09031 und Berechnet: 478.08757 für $C_{21}H_{25}O_4N_3^{35}Cl_2^{37}Cl$ $[M+H^+]$,
Gefunden: 478.08687.

9.4.1.19 Herstellung von Ethyl 2-(3-(3-cyclopentyl-5-((2,2,2-trichloroethoxy)carbonylamino)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (4.17d).



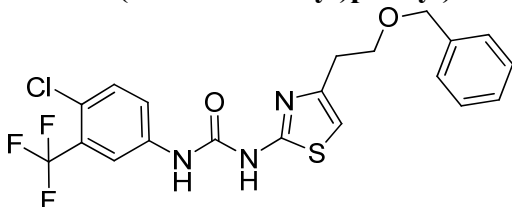
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.16a** (3.8 g, 19 mmol) und **4.14b** (2.6 g, 19 mmol) zu Ethyl 2-(3-(5-amino-3-cyclopentyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat umgesetzt, von dem anschließend 6.2 g (20 mmol) mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat (2.7 mL, 20 mmol), NaOH (1.6 g, 40 mmol), H₂O (20 mL) und EtOAc (20 mL) zur Reaktion gebracht wurden. Nach Säulenchromatographie (20 % EtOAc/PE) wurden 476 mg (5 %) des Feststoffs **4.17d** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.45-7.37 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.08 (bs, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.09-2.00 (m, 2H), 1.79-1.22 (m, 6H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.30, 170.75, 158.52, 151.07, 138.04, 136.16, 129.98, 129.32, 126.05, 123.42, 96.11, 95.03, 75.11, 61.37, 41.07, 39.58, 33.43, 25.65, 14.39; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 488.09052 für $C_{21}H_{25}O_4N_3^{35}Cl_3$ $[M+H^+]$, Gefunden: 488.09024 und Berechnet: 490.08757 für $C_{21}H_{25}O_4N_3^{35}Cl_2^{37}Cl$ $[M+H^+]$, Gefunden: 490.08689.

9.4.1.20 Herstellung von Ethyl 2-(4-(3-cyclopentyl-5-((2,2,2-trichloroethoxy)carbonylamino)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (4.17e).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.16b** (3.8 g, 19 mmol) und **4.14b** (2.6 g, 19 mmol) zu Ethyl 2-(4-(5-amino-3-cyclopentyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat umgesetzt, von dem anschließend 1.0 g (3.2 mmol) mit 2,2,2-Trichloroethyl Chloroformiat (0.44 mL, 3.19 mmol), NaOH (0.3 g, 10 mmol), H₂O (10 mL) und EtOAc (10 mL) zur Reaktion gebracht wurde. Nach Säulenchromatographie (20 % EtOAc/PE) wurden 842 mg (55 %) des Feststoffs **4.17e** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.41-7.34 (m, 4H), 7.03 (bs, 1H), 6.33 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.09-3.00 (m, 1H), 2.07-1.99 (m, 2H), 1.79-1.58 (m, 6H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.35, 158.42, 151.15, 136.94, 135.21, 134.44, 130.82, 125.02, 96.24, 95.01, 75.06, 61.33, 41.08, 39.58, 33.40, 25.64, 14.37; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 488.09052 für C₂₁H₂₅O₄N₃³⁵Cl₃ [M+H⁺], Gefunden: 488.09016 und Berechnet: 490.08757 für C₂₁H₂₅O₄N₃³⁵Cl₂³⁷Cl [M+H⁺], Gefunden: 490.08676.

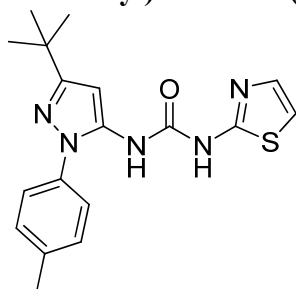
9.4.1.21 Herstellung von 1-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)harnstoff (4.2).



Eine Lösung aus **4.10a** (31 mg, 0.11 mmol) in abs. DCM (2 mL) wurde mit 1-Chloro-4-isocyanato-2-(trifluoromethyl)benzen (25 mg, 0.11 mmol) und DIPEA (58 µL,

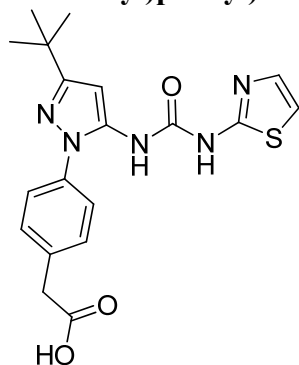
0.34 mmol) umgesetzt. Nach 12 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-1.5 % MeOH/DCM) wurden 14 mg (36 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.88 (bs, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.37-7.24 (m, 5H), 6.75 (s, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.70 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 138.65, 138.49, 132.10, 128.26, 128.07, 127.52, 127.42, 126.92, 126.74 ($^2J_{\text{C-F}} = 30.6$ Hz), 126.43, 123.52, 123.06, 122.74 ($^3J_{\text{C-F}} = 272.1$ Hz), 117.18 ($^1J_{\text{C-F}} = 5.5$ Hz), 107.26, 71.79, 68.42, 31.11; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 456.07549 für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_3^{35}\text{ClF}_3\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 456.07498 und Berechnet: 458.07254 für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_3^{37}\text{ClF}_3\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 458.07212.

9.4.1.22 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(thiazol-2-yl)harnstoff (4.5a).

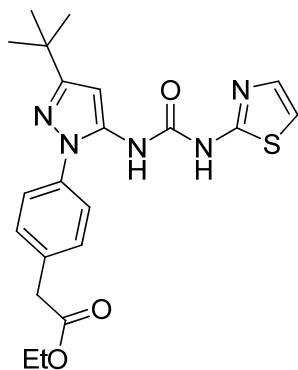


Thiazol-2-amin (13 mg, 0.12 mmol), **2.5a** (50 mg, 0.12 mmol) und DIPEA (58 μL , 0.34 mmol) wurden in abs. DMSO (2 mL) gelöst und für 30 Min. bei 100 °C in der Mikrowelle (100 W) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde auf RT herunter gekühlt und mit EtOAc und H_2O versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit ges. NaCl-Lsg. und H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-2 % MeOH/DCM) wurden 25 mg (59 %) **4.5a** erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.88 (bs, 1H), 8.86 (bs, 1H), 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.36-7.32 (m, 3H), 7.12 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 2.37 (s, 3H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.66, 159.30, 150.81, 150.56, 137.06, 136.28, 135.70, 129.76, 124.52, 112.68, 94.82, 32.06, 30.21, 20.63. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 356.15396 für $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{ON}_5\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 356.15405.

9.4.1.23 Herstellung von 2-(4-(3-*tert*-Butyl-5-(3-thiazol-2-ylureido)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (4.5b und c).

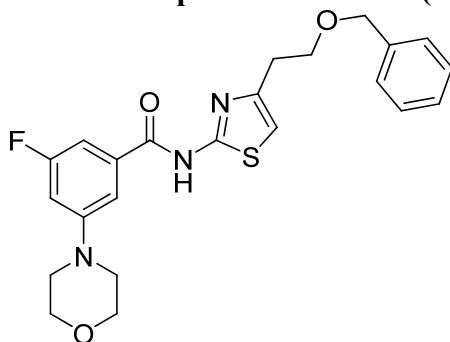


Thiazol-2-amin (43 mg, 0.31 mmol), **4.17c** (150 mg, 0.31 mmol) und DIPEA (174 μ L, 1 mmol) wurden in abs. DMSO (2 mL) gelöst und bei 60 °C über Nacht umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT herunter gekühlt EtOAc und H₂O hinzugesetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit ges. NaCl-Lsg. und H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH/H₂O (1:1, 3 mL) aufgenommen und wässrige LiOH-Lsg. (2 Äq.) wurde zugegeben. Nach 30 Min. wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (5 mL) und Ameisensäure (verd., 5 mL) versetzt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) gefolgt von Säulenchromatographie (1-2 % MeOH/DCM) wurden 15 mg (12 %) **4.5c** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.04 (bs, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 3.66 (s, 2H), 1.28 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.58, 160.88, 159.52, 150.77, 137.33, 136.75, 136.36, 134.53, 130.35, 124.30, 112.64, 95.03, 40.23, 32.09, 30.20. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 400.143709 für C₁₉H₂₂O₃N₅S [M+H⁺], Gefunden: 400.14307.



4.5b: ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.85 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 1.28 (s, 9H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.21, 170.90, 164.04, 151.69, 150.18, 138.57, 138.25, 136.83, 131.82, 127.26, 113.66, 96.17, 62.25, 41.66, 33.52, 30.88, 14.62. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 428.17509 für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{N}_5\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 428.17455.

9.4.1.24 Herstellung von *N*-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)-3-fluoro-5-morpholinobenzamid (4.3).



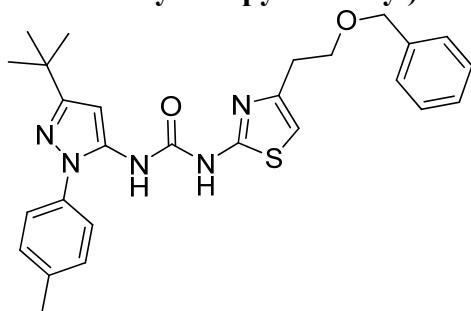
3-Fluoro-5-morpholinobenzoesäure (hergestellt entsprechend der Patentliteratur)¹⁴⁸ (50 mg, 0.22 mmol), **4.10a** (40 mg, 0.15 mmol), HBTU (69 mg, 0.30 mmol) und DIPEA (101 μL , 0.59 mmol) wurden in abs. DMF (3 mL) umgesetzt. Nach 12 Std. bei RT wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (5 mL) und H_2O (5 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/ H_2O mit 0.1 % TFA) wurden 42 mg (64 %) **4.3** erhalten: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.64 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.63-7.21 (m, 6H), 7.02 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.79-3.69 (m, 6H), 3.32-3.20 (m, 4H), 2.93 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.37, 161.98, 152.84, 152.74, 138.49, 128.25, 127.51, 127.40, 109.94, 109.05, 105.23, 104.97, 104.64,

104.40, 71.78, 68.59, 65.84, 47.69, 31.60; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 442.15952 für $C_{23}H_{25}O_3N_3S_1$ $[M+H^+]$, Gefunden: 442.15896.

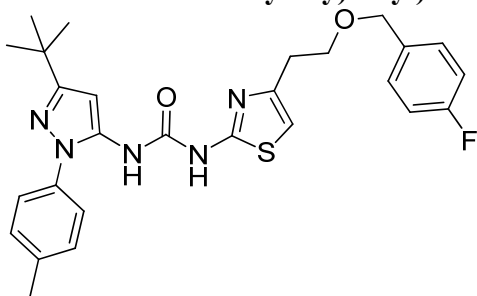
9.4.1.25 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der Thiazol-Pyrazolharnstoffe 4.4f, 4.4g, 4.4h.^{60,145}

Ein 2-Aminothiazol-Derivat und DIPEA wurden in einem mit Argon gespülten Schlenkcolben in abs. DMSO gelöst. Nach 10 Min. bei RT wurde ein Trichloroethylcarbammat hinzugegeben und die Reaktionslösung auf 60 °C über Nacht erwärmt. Die auf RT abgekühlte Reaktionslösung wurde mit EtOAc und H₂O versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit ges. NaCl-Lsg. und H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Falls nicht separat angegeben, wurde das Produkt nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) erhalten.

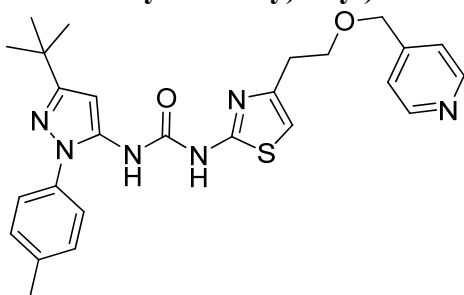
9.4.1.26 Herstellung von 1-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff (4.4f).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10a** (40 mg, 0.15 mmol), **2.5a** (67 mg, 0.15 mmol) und DIPEA (80 μ L, 0.45 mmol) in DMSO (2 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als ein weißer Feststoff erhalten (14 mg, 19 %): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.46-7.41 (m, 2H), 7.34-7.21 (m, 7H), 6.81 (bs, 1H), 6.50 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 3.61 (bs, 2H), 2.82 (bs, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.31 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.67, 158.79, 150.41, 148.17, 138.46, 137.05, 136.27, 135.71, 129.77, 128.20, 127.46, 127.36, 124.48, 107.40, 94.81, 71.71, 68.35, 32.06, 31.43, 30.22, 20.63; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 490.22712 für $C_{27}H_{32}O_2N_5S$ $[M+H^+]$, Gefunden: 490.22695.

9.4.1.27 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-(4-fluorobenzoyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)harnstoff (4.4g).

Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10b** (43 mg, 0.15 mmol), **2.5a** (60 mg, 0.15 mmol) und DIPEA (101 μ L, 0.59 mmol) in DMSO (2 mL) umgesetzt. Nach Säulenchromatographie (1 % MeOH/DCM) wurden 17 mg (22 %) **4.4g** erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.84 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.31 (m, 4H), 7.13 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.74 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.43 (s, 2H), 3.59 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.68, 160.66, 160.26, 150.36, 148.12, 137.04, 136.25, 135.70, 134.67, 129.76, 129.52 ($^3J_{\text{C-F}} = 8.2$ Hz, 2C), 124.47, 114.95 ($^2J_{\text{C-F}} = 21.2$ Hz, 2C), 107.40, 94.79, 70.90, 68.29, 32.05, 31.37, 30.20, 20.62; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 508.21770 für $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{N}_5\text{F}_1\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 508.21688.

9.4.1.28 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-(pyridin-4-ylmethoxy)ethyl)thiazol-2-yl)harnstoff (4.4h).

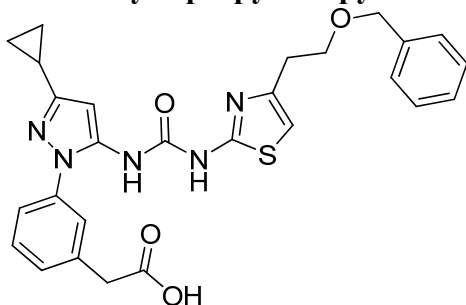
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10c** (40 mg, 0.15 mmol), **2.5a** (60 mg, 0.15 mmol) und DIPEA (101 μ L, 0.59 mmol) in DMSO (2 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als ein weißer Feststoff erhalten (12 mg, 16 %): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.90 (bs, 1H), 9.01 (bs, 1H), 8.50 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.65 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.80 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.27 (s, 9H);

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160.66, 157.98, 157.68, 150.55, 149.43, 147.74, 137.03, 136.24, 135.74, 129.76, 124.43, 121.74, 107.51, 95.01, 70.00, 68.87, 32.06, 31.32, 30.21, 20.63; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 491.22237 für $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 491.22154.

9.4.1.29 Allgemeine Beschreibung zur Herstellung der Thiazol-Pyrazolharnstoffe 4.4a-e.

Ein 2-Aminothiazol-Derivat und DIPEA wurden in einem mit Argon gespülten Schlenk Kolben in abs. DMSO gelöst. Nach 10 Min. bei RT wurde ein Trichloroethylcarbammat hinzugegeben und die Reaktionslösung auf 60 °C über Nacht erwärmt. Die auf RT abgekühlte Reaktionslösung wurde mit EtOAc und H_2O versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit ges. NaCl-Lsg. und H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH/ H_2O (1:1, 3 mL) aufgenommen und wässrige LiOH-Lsg. (2 Äq.) wurde zugegeben. Nach 1-2 Std. wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (5 mL) und Ameisensäure (verd., 5 mL) versetzt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Falls nicht separat angegeben, wurde das Produkt nach präparativer HPLC (MeCN/ H_2O mit 0.1 % TFA) erhalten.

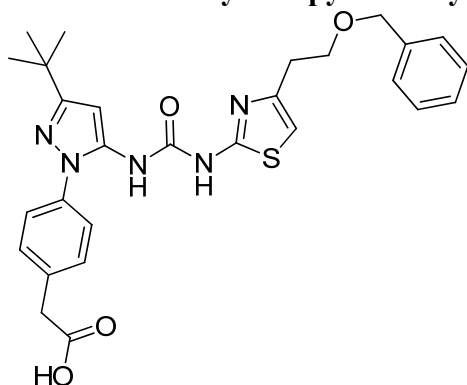
9.4.1.30 Herstellung von 2-(3-(5-(3-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)ureido)-3-cyclopropyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (4.4a).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10a** (88 mg, 0.33 mmol), **4.17a** (150 mg, 0.33 mmol), DIPEA (168 μL , 0.98 mmol), DMSO (2 mL), LiOH (17 mg, 0.66 mmol) und MeOH/ H_2O (2mL) umgesetzt. Nach zweifacher präparativer HPLC (MeCN/ H_2O mit 0.1 % TFA) wurde das Produkt als ein weißer Feststoff erhalten (16 mg, 9 %): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.31 (bs, 1H), 10.87 (bs, 1H), 8.93 (s,

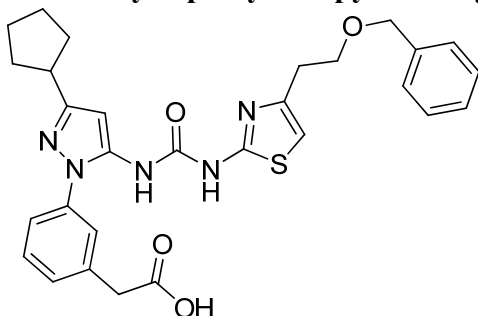
1H), 7.48-7.23 (m, 9H), 6.74 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.62 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.94-1.84 (m, 1H), 0.92-0.85 (m, 2H), 0.73-0.66 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.23, 163.75, 159.55, 155.35, 139.31, 138.75, 137.39, 137.34, 129.95, 129.46, 129.05, 128.31, 128.21, 126.40, 123.11, 108.26, 95.80, 72.54, 69.21, 41.09, 32.21, 10.25, 8.61. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 518.18565 für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_5\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 518.18488.

9.4.1.31 Herstellung von 2-(4-(5-(3-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)ureido)-3-*tert*-butyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (4.4c).



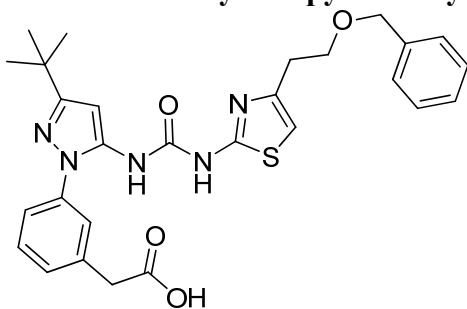
Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10a** (44 mg, 0.15 mmol), **4.17c** (70 mg, 0.15 mmol), DIPEA (75 μL , 0.44 mmol), DMSO (2 mL), LiOH (17 mg, 0.66 mmol) und MeOH/ H_2O (2 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (23 mg, 29 %) erhalten: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.01 (s, 1H), 7.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.34-7.18 (m, 5H), 6.74 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 3.61 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.29, 161.69, 159.72, 151.51, 148.70, 139.30, 137.60, 137.12, 135.25, 131.17, 129.04, 128.30, 128.20, 125.05, 108.24, 96.01, 72.55, 69.20, 32.91, 32.20, 31.02, 30.44. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 534.21695 für $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}_5\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 534.21614.

9.4.1.32 Herstellung von 2-(3-(5-(3-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)ureido)-3-cyclopentyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (4.4d).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10a** (22 mg, 0.09 mmol), **4.17d** (60 mg, 0.13 mmol), DIPEA (83 μ L, 0.49 mmol), DMSO (2 mL), LiOH (8 mg, 0.28 mmol) und MeOH/H₂O (2 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (11 mg, 22 %) erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.90 (bs, 1H), 9.01 (bs, 1H), 8.50 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.27 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.00, 158.83, 150.66, 147.97, 138.47, 136.72, 136.46, 134.39, 131.72, 131.62, 130.34, 128.68, 128.21, 127.47, 127.37, 124.14, 107.38, 96.06, 71.72, 68.39, 38.09, 32.66, 31.40, 28.39, 24.99; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 491.22237 für C₂₉H₃₁O₂N₆S [M+H⁺], Gefunden: 491.22154.

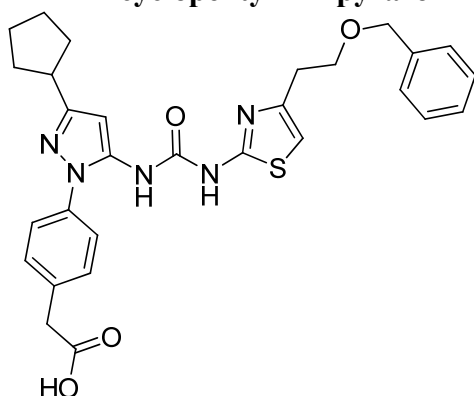
9.4.1.33 Herstellung von 2-(3-(5-(3-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)ureido)-3-*tert*-butyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (4.4b).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10a** (32 mg, 0.12 mmol), **4.17b** (70 mg, 0.15 mmol), DIPEA (33 μ L, 0.18 mmol), DMSO (2 mL), LiOH (6 mg, 0.24 mmol) und MeOH/H₂O (2 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als Feststoff (23 mg, 35 %) erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.02 (s, 1H), 7.49-7.23 (m, 9H), 6.75 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.62 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.79

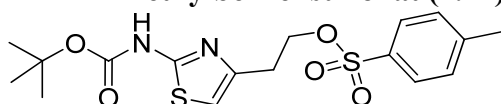
(t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.29 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.43, 160.94, 158.80, 158.45, 158.10, 138.48, 138.06, 136.49, 136.35, 129.12, 128.64, 128.21, 127.48, 127.37, 125.63, 122.46, 107.41, 95.29, 71.72, 68.39, 40.30, 32.10, 31.40, 30.21; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 534.21695 für $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 534.21622.

9.4.1.34 Herstellung von 2-(4-(5-(3-(4-(2-(Benzyloxy)ethyl)thiazol-2-yl)ureido)-3-cyclopentyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (4.4e).



Entsprechend der allgemeinen Beschreibung wurden **4.10a** (22 mg, 0.08 mmol), **4.17e** (60 mg, 0.13 mmol), DIPEA (63 μL , 0.37 mmol), DMSO (2 mL), LiOH (11 mg, 0.5 mmol) und MeOH/ H_2O (2 mL) umgesetzt. Das Produkt wurde als Feststoff (28 mg, 64 %) erhalten: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.97 (s, 1H), 7.49-7.37 (m, 3H), 7.35-7.23 (m, 6H), 6.74 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.61 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.07-2.98 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.03-1.93 (m, 2H), 1.76-1.58 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.46, 158.60, 156.65, 138.51, 137.99, 136.55, 129.18, 128.68, 128.25, 127.52, 127.42, 125.64, 125.49, 122.38, 107.48, 96.12, 71.76, 68.40, 40.32, 32.73, 31.40, 25.04; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 546.21695 für $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}_5\text{S}_1$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 546.21675.

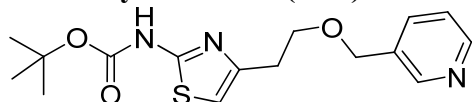
9.4.1.35 Herstellung von 2-(2-(tert-Butoxycarbonylamino)thiazol-4-yl)ethyl 4-methylbenzensulfonat (4.11).



Eine Lösung aus Tosylchlorid (78 mg, 0.41 mmol) in Pyridin (3 mL) wurde zu einer eiskalten Lösung **4.8** (350 mg, 0.41 mmol) in abs. Pyridin (5 mL) zugetropft. Nach

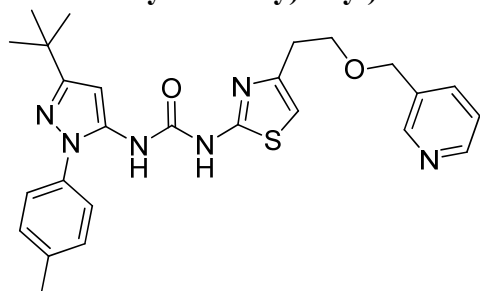
3 Std. bei RT wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (5 mL) und H₂O (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (2 % MeOH/DCM) wurden 115mg (20 %) **4.11** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.28 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.75 (s, 1H), 4.23 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.85 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.48 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.46, 152.74, 146.07, 144.78, 132.10, 130.03, 127.46, 108.78, 80.98, 69.39, 30.56, 27.91, 21.12; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 399.10429 für C₁₇H₂₃O₅N₂S₂ [M+H⁺], Gefunden: 399.10405.

9.4.1.36 Herstellung von *tert*-Butyl 4-(2-(pyridin-3-ylmethoxy)ethyl)thiazol-2-ylcarbammat (**4.12**).



4.11 (46 mg, 0.12 mmol), 3-Pyridinmethanol (12.6 μL, 0.13 mmol) und NaH (10 mg, 0.26 mg) wurden in abs. THF (3 mL) suspendiert. Nach 2 Std. bei RT wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (5 mL) und H₂O (5 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (60 % EtOAc/PE) wurden 17 mg (43 %) **4.12** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.34 (s, 1H), 8.49 (s, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.12, 152.75, 148.81, 148.69, 148.29, 135.45, 133.90, 123.50, 107.71, 80.91, 69.30, 68.77, 31.51, 27.91; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 336.13764 für C₁₆H₂₂O₃N₃S [M+H⁺], Gefunden: 336.13772.

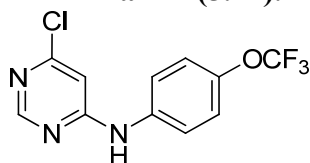
9.4.1.37 Herstellung von 1-(3-*tert*-Butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-(pyridin-3-ylmethoxy)ethyl)thiazol-2-yl)harnstoff (**4.4i**).



4.12 (17 mg, 0.05 mmol) wurde in Dioxan (2 mL) gelöst, und mit HCl (4 M in Dioxan) versetzt. Nach 24 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum und 4-(2-(Pyridin-3-ylmethoxy)ethyl)thiazol-2-amin (14 mg, 0.05 mmol) erhalten, das mit **2.5a** (31 mg, 0.08 mmol) und DIPEA (26 μ L, 0.15 mmol) in DMSO (2 mL) umgesetzt wurde. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) wurden 4 mg (16 %) **4.4i** erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.83 (s, 1H), 8.97 (bs, 1H), 8.50-8.47 (m, 2H), 7.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.40-7.30 (m, 5H), 6.75 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.27 (s, 9H).; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.50, 149.61, 149.50, 137.89, 137.09, 136.54, 136.27, 134.71, 130.61, 129.94, 125.33, 124.31, 108.28, 91.24, 70.09, 69.38, 32.90, 31.05, 30.46, 21.47; 2 Signale wurden in dem ¹³C-NMR nicht gefunden, konnten aber in den HSQC- und HMBC-Spektren identifiziert werden: 159.62, 148.96; HRMS (ESI-MS) Berechnet: 491.22237 für C₂₆H₃₁O₂N₆S [M+H⁺], Gefunden: 491.22167.

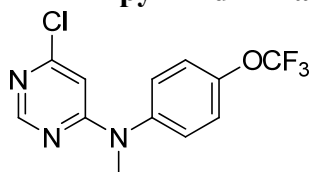
9.5 Herstellung der Aminoarylpyrimidine

9.5.1.1 Herstellung von 6-Chloro-*N*-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)pyrimidin-4-amin (**5.17**).



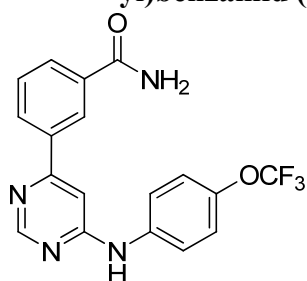
4,6-Dichloropyrimidin **5.15** (200 mg, 1.3 mmol), 4-(Trifluoromethoxy)anilin **5.16** (185 μ L, 1.3 mmol) und DIPEA (264 μ L, 2.7 mmol) wurden in EtOH für 4 Std. unter Rückfluss erhitzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und nach Säulenchromatographie (4 % MeOH/DCM) wurden 2.9 g (83 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.02 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) 160.99, 158.39, 158.04, 143.46, 138.18, 121.70 (2C), 121.55 (2C), 118.85, 105.34. MS (ESI) *m/z* 290 ([MH⁺] 100 %). HRMS (ESI-MS) Berechnet: 290.03025 für C₁₁H₈ON₃F₃³⁵Cl [M+H⁺] und 292.02730 für C₁₁H₈ON₃F₃³⁷Cl [M+H⁺], Gefunden: 290.03076 und 292.02723.

9.5.1.2 Herstellung von 6-Chloro-*N*-methyl-*N*-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)pyrimidin-4-amin (5.22).



5.17 (200 mg, 0.7 mmol) wurde in abs. DMF (5 mL) gelöst, mit NaH (64 mg, 1.6 mmol) versetzt und nach 20 Min. auf 0 °C herunter gekühlt, bevor MeI (85 µL, 1.4 mmol) zugegeben wurde. Nach 2 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Reinigung per Säulenchromatographie (10 % EtOAc/PE) lieferte 200 mg (95 %) eines weißen Feststoffs: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.42 (s, 1H), 7.53-7.46 (m, 4H), 6.52 (s, 1H), 3.41 (d, *J* = 2.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.52, 158.66, 157.96, 146.65, 142.49, 135.50, 128.78 (2C), 122.42 (2C), 102.52, 38.24; MS (ESI) *m/z* 304 ([MH⁺] 100 %). HRMS (ESI-MS) Berechnet: 304.04590 für C₁₂H₁₀ON₃F₃³⁵Cl [M+H⁺] und 306.04287 für C₁₂H₁₀ON₃F₃³⁷Cl [M+H⁺], Gefunden: 304.04639 und 306.04295.

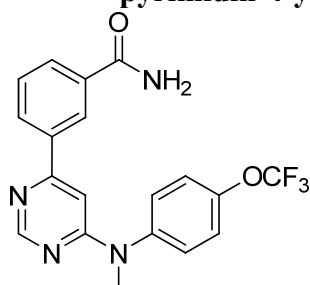
9.5.1.3 Herstellung von 3-(6-(4-(Trifluoromethoxy)phenylamino)pyrimidin-4-yl)benzamid (5.19a, GNF-2).



Unter Argon wurde **5.17** (400 mg, 1.4 mmol) in MeCN/H₂O (2.5 mL, 1:1) gelöst und mit 3-Carbamoylphenylboronsäure (230 mg, 1.4 mmol), Pd(PPh₃)₄ (80 mg, 0.07 mmol), Na₂CO₃ (584 mg, 5.5 mmol) für 7 Std. auf 90 °C erhitzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (4 % MeOH/DCM) wurden 207 mg (40 %) eines gelben Feststoffs erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.90 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.19 (dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.87-7.81 (m, 2H), 7.62 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.38-7.33 (m, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.50, 160.80, 160.79, 158.25, 142.88, 142.86, 139.08, 136.84, 134.95, 129.16, 129.05, 128.90, 125.75, 121.67 (2C), 120.83 (2C),

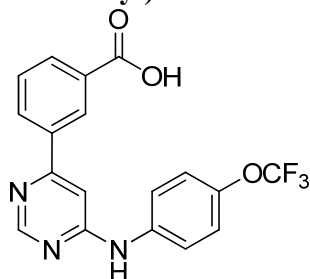
102.59. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 375.10648 für $C_{18}H_{14}F_3N_4O_2$ $[M+H^+]$, Gefunden: 375.10648.

9.5.1.4 Herstellung von 3-(6-(Methyl(4-(trifluoromethoxy)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)benzamid (5.23, Me-GNF-2).



Unter Argon wurde **5.22** (30 mg, 0.1 mmol) in MeCN/H₂O (1 mL, 1:1) gelöst und mit 3-Carbamoylphenylboronsäure (16 mg, 0.1 mmol), Pd(PPh₃)₄ (6 mg, 0.01 mmol), Na₂CO₃ (42 mg, 0.4 mmol) für 7 Std. auf 90 °C erhitzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (4 % MeOH/DCM) wurden 23 mg (59 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.67 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.59-7.53 (m, 3H), 7.50-7.44 (m, 3H), 7.09 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 3.50 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.48, 162.37, 161.25, 157.96, 146.14, 143.40, 137.18, 134.81, 129.40, 129.17, 128.72, 128.61, 125.77 (2C), 122.20 (2C), 121.11, 99.51, 38.22. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 389.12233 für $C_{19}H_{16}F_3N_4O_2$ $[M+H^+]$, Gefunden: 389.12199.

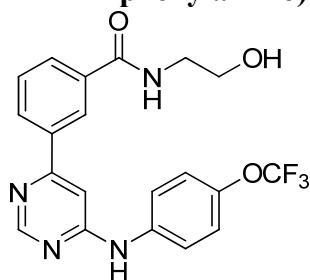
9.5.1.5 Herstellung von 3-(6-(4-(Trifluoromethoxy)phenylamino)pyrimidin-4-yl)benzoesäure (5.19b, MG062).



Unter Argon wurde **5.17** (173 mg, 0.6 mmol) in MeCN/H₂O (5 mL, 1:1) gelöst und mit 3-Boronbenzoesäure (99 mg, 0.6 mmol), Pd(PPh₃)₄ (35 mg, 0.03 mmol), Na₂CO₃ (253 mg, 2.4 mmol) für 7 Std. auf 90 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf RT

herunter gekühlt und mit HCl (6 N) auf pH 4 eingestellt. Der Niederschlag wurde filtriert und mit H₂O gewaschen. Nach Säulenchromatographie (5 % MeOH/DCM) wurden 37 mg (17 %, reine Fraktion) eines gelben Feststoffs erhalten: ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ 10.35 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.55 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ 166.98, 160.85, 160.22, 158.35, 142.87, 139.10, 137.03, 131.49, 131.08, 130.56, 129.42, 127.22, 121.75 (2C), 120.80 (2C), 120.21 (q, ¹*J*_{C-F} = 255.4 Hz), 102.66. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 376.09035 für C₁₈H₁₃F₃N₃O₃ [M+H⁺], Gefunden: 376.09045.

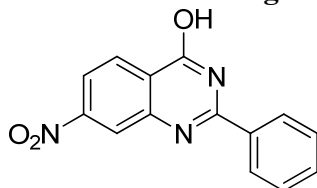
9.5.1.6 Herstellung von *N*-(2-hydroxyethyl)-3-(6-(4-(trifluoromethoxy)-phenylamino)-pyrimidin-4-yl)benzamid (5.21).



5.19b (30 mg, 0.08 mmol) wurde mit Ethanolamin (6 μL, 0.1 mmol), HATU (36 mg, 0.1 mmol) und DIPEA (41 μL, 0.2 mmol) in abs. DMF (1 mL) bei RT für 4 Std. umgesetzt. Nach Flash-Säulenchromatographie (5 % MeOH/DCM) wurden 18 mg (54 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ 9.93 (s, 1H), 8.77 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 8.61 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.88-7.83 (m, 2H), 7.63 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.37-7.34 (m, 3H), 4.73 (s, 1H), 3.55 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.37 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ 165.93, 160.79, 160.73, 158.22, 142.87, 139.07, 136.79, 135.23, 128.99, 128.91, 128.88, 125.38, 121.65 (2C), 120.83 (2C), 119.13, 102.57, 59.69, 42.24. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 419.13255 für C₂₀H₁₈F₃N₄O₃ [M+H⁺], Gefunden: 419.13199.

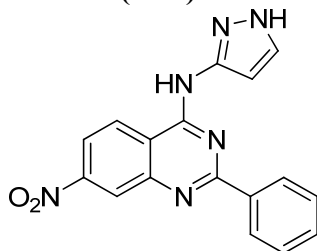
9.6 Herstellung der 2-Phenylchinazoline als Lipid-Binder

9.6.1.1 Herstellung von 7-Nitro-2-phenylchinazolin-4-ol (**5.3**).



2-Amino-4-nitrobenzoesäure (2.8 g, 16 mmol), Benzamidin (6.0 g, 50 mmol) und Essigsäure (3.6 mL, 63 mmol) wurden in 2-Methoxyethanol (300 mL) über Nacht unter Rückfluss auf 132 °C erhitzt und anschließend eingengt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und der Niederschlag mit kaltem MeOH gewaschen. Es wurden 2.8 g (65 %) eines grünen Feststoffs erhalten, der ohne weitere Aufreinigung eingesetzt wurde: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.90 (s, 1H), 8.42 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.24-8.19 (m, 3H), 7.66-7.55 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.29, 155.45, 152.20, 149.93, 132.92, 132.89, 129.59 (2C), 129.06, 128.91 (2C), 126.14, 123.16, 120.96; HRMS (ESI-MS) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 268.07167 für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$, Gefunden: 268.07173.

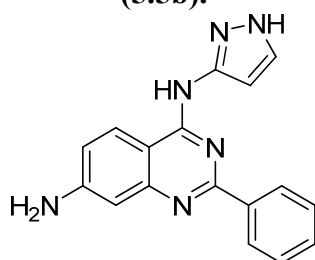
9.6.1.2 Herstellung von 7-Nitro-2-phenyl-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin (**5.5a**).



7-Nitro-2-phenylchinazolin-4-ol **5.3** (1.67 g, 6.3 mmol) wurde mit Thionylchlorid (8 mL) und DMF (kat.) für 3.5 Std. bei 78 °C unter Rückfluss erhitzt. Das Thionylchlorid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet, was zu dem Feststoff 4-Chloro-7-nitro-2-phenylchinazolin (1.75 g, 6.1 mmol) führte, der ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde. 4-Chloro-7-nitro-2-phenylchinazolin (213 mg, 0.8 mmol), TEA (208 μL , 1.5 mmol) und 3-Aminopyrazol (124 mg, 1.5 mmol) wurden in abs. DCM (8 mL) umgesetzt. Nach 24 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (3 %

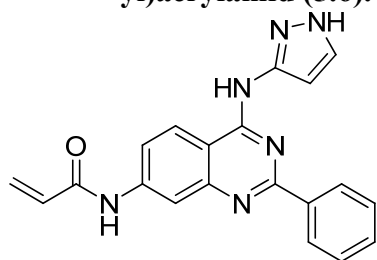
MeOH/DCM) wurde ein gelber Feststoff (156 mg, 62 %) erhalten: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.66 (s, 1H), 10.92 (s, 1H), 8.99-8.86 (m, 1H), 8.59-8.41 (m, 3H), 8.22 (bs, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.62-7.49 (m, 3H), 7.01 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.11, 157.99, 151.27, 151.02, 147.92, 138.53, 131.77, 129.92, 129.41 (2C), 129.01 (2C), 126.69, 123.77, 119.74, 118.27, 99.22; HRMS (ESI-MS) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 333.10945 für $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_2$, Gefunden: 333.10948.

9.6.1.3 Herstellung von 2-Phenyl-N4-(1H-pyrazol-3-yl)chinazolin-4,7-diamin (5.5b).



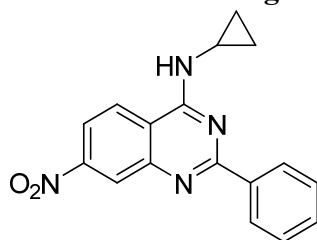
5.5a (150 mg, 0.45 mmol), Ammoniumformiat (199 mg, 3.2 mmol) und Pd/C (kat.) wurden in abs. EtOH (5 mL) für 1.5 Std. bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (3-5 % MeOH/DCM) wurde ein gelber Feststoff (121 mg, 89 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.19-8.15 (m, 3H), 7.73-7.63 (m, 2H), 7.63-7.54 (m, 2H), 7.03 (dd, $J = 2.2, 9.1$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.81 (bs, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 157.73, 156.72, 154.53, 151.53, 147.00, 135.10, 131.55, 128.63 (2C), 128.45 (2C), 125.12, 117.07, 102.89, 101.48, 98.60, 91.55; HRMS (ESI-MS) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 303.13527 für $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_6$, Gefunden: 303.13531.

9.6.1.4 Herstellung von N-(4-(1H-Pyrazol-3-ylamino)-2-phenylchinazolin-7-yl)acrylamid (5.6).



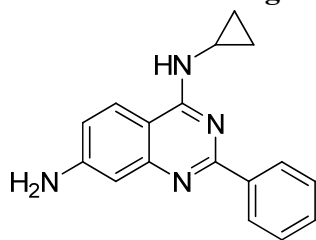
Unter Argon wurde **5.5b** (115 mg, 0.4 mmol) in abs. THF (1 mL) gelöst, bevor die Lösung auf 0 °C herunter gekühlt und DIPEA (193 μ L, 1.1 mmol) hinzu gegeben wurde. Eine Lösung aus Acryloylchlorid (34 μ L, 0.4 mmol) in abs. THF (2 mL) wurde zugetropft. Nach 30 Min. bei 0 °C wurde die Reaktionslösung mit TEA alkalisiert und mit ges. NaCl.-Lsg. und EtOAc verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Umkristallisation (MeCN/H₂O (1:1)) wurden farblose Kristalle erhalten (35 mg, 26 %): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.50 (bs, 1H), 10.53 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 8.60 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.47 (dd, *J* = 1.9, 7.5 Hz, 2H), 8.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.68 (dd, *J* = 2.0, 9.0 Hz, 1H), 7.58-7.47 (m, 3H), 6.99 (bs, 1H), 6.52 (dd, *J* = 10.1, 16.9 Hz, 1H), 6.36 (dd, *J* = 1.9, 16.9 Hz, 1H), 5.86 (dd, *J* = 1.9, 10.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.84, 159.82, 156.99, 151.47, 142.92, 138.60, 131.61, 130.28, 128.90, 128.44 (2C), 128.00, 127.94 (2C), 124.11, 118.56, 118.15, 115.44, 109.83, 98.12; HRMS (ESI-MS) (*m/z*): [M+H⁺] Berechnet: 357.14584 für C₂₀H₁₇ON₆, Gefunden: 357.14571.

9.6.1.5 Herstellung von *N*-Cyclopropyl-7-nitro-2-phenylchinazolin-4-amin (**5.7**).



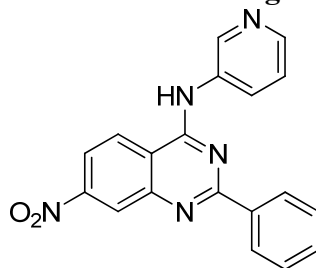
4-Chloro-7-nitro-2-phenylchinazolin (100 mg, 0.4 mmol) wurde in DCM (4 mL) gelöst und eine Lösung aus Cyclopropylamin (37 μ L, 0.5 mmol) in *i*-PrOH (2 mL) hinzu gegeben. Nach 24 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (3 % MeOH/DCM) wurde ein gelber Feststoff (89 mg, 83 %) erhalten: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.54 (dd, *J* = 6.6, 3.0 Hz, 2H), 8.44 (dd, *J* = 10.7, 5.7 Hz, 2H), 8.16 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.56-7.48 (m, 3H), 3.27-3.21 (m, 1H), 0.95-0.86 (m, 2H), 0.77-0.68 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.22, 160.58, 149.94, 149.90, 137.82, 130.72, 128.33 (2C), 128.19 (2C), 125.23, 122.80, 118.34, 117.33, 24.48, 6.13 (2C). HRMS (ESI-MS) (*m/z*): [M+H⁺] Berechnet: 307.11895 für C₁₇H₁₄O₂N₄, Gefunden: 307.11895.

9.6.1.6 Herstellung von *N*4-Cyclopropyl-2-phenylchinazolin-4,7-diamin (5.8).



5.7 (32 mg, 0.1 mmol), Ammoniumformiat (40 mg, 0.6 mmol) und Pd/C (kat.) wurden in abs. EtOH (3 mL) für 2 Std. bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) wurde ein gelber Feststoff (18 mg, 65 %) isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.48 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.56-7.42 (m, 3H), 6.83-6.68 (m, 2H), 5.87 (s, 2H), 3.19-3.12 (m, 1H), 0.89-0.76 (m, 2H), 0.70-0.60 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 161.29, 157.35, 156.29, 141.56, 133.29, 131.95, 129.15 (2C), 128.63 (2C), 125.17, 117.52, 101.94, 97.39, 25.17, 5.97 (2C). HRMS (ESI-MS) (*m/z*): [M+H⁺] Berechnet: 277.14477 für C₁₇H₁₇N₄, Gefunden: 277.14484.

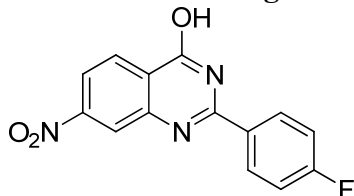
9.6.1.7 Herstellung von 7-Nitro-2-phenyl-*N*-(pyridin-3-yl)chinazolin-4-amin (5.9).



4-Chloro-7-nitro-2-phenylchinazolin (100 mg, 0.4 mmol) wurde in DCM (4 mL) gelöst, und eine Lösung aus 3-Aminopyrimidin (49 mg, 0.5 mmol) in *i*-PrOH (2 mL) sowie HCl (2 M, kat.) wurde hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 45 Min. bei 50 °C in der Mikrowelle (150 W) umgesetzt. Der Niederschlag wurde filtriert. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) wurde ein Feststoff (67 mg, 56 %) isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.93 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.25-8.17 (m, 3H), 8.00 (dd, *J* = 8.7, 3.5 Hz, 2H), 7.66-7.61 (m, 2H), 7.61-7.55 (m, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.40, 154.54, 151.34, 147.82, 132.11, 132.01, 129.29, 128.72 (2C), 128.40, 128.20, 128.07 (2C), 127.70,

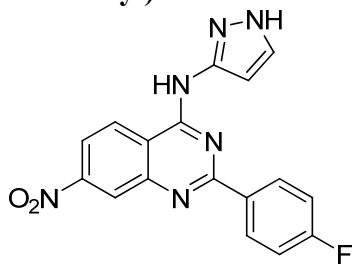
127.12, 126.06, 125.31, 122.38, 120.07. HRMS (ESI-MS) (m/z): $[M+H^+]$ Berechnet: 344.11420 für $C_{19}H_{14}O_2N_5$, Gefunden: 344.11432.

9.6.1.8 Herstellung von 2-(4-Fluorophenyl)-7-nitrochinazolin-4-ol (5.11).



4-Fluorobenzamidin **5.10** (1.68 g, 8.5 mmol) und 2-Amino-4-nitrobenzoesäure (1.6 g, 8.5 mmol) wurden in 2-Methoxyethanol (10 mL) gelöst und für 1 Std. bei 132 °C in der Mikrowelle (150 W) umgesetzt. Der Niederschlag wurde filtriert, gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Der Feststoff (949 mg, 39 %) wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet: 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 12.93 (bs, 1H), 8.47-8.20 (m, 5H), 7.45-7.41 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 162.33, 154.03, 151.26, 149.19, 130.73 ($^3J_{C-F} = 9.1$ Hz, 2C), 129.86, 128.18, 125.26, 122.26, 122.06, 119.88, 115.74 ($^2J_{C-F} = 21.7$ Hz, 2C), 114.12. ESI (m/z): 286 ($[M+H^+]$, 100). HRMS (ESI-MS) (m/z): $[M+H^+]$ Berechnet: 286.06225 für $C_{14}H_9O_3F$, Gefunden: 286.06207.

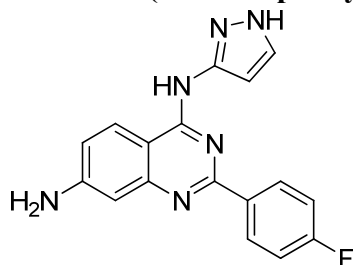
9.6.1.9 Herstellung von 2-(4-Fluorophenyl)-7-nitro-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin (5.12).



5.11 (900 mg, 3.2 mmol) wurde mit Thionylchlorid (5 mL) und DMF (kat.) für 3.5 Std. bei 78 °C unter Rückfluss erhitzt. Das Thionylchlorid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet, was zu dem Feststoff 4-Chloro-2-(4-fluorophenyl)-7-nitrochinazolin (920 mg, 96 %) führte. Ohne weitere Aufreinigung wurde 4-Chloro-2-(4-fluorophenyl)-7-nitrochinazolin (100 mg, 0.3 mmol) in DCM (4 mL) gelöst, und eine Lösung aus 3-Aminopyrazol (36 mg, 0.4 mmol) in *i*-PrOH (2 mL) wurde hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 45 Min. bei 50 °C in der Mikrowelle (150 W) umgesetzt. Der Niederschlag wurde filtriert, gewaschen und der

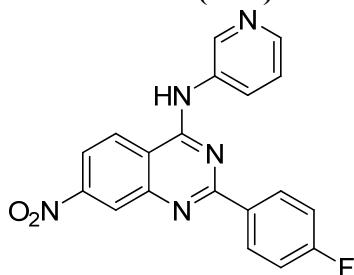
Feststoff (72 mg, 63 %) ohne weitere Aufreinigung verwendet: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.81 (bs, 1H), 8.97 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.52 (dd, $J = 8.7, 5.6$ Hz, 2H), 8.34-8.14 (m, 2H), 7.87 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.45-7.35 (m, 2H), 6.89 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.10 ($^1J_{\text{C-F}} = 257.1$ Hz), 158.74, 157.05, 150.40, 145.85, 131.62 ($^3J_{\text{C-F}} = 9.1$ Hz, 2C), 130.74 ($^4J_{\text{C-F}} = 4.0$ Hz), 129.71, 128.12, 126.48, 125.11, 120.32, 116.73, 115.99 ($^2J_{\text{C-F}} = 22.1$ Hz, 2C), 99.08. HRMS (ESI-MS) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 351.10003 für $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_6\text{F}$, Gefunden: 351.10001.

9.6.1.10 2-(4-Fluorophenyl)-*N*4-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4,7-diamin (5.13).



5.12 (30 mg, 0.1 mmol), Ammoniumformiat (32 mg, 0.5 mmol) und Pd/C (kat.) wurden in abs. EtOH (2 mL) für 2 Std. bei 90 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/ H_2O mit 0.1 % TFA) wurde ein gelber Feststoff (16 mg, 56 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.13 (dd, $J = 7.5, 5.3$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.67 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168.62 ($^1J_{\text{C-F}} = 253.8$ Hz), 158.64, 158.06, 147.45, 132.59 ($^3J_{\text{C-F}} = 9.3$ Hz, 2C), 131.11, 129.25, 127.77, 127.42, 126.67, 119.40, 117.48 ($^2J_{\text{C-F}} = 22.4$ Hz, 2C), 103.04, 100.88, 98.89. HRMS (ESI-MS) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 321.12585 für $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_6\text{F}$, Gefunden: 321.12585.

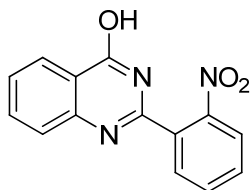
9.6.1.11 Herstellung von 2-(4-Fluorophenyl)-7-nitro-*N*-(pyridin-3-yl)chinazolin-4-amin (5.14).



4-Chloro-2-(4-fluorophenyl)-7-nitrochinazolin (100 mg, 0.3 mmol) wurde in DCM (2 mL) gelöst, und eine Lösung aus 3-Aminopyridin (46 mg, 0.5 mmol) in *i*-PrOH (1 mL) sowie HCl (1 N, kat.) wurde hinzu gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1 Std. bei 55 °C in der Mikrowelle (150 W) umgesetzt. Der Niederschlag wurde filtriert und gewaschen, und der Feststoff (89 mg, 75 %) ohne weitere Aufreinigung verwendet: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 10.32 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.43-8.35 (m, 3H), 8.33-8.26 (m, 2H), 7.55-7.46 (m, 1H), 7.32 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.10 ($^1J_{\text{C-F}} = 247.8$ Hz), 160.60, 158.85, 158.77, 151.36, 145.96, 144.81, 136.24, 134.59, 131.30 ($^3J_{\text{C-F}} = 9.6$ Hz, 2C), 130.53, 126.52, 124.35, 123.91, 120.08, 118.29, 116.40 ($^1J_{\text{C-F}} = 23.0$ Hz, 2C). HRMS (ESI-MS) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 362.10478 für $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}_3\text{F}$, Gefunden: 362.10476.

9.7 Herstellung der kovalenten EGFR-Inhibitoren

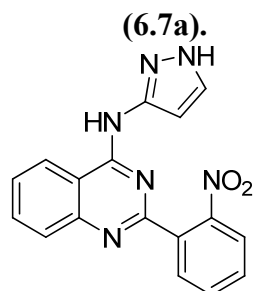
9.7.1.1 Herstellung von 2-(2-Nitrophenyl)chinazolin-4-ol (6.6a).



2-Aminobenzamid (1.0 g, 7.3 mmol) und 2-Nitrobenzoylchlorid (1.2 g, 8.1 mmol) wurden in $\text{CHCl}_3/\text{Pyridin}$ (10 mL, 1:1) umgesetzt. Nach 1 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc (10 mL) aufgenommen und nacheinander mit Na_2CO_3 -Lsg. (1 N), HCl (10 %) und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. *N*-(2-

Carbamoylphenyl)-3-nitrobenzamid wurde als Feststoff (1.1 g, 64 %) isoliert und ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet. *N*-(2-Carbamoylphenyl)-2-nitrobenzamid (1.1 g, 3.8 mmol) wurde in EtOH (15 mL) gelöst und mit KOH (10 %, 10 mL) für 15 Min. unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, der Rückstand gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Nach Säulenchromatographie (2 % MeOH/DCM) wurde ein gelber Feststoff (263 mg, 27 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.82 (s, 1H), 8.24-8.15 (m, 2H), 7.94-7.80 (m, 4H), 7.66-7.64 (m, 1H), 7.59-7.55 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl $_3$) δ 162.18, 152.33, 149.21, 148.13, 135.31, 134.57, 132.19, 132.14, 129.85, 128.03, 127.77, 126.56, 125.18, 121.86. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 268.07167 für C $_{14}$ H $_{10}$ N $_3$ O $_3$ [M+H $^+$], Gefunden: 268.07174.

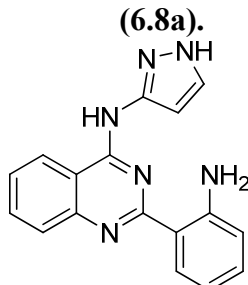
9.7.1.2 Herstellung von 2-(2-Nitrophenyl)-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin



6.6a (216 mg, 0.8 mmol) wurde mit Thionylchlorid (3 mL) und DMF (kat.) unter Rückfluss erhitzt. Nach 2 Std. wurde die Reaktionslösung auf RT herunter gekühlt und das Thionylchlorid sowie das DMF im Vakuum entfernt, so dass 4-Chloro-2-(2-nitrophenyl)chinazolin (quantitativ) isoliert und ohne Aufreinigung weiterverwendet wurde. 4-Chloro-2-(2-nitrophenyl)chinazolin (220 mg, 0.8 mmol) wurde in DCM gelöst und eine Lösung aus 3-Aminopyrazol (128 mg, 1.54 mmol) in *i*-PrOH sowie HCl (1 N, kat.) hinzugegeben. Nach 12 Std. unter Rückfluss wurde die Reaktionslösung auf RT herunter gekühlt und filtriert. Der Rückstand wurde mit DCM und *i*-PrOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach Säulenchromatographie wurde ein gelber Feststoff (286 mg, 89 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.62 (bs, 1H), 10.89 (s, 1H), 8.74 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.06 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.93-7.80 (m, 3H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 158.31, 157.38, 149.33, 146.55, 134.50, 133.30 (d, $J = 29.3$ Hz), 132.07, 131.30, 130.74, 129.95, 127.75, 126.42, 124.82, 123.30 (d,

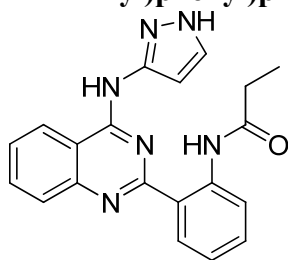
$J = 28.1$ Hz), 113.27, 99.15, 97.61. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 333.10945 für $C_{17}H_{13}N_6O_2$ $[M+H^+]$, Gefunden: 333.10926.

9.7.1.3 Herstellung von 2-(2-Aminophenyl)-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin (6.8a).



6.7a (750 mg, 2.3 mmol) wurde mit H_2 und Pd/C (kat.) in EtOH (5 mL) bei RT für 4 Std. umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-2 % MeOH/DCM) wurde ein gelber Feststoff (432 mg, 63 %) isoliert: 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.53 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 8.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.84-7.80 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.53 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.71 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 5.23 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 160.88, 157.98, 151.20, 149.56, 148.57, 140.11, 133.79, 129.59, 128.65, 126.44, 124.05, 116.88, 116.81, 114.52, 114.34, 99.07. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 303.13527 für $C_{17}H_{15}N_6$ $[M+H^+]$, Gefunden: 303.13517.

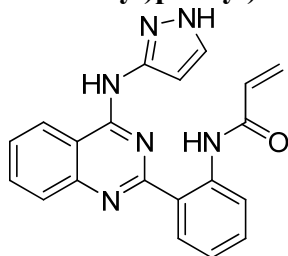
9.7.1.4 Herstellung von *N*-(2-(4-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)propionamid (6.9a).



6.8a (20 mg, 0.1 mmol) wurde in abs. THF (1 mL) gelöst, bevor die Lösung auf 0 °C herunter gekühlt und DIPEA (34 μ L, 0.2 mmol) hinzu gegeben wurde. 1 mL einer Lösung aus Propionylchlorid (32 μ L, 0.4 mmol) in abs. THF (5 mL) wurde zu der ersten Lösung zugetropft. Nach 15 Min. bei 0 °C wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/ H_2O mit 0.1 % TFA) und anschließender

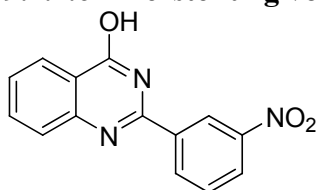
Säulenchromatographie (1-2.5 % MeOH/DCM) wurde ein Feststoff (8 mg, 32 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.30 (s, 1H), 12.65 (s, 1H), 10.66 (s, 1H), 8.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.55-8.51 (m, 1H), 7.95-7.85 (m, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.67-7.59 (m, 1H), 7.49-7.43 (m, 1H), 7.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 2.42 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.15 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.89, 160.25, 157.61, 157.11, 148.44, 139.70, 133.93, 130.93, 130.39, 127.17, 126.64, 123.53, 122.32, 120.09, 118.87, 115.88, 113.18, 98.45, 30.76, 9.73. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 359.16149 für $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 359.16134.

9.7.1.5 Herstellung von *N*-(2-(4-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)acrylamid (6.10a).



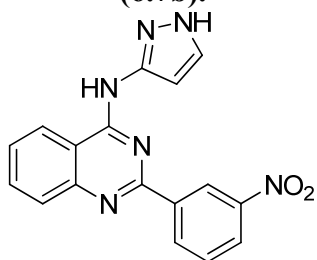
6.9a (50 mg, 0.38 mmol) wurde in abs. THF (1 mL) gelöst, bevor die Lösung auf 0 °C herunter gekühlt und DIPEA (85 μL , 0.5 mmol) hinzu gegeben wurde. 2 mL einer Lösung aus Acryloylchlorid (37 μL , 0.5 mmol) in abs. THF (5 mL) wurden zu der ersten Lösung zugetropft. Nach 15 Min. bei 0 °C wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-2.5 % MeOH/DCM) wurde ein Feststoff (27 mg, 45 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.66 (s, 1H), 12.65 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 8.73-8.64 (m, 2H), 8.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.67-7.59 (m, 1H), 7.53-7.46 (m, 1H), 7.27-7.20 (m, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.36-6.31 (m, 2H), 5.83 (dd, $J = 8.7, 3.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 163.30, 160.13, 157.17, 148.37, 147.01, 139.45, 133.78, 133.01, 131.05, 130.45, 129.23, 127.24, 126.87, 126.72, 123.84, 123.39, 122.94, 120.35, 113.20, 98.60. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 357.14584 für $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 357.14570.

9.7.1.6 Herstellung von 2-(3-Nitrophenyl)chinazolin-4-ol (6.6b).



2-Aminobenzamid (1.8 g, 13.5 mmol) und 3-Nitrobenzoylchlorid (2.5 g, 13.5 mmol) wurden in $\text{CHCl}_3/\text{Pyridin}$ (30 mL, 5:1) umgesetzt. Nach 1 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc (10 mL) aufgenommen und nacheinander mit Na_2CO_3 -Lsg. (1 N), HCl (10 %) und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. *N*-(2-Carbamoylphenyl)-3-nitrobenzamid wurde als grauer Feststoff (3.8 g, 97 %) isoliert und ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet. *N*-(2-Carbamoylphenyl)-3-nitrobenzamid (2.0 g, 7.0 mmol) wurde in EtOH (15 mL) gelöst und mit KOH (10 %, 10 mL) für 15 Min. unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und der Rückstand gewaschen. Der Rückstand wurde am Hochvakuum getrocknet und ein Feststoff (1.7 g, 94 %) isoliert, der ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde: ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.01 (s, 1H), 8.60 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.46-8.40 (m, 1H), 8.18 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.90-7.80 (m, 3H), 7.58 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ Das ^{13}C -Spektrum kann aufgrund von sehr geringer Löslichkeit der Substanz nicht ausgewertet werden. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 268.07167 für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 268.07183.

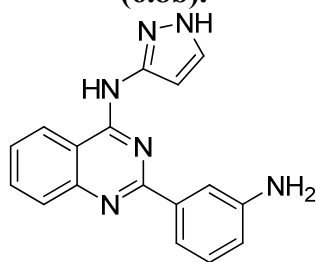
9.7.1.7 Herstellung von 2-(3-Nitrophenyl)-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin (6.7b).



6.6b (1.5 g, 5.6 mmol) wurde mit Thionylchlorid (5 mL) und DMF (kat.) unter Rückfluss erhitzt. Nach 2 Std. wurde die Reaktionslösung auf RT herunter gekühlt und das Thionylchlorid sowie das DMF im Vakuum entfernt, so dass 4-Chloro-2-(3-nitrophenyl)chinazolin (quantitativ) isoliert und ohne Aufreinigung weiterverwendet

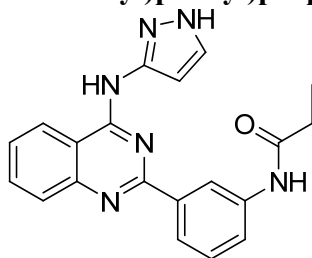
wurde. 4-Chloro-2-(3-nitrophenyl)chinazolin (500 mg, 1.8 mmol) wurde in DCM gelöst und eine Lösung aus 3-Aminopyrazol (218 mg, 2.6 mmol) in *i*-PrOH sowie HCl (1 N, kat.) hinzugegeben. Nach 4 Std. unter Rückfluss wurde die Reaktionslösung auf RT herunter gekühlt und filtriert. Der Rückstand wurde mit DCM und *i*-PrOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach Säulenchromatographie wurde ein Feststoff (356 mg, 63 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.65 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 9.27-9.16 (m, 1H), 8.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.68 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.37-8.27 (m, 1H), 7.94-7.75 (m, 4H), 7.63-7.52 (m, 1H), 6.97 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 158.50, 158.01, 150.75, 148.97, 147.97, 140.93, 134.66, 134.27, 130.96, 129.80, 128.85, 127.42, 125.56, 124.20, 123.14, 114.81, 99.16. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 333.10945 für $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 333.10982.

9.7.1.8 Herstellung von 2-(3-Aminophenyl)-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin (6.8b).



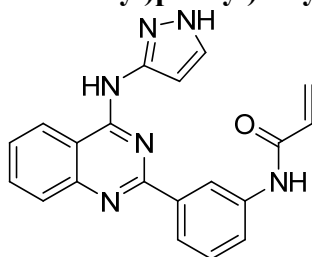
6.7b (250 mg, 0.75 mmol) wurde mit H_2 und Pd/C (kat.) in EtOH (5 mL) bei RT für 3 Std. umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1.5-3.5 % MeOH/DCM) wurde ein gelber Feststoff (107 mg, 47 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.58 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 3.9$ Hz, 3H), 7.59-7.46 (m, 1H), 7.39 (s, 2H), 7.20-7.07 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.78 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.60 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.52, 156.68, 149.99, 149.40, 147.45, 133.04, 130.88, 130.46, 128.93, 127.36, 125.44, 123.14, 117.89, 116.50, 114.60, 112.91, 98.36. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 303.13527 für $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_6$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 303.13514.

9.7.1.9 Herstellung von *N*-(3-(4-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)propionamid (6.9b).



6.8b (20 mg, 0.1 mmol) wurde in abs. THF (1 mL) gelöst, bevor die Lösung auf 0 °C herunter gekühlt und DIPEA (34 μ L, 0.2 mmol) hinzu gegeben wurde. 1 mL einer Lösung aus Propionylchlorid (32 μ L, 0.4 mmol) in abs. THF (5 mL) wurde zu der ersten Lösung zugetropft. Nach 15 Min. bei 0 °C wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) wurde ein Feststoff (16 mg, 64 %) isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.52 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.72-8.60 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.90-7.81 (m, 3H), 7.79 (s, 1H), 7.60-7.50 (m, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 2.37 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.07, 159.29, 157.58, 157.28, 150.25, 139.53, 139.10, 133.11, 128.65, 127.84, 125.89, 123.26, 122.68, 120.93, 118.70, 115.89, 113.76, 98.27, 29.55, 9.73. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 359.16149 für C₂₀H₁₉N₆O [M+H⁺], Gefunden: 359.16133.

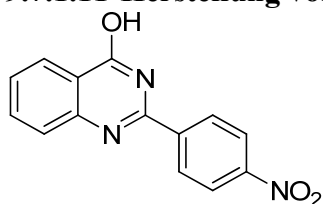
9.7.1.10 Herstellung von *N*-(3-(4-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)acrylamid (6.10b).



6.8b (40 mg, 0.13 mmol) wurde in abs. THF (1 mL) gelöst, bevor die Lösung auf 0 °C herunter gekühlt und DIPEA (67 μ L, 0.4 mmol) hinzu gegeben wurde. 2 mL einer Lösung aus Acryloylchlorid (30 μ L, 0.4 mmol) in abs. THF (5 mL) wurden zu der ersten Lösung zugetropft. Nach 15 Min. bei 0 °C wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-3 % MeOH/DCM) wurde ein Feststoff (34 mg, 73 %) isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.54 (s, 1H), 10.50 (s, 1H),

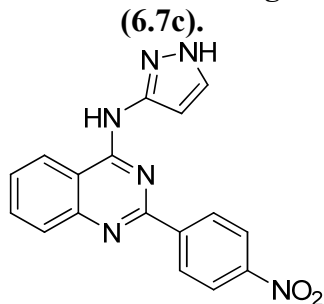
10.35 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.88-7.77 (m, 3H), 7.60-7.52 (m, 1H), 7.48 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.51 (dd, $J = 17.0, 10.1$ Hz, 1H), 6.32 (dd, $J = 17.0, 2.0$ Hz, 1H), 5.79 (dd, $J = 10.1, 2.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 163.22, 159.18, 157.94, 157.64, 157.31, 150.24, 139.22 (2C), 133.15, 131.95, 128.83, 127.85, 126.95, 125.95, 123.29, 123.22, 121.18, 118.95, 113.79, 98.28. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 357.14584 für $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 357.14567.

9.7.1.11 Herstellung von 2-(4-Nitrophenyl)chinazolin-4-ol (6.6c).



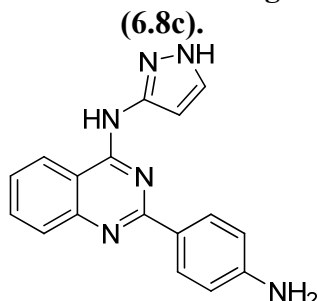
2-Aminobenzamid (1.8 g, 13.5 mmol) und 4-Nitrobenzoylchlorid (2.5 g, 13.5 mmol) wurden in $\text{CHCl}_3/\text{Pyridin}$ (10 mL, 1:1) umgesetzt. Nach 1 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc (10 mL) aufgenommen und nacheinander mit Na_2CO_3 -Lsg. (1 N), HCl (10 %) und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. *N*-(2-Carbamoylphenyl)-4-nitrobenzamid wurde als Feststoff (3.4 g, 89 %) isoliert und ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet. *N*-(2-Carbamoylphenyl)-4-nitrobenzamid (2.0 g, 7.0 mmol) wurde in EtOH (15 mL) gelöst und mit KOH (10 %, 10 mL) für 15 Min. unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und der Rückstand gewaschen. Der Rückstand wurde am Hochvakuum getrocknet und ein Feststoff (1.7 g, 91 %) isoliert, der ohne weitere Aufreinigung verwendet wurde: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.15 (s, 1H), 8.76 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.62 (s, 2H), 7.32 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 182.01, 150.61, 147.88, 140.04, 133.95, 132.06, 129.64, 126.61, 125.92 (2C), 124.15, 122.32 (2C), 122.00. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 268.07167 für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 268.07188.

9.7.1.12 Herstellung von 2-(4-Nitrophenyl)-N-(1H-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin (6.7c).



6.6c (1.5 g, 5.6 mmol) wurde mit Thionylchlorid (5 mL) und DMF (kat.) unter Rückfluss erhitzt. Nach 2 Std. wurde die Reaktionslösung auf RT herunter gekühlt und das Thionylchlorid sowie das DMF im Vakuum entfernt, so dass 4-Chloro-2-(3-nitrophenyl)chinazolin (quantitativ) isoliert und ohne Aufreinigung weiterverwendet wurde. 4-Chloro-2-(4-nitrophenyl)chinazolin (500 mg, 1.8 mmol) wurde in DCM gelöst und eine Lösung aus 3-Aminopyrazol (218 mg, 2.6 mmol) in *i*-PrOH sowie HCl (1 N, kat.) hinzugegeben. Nach 4 Std. unter Rückfluss wurde die Reaktionslösung auf RT herunter gekühlt und filtriert. Der Rückstand wurde mit DCM und *i*-PrOH gewaschen und im Vakuum getrocknet, so dass ein gelber Feststoff (531 mg, 91 %) isoliert wurde: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.66 (s, 1H), 10.67 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.68 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.39 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.94-7.87 (m, 2H), 7.83 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.63 (ddd, $J = 8.2, 5.7, 2.5$ Hz, 1H), 6.98 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 158.47, 158.29, 151.62, 150.67, 149.26, 145.25, 134.33, 133.02, 129.81 (2C), 128.95, 127.72, 124.57 (2C), 124.17, 114.74, 99.15. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 333.10945 für $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 333.10942.

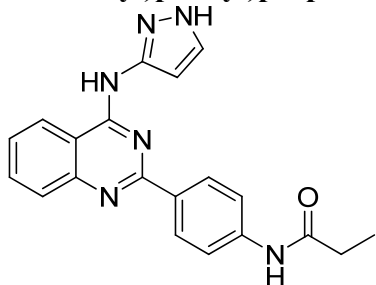
9.7.1.13 Herstellung von 2-(4-Aminophenyl)-N-(1H-pyrazol-3-yl)chinazolin-4-amin (6.8c).



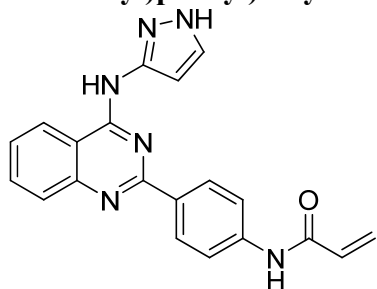
6.7c (480 mg, 1.44 mmol) wurde mit H_2 und Pd/C (kat.) in EtOH (5 mL) bei RT für 4 Std. umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und die

Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurde ein gelber Feststoff (182 mg, 42 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.55 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 8.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.89-7.65 (m, 3H), 7.43 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 5.62 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 160.67, 157.80, 152.02, 151.98, 148.60, 133.66, 130.30 (2C), 129.52, 128.06, 125.46, 125.47, 124.02, 114.07, 114.00 (2C), 99.00. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 303.13527 für $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_6$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 303.13521.

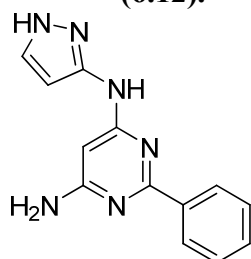
9.7.1.14 Herstellung von *N*-(4-(4-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)propionamid (6.9c).



6.8c (35 mg, 0.1 mmol) wurde in abs. THF (1 mL) gelöst, bevor die Lösung auf 0 °C herunter gekühlt und DIPEA (34 μL , 0.2 mmol) hinzu gegeben wurde. 1 mL einer Lösung aus Propionylchlorid (56 μL , 0.7 mmol) in abs. THF (5 mL) wurde zu der ersten Lösung zugetropft. Nach 15 Min. bei 0 °C wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/ H_2O mit 0.1 % TFA) wurde ein Feststoff (11 mg, 26 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.56 (s, 1H), 10.46 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.88-7.78 (m, 3H), 7.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.54-7.50 (m, 1H), 7.00 (s, 1H), 2.38 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.26, 159.02, 157.28, 150.38, 141.32, 132.98, 128.55, 127.78, 125.52, 123.22, 120.76, 118.85, 118.48, 115.86, 113.58, 98.17, 29.62, 9.65. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 359.16149 für $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 359.16153.

9.7.1.15 Herstellung von *N*-(4-(4-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)chinazolin-2-yl)phenyl)acrylamid (6.10c).

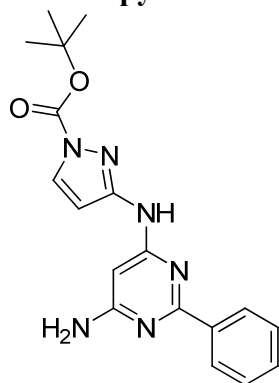
6.8c (30 mg, 0.1 mmol) wurde in abs. THF/DMF (2 mL, 1:1) gelöst, bevor die Lösung auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ herunter gekühlt und DIPEA (51 μL , 0.3 mmol) hinzu gegeben wurde. 1 mL einer Lösung aus Acryloylchlorid (36 μL , 0.5 mmol) in abs. THF (5 mL) wurden zu der ersten Lösung zugetropft. Nach 15 Min. bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC (MeCN/H₂O mit 0.1 % TFA) wurde ein Feststoff (4 mg, 11 %) isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.45 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.64 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.84-7.81 (m, 5H), 7.54-7.50 (m, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.49 (dd, *J* = 17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.30 (dd, *J* = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.84-5.76 (dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.86, 159.39, 157.76, 150.67, 141.31, 133.92, 133.49, 132.25, 129.06 (2C), 128.25, 127.54, 126.04, 126.00, 123.70, 123.54, 119.32 (2C), 98.58, (1 Kohlenstoffatom konnte nicht ermittelt werden). HRMS (ESI-MS) Berechnet: 357.14584 für C₂₀H₁₇N₆O [M+H⁺], Gefunden: 357.14591.

9.7.1.16 Herstellung von 2-Phenyl-*N*4-(1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4,6-diamin (6.12).

6-Chloro-2-phenylpyrimidin-4-amin (428 mg, 2.08 mmol), 3-Pyrazolamin (865 mg, 10.4 mmol), NaI (1.6 g, 10.4 mmol) und HCl (1 N, kat.) wurden in *n*-Butanol (10 mL) für 8 Std. unter Rückfluss erhitzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-4 % MeOH/DCM) wurde ein weißer Feststoff isoliert (379 mg, 72 %): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.46 (s, 1H), 11.47 (s, 1H), 10.58

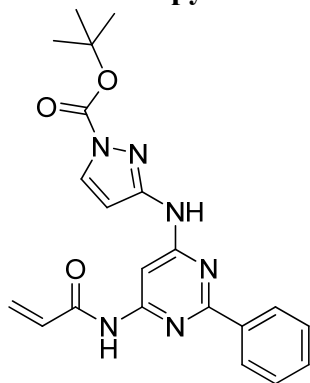
(dd, $J = 7.1, 2.5$ Hz, 2H), 9.91 (s, 1H), 9.79-9.65 (m, 3H), 8.69 (s, 2H), 8.59 (d, $J = 20.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.44, 162.24, 159.89, 149.22, 138.73, 129.63, 128.57, 128.00 (2C), 127.43 (2C), 95.43, 83.16. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 253.11962 für $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 253.11941.

9.7.1.17 Herstellung von *tert*-Butyl 3-(6-amino-2-phenylpyrimidin-4-ylamino)-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (6.13).



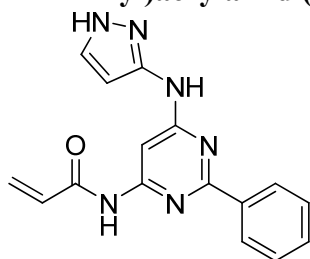
6.12 (370 mg, 1.5 mmol), Di-*tert*-butyldicarbonat (438 μL , 1.9 mmol) und TEA (264 μL , 1.9 mmol) wurden in DCM (5 mL) für 24 Std. bei RT umgesetzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1-3 % MeOH/DCM; Silicagel mit 5 % TEA in DCM neutralisiert) wurde ein weißer Feststoff (108 mg, 21 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (dd, $J = 6.6, 3.0$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.47-7.37 (m, 1H), 6.46 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 1.63 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.51, 164.31, 159.42, 152.59, 147.70, 138.29, 131.59, 130.42, 128.49 (2C), 128.19 (2C), 101.60, 85.94, 85.19, 28.22 (3C). HRMS (ESI-MS) Berechnet: 353.17205 für $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 353.17243.

9.7.1.18 Herstellung von *tert*-Butyl 3-(6-acrylamido-2-phenylpyrimidin-4-ylamino)-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (6.14b).



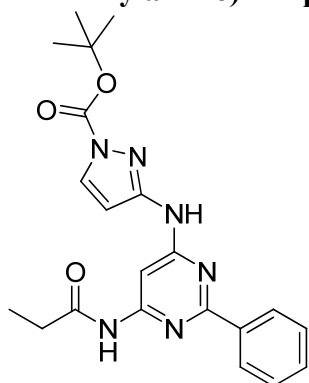
6.13 (30 mg, 85 μ mol), Acryloylchlorid (14 μ L, 0.2 mmol) und DIPEA (73 μ L, 0.4 mmol) wurden in abs. THF (1 mL) umgesetzt. Nach 2 Std. wurde nochmal Acryloylchlorid (5 μ L, 60 μ mol) zugegeben. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (5 mL) und NaHCO₃-Lsg. (5 mL, ges.) verdünnt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1 % MeOH/DCM) wurde ein Feststoff (20 mg, 58 %) isoliert: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.77 (s, 1H), 10.60 (s, 1H), 8.33 (dd, *J* = 6.6, 3.0 Hz, 2H), 8.25 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.89 (bs, 1H), 7.56-7.49 (m, 3H), 7.04 (bs, 1H), 6.67 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.41-6.28 (m, 1H), 5.90-5.79 (m, 1H), 1.59 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.37, 162.66, 160.95, 157.71, 152.00, 147.27, 137.52, 131.76, 131.22, 130.62, 128.59, 128.47 (2C), 127.62 (2C), 102.54, 92.40, 84.34, 27.59 (3C). HRMS (ESI-MS) Berechnet: 407.18262 für C₂₁H₂₃N₆O₃ [M+H⁺], Gefunden: 407.18222.

9.7.1.19 Herstellung von *N*-(6-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)-2-phenylpyrimidin-4-yl)acrylamid (**6.15b**)



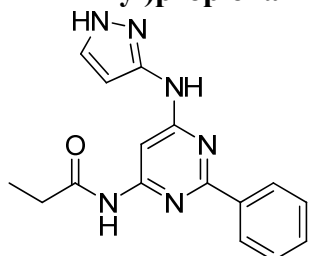
6.14b (12 mg, 30 μ mol) wurde in DCM (1 mL) gelöst und mit TFA (900 μ L, 25 % in DCM) bei RT umgesetzt. Nach 1 Std. wurden die Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (5 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit NaHCO₃-Lsg. (4 x 3 mL, ges.) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Der weiße Feststoff (9 mg, quantitativ) wurde nicht weiter aufgereinigt: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.34 (s, 1H), 10.66 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.35 (dd, *J* = 6.6, 3.0 Hz, 2H), 7.86 (bs, 1H), 7.69 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.55-7.51 (m, 3H), 6.68 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.55 (bs, 1H), 6.35 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.83 (dd, *J* = 10.2, 1.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.31, 162.53, 161.36, 157.29, 148.05, 137.81, 131.33, 130.38, 128.97, 128.38, 128.34 (2C), 127.58 (2C), 96.20, 91.29. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 307.13019 für C₁₆H₁₅N₆O [M+H⁺], Gefunden: 307.12995.

9.7.1.20 Herstellung von *tert*-Butyl 3-(2-phenyl-6-propionamidopyrimidin-4-ylamino)-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (6.14a).



6.13 (43 mg, 0.1 mmol), Propionylchlorid (21 μ L, 0.2 mmol) und DIPEA (104 μ L, 0.6 mmol) wurden in abs. THF (1 mL) umgesetzt. Nach 2 Std. wurde nochmal Propionylchlorid (5 μ L, 50 μ mol) zugegeben. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (5 mL) und NaHCO_3 -Lsg. (5 mL, ges.) verdünnt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (1 % MeOH/DCM) wurde ein Feststoff (31 mg, 64 %) isoliert: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.53 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 8.33 (dd, $J = 6.6, 3.0$ Hz, 2H), 8.25 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.55-7.50 (m, 3H), 7.03 (s, 1H), 2.46 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.60 (s, 9H), 1.08 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.70, 162.52, 160.90, 157.73, 152.05, 147.27, 137.59, 131.71, 130.54, 128.43 (2C), 127.58 (2C), 102.51, 91.83, 84.30, 29.44, 27.59, 9.19. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 409.19827 für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$], Gefunden: 409.19748.

9.7.1.21 Herstellung von *N*-(6-(1*H*-Pyrazol-3-ylamino)-2-phenylpyrimidin-4-yl)propionamid (6.15a).

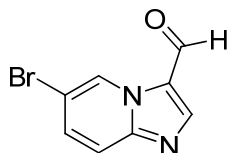


6.14a (20 mg, 57 μ mol) wurde in DCM (1 mL) gelöst und mit TFA (900 μ L, 25 % in DCM) bei RT umgesetzt. Nach 1 Std. wurden die Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (5 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit NaHCO_3 -Lsg. (4 x 3 mL, ges.) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend

im Vakuum entfernt. Der weiße Feststoff (16 mg, quantitativ) wurde nicht weiter aufgereinigt: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.33 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.34 (dd, $J = 6.6, 3.0$ Hz, 2H), 7.76 (bs, 1H), 7.58-7.42 (m, 3H), 6.55 (bs, 2H), 2.45 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.08 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.63, 162.38, 161.33, 157.19, 148.23, 137.88, 130.30, 128.72, 128.30 (2C), 127.54 (2C), 96.17, 90.69, 29.44, 9.26. HRMS (ESI-MS) Berechnet: 309.14584 für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 309.14572.

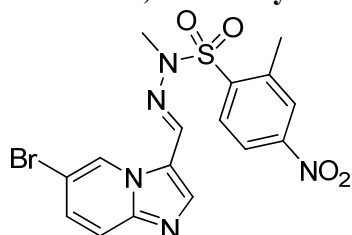
9.8 Herstellung PIK-75

9.8.1.1 Herstellung von 6-Bromoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-carbaldehyd (7.2).



Zu einer Lösung aus 6-Bromoimidazo[1,2-*a*]pyridin (10 g, 51 mmol) **7.1** in DMF (1.5 mL) wurde eine Lösung aus POCl_3 (813 μL , 8.9 mmol) in DMF (5 mL) zugetropft. Nach Zugabe von DMF (5 mL) wurde die Reaktionsmischung für 1 Std. bei 110 °C und dann weitere 4 Std. bei 90 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT heruntergekühlt und mit NaOH (5 M) neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit DCM (6 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie (90 % EtOAc/PE) wurden 214 mg (27 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.95 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.88-7.82 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 179.38, 146.99, 146.90, 133.19, 127.72, 124.64, 118.64, 109.59. HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 224.96580 für $\text{C}_8\text{H}_5^{79}\text{BrN}_2\text{O}$, Gefunden: 224.96597; Berechnet: 226.96376 für $\text{C}_8\text{H}_5^{81}\text{BrN}_2\text{O}$, Gefunden: 226.96355.

9.8.1.2 Herstellung von (*E*)-*N'*-((6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)methylen)-*N*,2-dimethyl-4-nitro-benzensulfonohydrazid 7.4 (PIK-75).



7.2 (100 mg, 0.4 mmol) wurde mit Methylhydrazin (23 μ L, 0.4 mmol) in EtOH (3 mL) unter Rückfluss erhitzt. Nach 3 Std. wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Pyridin (3 mL) aufgenommen und mit 2-Methyl-5-nitrobenzen-1-sulfonylchlorid (104 mg, 0.4 mmol) umgesetzt. Nach 4 Std. bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand diesmal in CHCl_3 (10 mL) und H_2O (10 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit CHCl_3 (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Nach präparativer HPLC ($\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 % TFA) wurden 18 mg (7.2 %) eines weißen Feststoffs erhalten: ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.10 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 8.74 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.46 (dd, J = 2.5 Hz, 8.4 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.46 (s, 3H), 2.69 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 145.50, 145.50, 144.70, 138.47, 136.74, 134.82, 134.58, 130.36, 128.16, 127.10, 124.80, 120.01, 118.06, 108.26, 31.53, 20.13. HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}^+]$ Berechnet: 452.00226 für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_5^{79}\text{Br}_1^{32}\text{S}$, Gefunden: 452.00214; Berechnet: 454.00022 für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_5^{81}\text{Br}_1^{32}\text{S}$, Gefunden: 453.99953.

9.9 Bestimmung der IC_{50} -Werte

9.9.1 IC_{50} -Werte für EGFR

Der HTRF[®]-Assay wurde mit dem HTRF[®]-KinEASE[™]TK Assaykit von Cisbio auf 384-Mikrotiterplatten der Firma Greiner bio-one mit einem Kavitätvolumen von 20 μ L durchgeführt. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden zunächst Verdünnungsreihen (7 verschiedene Konzentrationen + DMSO-Kontrolle) der zu untersuchenden Inhibitoren in DMSO hergestellt. Hiervon wurden je 2 μ L der Verdünnungen in 23 μ L

Kinasepuffer pipettiert, so dass eine finale DMSO-Konzentration von 2 % während der Reaktion erreicht wurde. Anschließend wurde die Kinase in Kinasepuffer verdünnt, 5 μL pro Kavität vorgelegt und mit 2.5 μL Inhibitorlösung für 2 Std. inkubiert. Dann wurden 2.5 μL der Substrat/ATP-Lösung zugegeben (als Substrat diente ein für TK universelles Tyr-Peptid). Sowohl die ATP als auch Substrat wurden bei Konzentrationen entsprechend ihrer K_M -Werte eingesetzt. Die Kinasereaktion wurde nach 30-50 Min. mit Detektionslösung (10 μL /Kavität) gestoppt und die Entwicklungsreaktion eingeleitet. Das Gesamtvolumen der Kinasereaktion betrug 10 μL , das der Entwicklungsreaktion 20 μL . Nach einer weiteren Stunde wurden die 348-Well-Platten mit einem Tecan Infinite[®] M1000 ausgelesen. Bei einer Anregungswellenlänge von 317 nm wurde die Aktivität der Kinase als Maß der Phosphorylierung durch Bildung des Quotienten der Emissionen bei 665 und 620 nm erhalten. Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte wurde der Emissionsquotient bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt und als Dosis-Effekt-Kurve dargestellt. Für jeden Inhibitor wurden mindestens 3 unabhängige Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

9.9.1.1 Reagenzien und Bedingungen

Kinase-Puffer (1 mL)

5 x HTRF-Puffer	200 μL
H ₂ O	775 μL
MgCl ₂ (1M)	5 μL
DTT (100 mM)	10 μL
Triton X-100 (1 %)	10 μL

Detektions-Lösung (1 mL)

Detektions-Puffer	480 μL
Fluorophor XL665 (16.7 μM)	20 μL
pTyr-Antikörper (50-fach verd.)	500 μL

Puffer-Zusammensetzung

5 x HTRF-Puffer: 50 mM HEPES (pH 7.0), 0.1 % BSA, 0.8 M KF, 20 mM EDTA

Detektions-Puffer: 50 mM HEPES (pH 7.0), 0.1 % BSA, 0.8 M KF, 20 mM EDTA

Tabelle 9.1: Parameter für den HTRF[®]-Assay.

EGFR	ATP [μ M]	Substrat [nM]	Reaktion [Min.]	Kinase [ng/well]
WT	1	500	50	40
L858R	9	220	30	3
T790M/L858R	4	200	30	1.5

Tabelle 9.2: Pipettierschema für die ATP/Substrat-Lösung.

EGFR	Substrat (50 μ M)	ATP (1 mM)	Kinasepuffer
WT	4 μ L	0.4 μ L	95.6 μ L
L858R	1.8 μ L	3.6 μ L	94.6 μ L
T790M/L858R	1.6 μ L	1.6 μ L	96.8 μ L

9.9.2 IC₅₀-Werte für p38 α

p38 α wurde entsprechend der Literatur aktiviert.¹⁴⁹ 100 μ L p38 α (14.4 mg/mL) und 41.6 μ L aktive MKK6 (T207E, T211E) (1.4 mg/mL) wurden in 858.5 μ L Aktivierungspuffer (50 mM Tris (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.001 % Tween 20) verdünnt und mit ATP bei 37 °C für 90 Min. inkubiert. Anschließend wurde das ATP über Nacht mittels Dialyse entfernt (Puffer: 25 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, und 10 % (v/v) Glycerol).

Die IC₅₀-Werte für die p38 α Kinase wurden mit dem HTRF[®] KinEASE[™]-STK Assay-Kit von Cisbio entsprechend der Hersteller Angaben durchgeführt. Die Vorgehensweise wurde bereits für die IC₅₀-Bestimmung für die EGFR-Varianten beschrieben (siehe 9.9.1). Abweichend davon, wurden GST-ATF2 als Substrat und die entsprechenden Antikörper anti-ATF2 und anti-GST-D2 eingesetzt. Sowohl ATP als auch Substrat wurden bei Konzentrationen entsprechend des jeweiligen K_M-Wertes

eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen waren: p38 α 4 ng/Kavität; ATF2 200 ng/Kavität; ATP 5 μ M; die Reaktionszeit betrug 15 Minuten.^{120*}

* Eine genauere Beschreibung zur Durchführung ist in der Masterarbeit von Martin Termathe zu finden.

Literaturverzeichnis

- (1) Schmidt, R. F.; Lang, F. *Physiologie des Menschen*; Springer Verlag, 2007.
- (2) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
- (3) Fuhrmann, J.; Schmidt, A.; Spiess, S.; Lehner, A.; Turgay, K.; Mechtler, K.; Charpentier, E.; Clausen, T. *Science* **2009**, *324*, 1323-1327.
- (4) Kowluru, A. *Biochem Pharmacol* **2002**, *63*, 2091-2100.
- (5) Viola, R. E. *Acc Chem Res* **2001**, *34*, 339-349.
- (6) Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; Richters, A.; Tückmantel, S.; Simard, J. R.; Rauh, D. *Arch Pharm (Weinheim)* **2010**, *343*, 193-206.
- (7) Vintonyak, V. V.; Antonchick, A. P.; Rauh, D.; Waldmann, H. *Curr Opin Chem Biol* **2009**, *13*, 272-283.
- (8) Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. *Science* **1991**, *253*, 407-414.
- (9) Backes, A. C.; Zech, B.; Felber, B.; Klebl, B.; Müller, G. *Expert Opin Drug Discovery* **2008**, *3*, 1427-1449.
- (10) Backes, A. C.; Zech, B.; Felber, B.; Klebl, B.; Müller, G. *Expert Opin Drug Discovery* **2008**, *3*, 1409-1425.
- (11) Azam, M.; Seeliger, M. A.; Gray, N. S.; Kuriyan, J.; Daley, G. Q. *Nat Struct Mol Biol* **2008**, *15*, 1109-1118.
- (12) Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Eyck, L. F. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 17783-17788.
- (13) Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Jänne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 786-792.
- (14) Michalczyk, A.; Klüter, S.; Rode, H. B.; Simard, J. R.; Grütter, C.; Rabiller, M.; Rauh, D. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 3482-3488.
- (15) Yun, C. H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K. K.; Meyerson, M.; Eck, M. J. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2070-2075.
- (16) Talpaz, M.; Shah, N. P.; Kantarjian, H.; Donato, N.; Nicoll, J.; Paquette, R.; Cortes, J.; O'Brien, S.; Nicaise, C.; Bleickardt, E.; Blackwood-Chirchir, M. A.; Iyer, V.; Chen, T. T.; Huang, F.; Decillis, A. P.; Sawyers, C. L. *N Engl J Med* **2006**, *354*, 2531-2541.
- (17) Fabbro, D.; Manley, P. W.; Jahnke, W.; Liebetanz, J.; Szyttenholm, A.; Fendrich, G.; Strauss, A.; Zhang, J.; Gray, N. S.; Adrian, F.; Warmuth, M.; Pelle, X.; Grotzfeld, R.; Berst, F.; Marzinzik, A.; Cowan-Jacob, S. W.; Furet, P.; Mestan, J. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1804*, 454-462.
- (18) Zhang, J.; Adrian, F. J.; Jahnke, W.; Cowan-Jacob, S. W.; Li, A. G.; Iacob, R. E.; Sim, T.; Powers, J.; Dierks, C.; Sun, F.; Guo, G. R.; Ding, Q.; Okram, B.; Choi, Y.; Wojciechowski, A.; Deng, X.; Liu, G.; Fendrich, G.; Strauss, A.; Vajpai, N.; Grzesiek, S.; Tuntland, T.; Liu, Y.; Bursulaya, B.; Azam, M.; Manley, P. W.; Engen, J. R.; Daley, G. Q.; Warmuth, M.; Gray, N. S. *Nature* **2010**, *463*, 501-506.

- (19) Eglen, R.; Reisine, T. *Pharmacol Ther* **2011**, *130*, 144-156.
- (20) Morphy, R. *J Med Chem* **2010**, *53*, 1413-1437.
- (21) Zhou, W.; Ercan, D.; Chen, L.; Yun, C. H.; Li, D.; Capelletti, M.; Cortot, A. B.; Chirieac, L.; Jacob, R. E.; Padera, R.; Engen, J. R.; Wong, K. K.; Eck, M. J.; Gray, N. S.; Jänne, P. A. *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.
- (22) Cohen, M. S.; Zhang, C.; Shokat, K. M.; Taunton, J. *Science* **2005**, *308*, 1318-1321.
- (23) Sos, M. L.; Rode, H. B.; Heynck, S.; Peifer, M.; Fischer, F.; Klüter, S.; Pawar, V. G.; Reuter, C.; Heuckmann, J. M.; Weiss, J.; Ruddigkeit, L.; Rabiller, M.; Koker, M.; Simard, J. R.; Getlik, M.; Yuza, Y.; Chen, T. H.; Greulich, H.; Thomas, R. K.; Rauh, D. *Cancer Res* **2010**, *70*, 868-874.
- (24) Klüter, S.; Simard, J. R.; Rode, H. B.; Grütter, C.; Pawar, V.; Raaijmakers, H. C.; Barf, T. A.; Rabiller, M.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D. *Chembiochem* **2010**, *11*, 2557-2566.
- (25) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 28-39.
- (26) Heo, Y. S.; Kim, S. K.; Seo, C. I.; Kim, Y. K.; Sung, B. J.; Lee, H. S.; Lee, J. I.; Park, S. Y.; Kim, J. H.; Hwang, K. Y.; Hyun, Y. L.; Jeon, Y. H.; Ro, S.; Cho, J. M.; Lee, T. G.; Yang, C. H. *EMBO J* **2004**, *23*, 2185-2195.
- (27) Levitzki, A.; Mishani, E. *Annu Rev Biochem* **2006**, *75*, 93-109.
- (28) Lander, E. S. *et al. Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- (29) Venter, J. C. *et al. Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- (30) Meyerson, M.; Gabriel, S.; Getz, G. *Nat Rev Genet* **2010**, *11*, 685-696.
- (31) Feero, W. G.; Gutmacher, A. E.; Collins, F. S. *N Engl J Med* **2010**, *362*, 2001-2011.
- (32) Weinstein, I. B. *Science* **2002**, *297*, 63-64.
- (33) Weinstein, I. B.; Joe, A. K. *Nat Clin Pract Oncol* **2006**, *3*, 448-457.
- (34) Jänne, P. A.; Gray, N.; Settleman, J. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 709-723.
- (35) de Bono, J. S.; Ashworth, A. *Nature* **2010**, *467*, 543-549.
- (36) Hamburg, M. A.; Collins, F. S. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 301-304.
- (37) Drmanac, R. *et al. Science* **2010**, *327*, 78-81.
- (38) Dickson, D. *Nature* **1999**, *401*, 729.
- (39) Collins, F. S.; Barker, A. D. *Sci Am* **2007**, *296*, 50-57.
- (40) Hudson, T. J. *et al. Nature* **2010**, *464*, 993-998.
- (41) Gschwind, A.; Fischer, O. M.; Ullrich, A. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 361-370.
- (42) Bikker, J. A.; Brooijmans, N.; Wissner, A.; Mansour, T. S. *J Med Chem* **2009**, *52*, 1493-1509.
- (43) Daub, H.; Specht, K.; Ullrich, A. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 1001-1010.
- (44) Blencke, S.; Ullrich, A.; Daub, H. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 15435-15440.
- (45) Carter, T. A.; Wodicka, L. M.; Shah, N. P.; Velasco, A. M.; Fabian, M. A.; Treiber, D. K.; Milanov, Z. V.; Atteridge, C. E.; Biggs, W. H., 3rd; Edeen, P. T.; Floyd, M.; Ford, J. M.; Grotzfeld, R. M.; Herrgard, S.; Insko, D. E.; Mehta, S. A.; Patel, H. K.; Pao, W.; Sawyers, C. L.; Varmus, H.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 11011-11016.
- (46) Yun, C. H.; Boggon, T. J.; Li, Y.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Meyerson, M.; Eck, M. J. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 217-227.
- (47) Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares,

- G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 127-132.
- (48) Young, M. A.; Shah, N. P.; Chao, L. H.; Seeliger, M.; Milanov, Z. V.; Biggs, W. H.; Treiber, D. K.; Patel, H. K.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J.; Sawyers, C. L.; Kuriyan, J. J. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1007-1014.
- (49) Fedorov, O.; Muller, S.; Knapp, S. *Nat Chem Biol* **2010**, *6*, 166-169.
- (50) Liu, Y.; Gray, N. S. *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 358-364.
- (51) Cohen, M. S.; Hadjivassiliou, H.; Taunton, J. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 156-160.
- (52) Knight, Z. A.; Lin, H.; Shokat, K. M. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 130-137.
- (53) Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M. *J Med Chem* **2010**, *53*, 2681-2694.
- (54) Klebe, G. *Wirkstoffdesign* Spektrum akademischer Verlag, 2009
- (55) Hajduk, P. J.; Greer, J. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 211-219.
- (56) Gill, A. L.; Frederickson, M.; Cleasby, A.; Woodhead, S. J.; Carr, M. G.; Woodhead, A. J.; Walker, M. T.; Congreve, M. S.; Devine, L. A.; Tisi, D.; O'Reilly, M.; Seavers, L. C.; Davis, D. J.; Curry, J.; Anthony, R.; Padova, A.; Murray, C. W.; Carr, R. A.; Jhoti, H. *J Med Chem* **2005**, *48*, 414-426.
- (57) Pargellis, C.; Tong, L.; Churchill, L.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Grob, P. M.; Hickey, E. R.; Moss, N.; Pav, S.; Regan, J. *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 268-272.
- (58) Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 730-739.
- (59) Regan, J.; Breitfelder, S.; Cirillo, P.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Hickey, E.; Klaus, B.; Madwed, J.; Moriak, M.; Moss, N.; Pargellis, C.; Pav, S.; Proto, A.; Swinamer, A.; Tong, L.; Torcellini, C. *J Med Chem* **2002**, *45*, 2994-3008.
- (60) Bagley, M. C.; Davis, T.; Dix, M. C.; Widdowson, C. S.; Kipling, D. *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 4158-4164.
- (61) Bukhtiyarova, M.; Northrop, K.; Chai, X.; Casper, D.; Karpusas, M.; Springman, E. *Protein Expr Purif* **2004**, *37*, 154-161.
- (62) Simard, J. R.; Getlik, M.; Grütter, C.; Pawar, V.; Wulfert, S.; Rabiller, M.; Rauh, D. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 13286-13296.
- (63) Simard, J. R.; Getlik, M.; Grütter, C.; Schneider, R.; Wulfert, S.; Rauh, D. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 4152-4160.
- (64) Simard, J. R.; Klüter, S.; Grütter, C.; Getlik, M.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Rauh, D. *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 394-396.
- (65) Regan, J.; Pargellis, C. A.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Hickey, E. R.; Peet, G. W.; Proto, A.; Swinamer, A.; Moss, N. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13*, 3101-3104.
- (66) Kroe, R. R.; Regan, J.; Proto, A.; Peet, G. W.; Roy, T.; Landro, L. D.; Fuschetto, N. G.; Pargellis, C. A.; Ingraham, R. H. *J Med Chem* **2003**, *46*, 4669-4675.
- (67) Regan, J.; Capolino, A.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Hickey, E.; Kroe, R. R.; Madwed, J.; Moriak, M.; Nelson, R.; Pargellis, C. A.; Swinamer, A.; Torcellini, C.; Tsang, M.; Moss, N. *J Med Chem* **2003**, *46*, 4676-4686.
- (68) Lafont, V.; Armstrong, A. A.; Ohtaka, H.; Kiso, Y.; Mario Amzel, L.; Freire, E. *Chem Biol Drug Des* **2007**, *69*, 413-422.
- (69) Klüter, S.; Grütter, C.; Naqvi, T.; Rabiller, M.; Simard, J. R.; Pawar, V.; Getlik, M.; Rauh, D. *J Med Chem* **2010**, *53*, 357-367.
- (70) Getlik, M.; Grütter, C.; Simard, J. R.; Klüter, S.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Robubi, A.; Rauh, D. *J Med Chem* **2009**, *52*, 3915-3926.

- (71) Blair, J. A.; Rauh, D.; Kung, C.; Yun, C. H.; Fan, Q. W.; Rode, H.; Zhang, C.; Eck, M. J.; Weiss, W. A.; Shokat, K. M. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 229-238.
- (72) Levinson, N. M.; Kuchment, O.; Shen, K.; Young, M. A.; Koldobskiy, M.; Karplus, M.; Cole, P. A.; Kuriyan, J. *PLoS Biol* **2006**, *4*, e144.
- (73) Apsel, B.; Blair, J. A.; Gonzalez, B.; Nazif, T. M.; Feldman, M. E.; Aizenstein, B.; Hoffman, R.; Williams, R. L.; Shokat, K. M.; Knight, Z. A. *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 691-699.
- (74) Du, J.; Bernasconi, P.; Clauser, K. R.; Mani, D. R.; Finn, S. P.; Beroukhir, R.; Burns, M.; Julian, B.; Peng, X. P.; Hieronymus, H.; Maglathlin, R. L.; Lewis, T. A.; Liao, L. M.; Nghiemphu, P.; Mellinshoff, I. K.; Louis, D. N.; Loda, M.; Carr, S. A.; Kung, A. L.; Golub, T. R. *Nat Biotechnol* **2009**, *27*, 77-83.
- (75) Schenone, S.; Zanolli, S.; Brullo, C.; Crespan, E.; Maga, G. *Curr. Drug Ther.* **2008**, *3*, 158-176.
- (76) Chang, Y. M.; Bai, L.; Liu, S.; Yang, J. C.; Kung, H. J.; Evans, C. P. *Oncogene* **2008**, *27*, 6365-6375.
- (77) Yeatman, T. J. *Nat Rev Cancer*. **2004**, *4*, 470-480.
- (78) Dumas, J.; Hatoum-Mokdad, H.; Sibley, R.; Riedl, B.; Scott, W. J.; Monahan, M. K.; Lowinger, T. B.; Brennan, C.; Natero, R.; Turner, T.; Johnson, J. S.; Schoenleber, R.; Bhargava, A.; Wilhelm, S. M.; Housley, T. J.; Ranges, G. E.; Shrikhande, A. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10*, 2051-2054.
- (79) Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 169-181.
- (80) Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. *Science* **1996**, *274*, 1531-1534.
- (81) Nienaber, V. L.; Richardson, P. L.; Klighofer, V.; Bouska, J. J.; Giranda, V. L.; Greer, J. *Nat Biotechnol* **2000**, *18*, 1105-1108.
- (82) Hoelzemann, G.; Crassier, H.; Rautenberg, W. **2007**, WO2007017083 (A1).
- (83) Gerber, P. R. *J Comput Aided Mol Des* **1998**, *12*, 37-51.
- (84) Gerber, P. R.; Muller, K. *J Comput Aided Mol Des* **1995**, *9*, 251-268.
- (85) Hunter, C. A.; Singh, J.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 837-846.
- (86) Shewchuk, L.; Hassell, A.; Wisely, B.; Rocque, W.; Holmes, W.; Veal, J.; Kuyper, L. F. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 133-138.
- (87) Heron, N. M.; Anderson, M.; Blowers, D. P.; Breed, J.; Eden, J. M.; Green, S.; Hill, G. B.; Johnson, T.; Jung, F. H.; McMiken, H. H.; Mortlock, A. A.; Pannifer, A. D.; Pauptit, R. A.; Pink, J.; Roberts, N. J.; Rowsell, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1320-1323.
- (88) Stamos, J.; Sliwkowski, M. X.; Eigenbrot, C. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 46265-46272.
- (89) Schaller, M. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1540*, 1-21.
- (90) Calalb, M. B.; Polte, T. R.; Hanks, S. K. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 954-963.
- (91) Nowakowski, J.; Cronin, C. N.; McRee, D. E.; Knuth, M. W.; Nelson, C. G.; Pavletich, N. P.; Rogers, J.; Sang, B. C.; Scheibe, D. N.; Swanson, R. V.; Thompson, D. A. *Structure* **2002**, *10*, 1659-1667.
- (92) Owens, L. V.; Xu, L.; Craven, R. J.; Dent, G. A.; Weiner, T. M.; Kornberg, L.; Liu, E. T.; Cance, W. G. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2752-2755.
- (93) Shor, A. C.; Keschman, E. A.; Lee, F. Y.; Muro-Cacho, C.; Letson, G. D.; Trent, J. C.; Pledger, W. J.; Jove, R. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2800-2808.

- (94) Fabian, M. A.; Biggs, W. H., 3rd; Treiber, D. K.; Atteridge, C. E.; Azimioara, M. D.; Benedetti, M. G.; Carter, T. A.; Ciceri, P.; Edeen, P. T.; Floyd, M.; Ford, J. M.; Galvin, M.; Gerlach, J. L.; Grotzfeld, R. M.; Herrgard, S.; Insko, D. E.; Insko, M. A.; Lai, A. G.; Lelias, J. M.; Mehta, S. A.; Milanov, Z. V.; Velasco, A. M.; Wodicka, L. M.; Patel, H. K.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 329-336.
- (95) Dar, A. C.; Lopez, M. S.; Shokat, K. M. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1015-1022.
- (96) Bradeen, H. A.; Eide, C. A.; O'Hare, T.; Johnson, K. J.; Willis, S. G.; Lee, F. Y.; Druker, B. J.; Deininger, M. W. *Blood* **2006**, *108*, 2332-2338.
- (97) von Bubnoff, N.; Veach, D. R.; van der Kuip, H.; Aulitzky, W. E.; Sanger, J.; Seipel, P.; Bornmann, W. G.; Peschel, C.; Clarkson, B.; Duyster, J. *Blood* **2005**, *105*, 1652-1659.
- (98) Zunder, E. R.; Knight, Z. A.; Houseman, B. T.; Apsel, B.; Shokat, K. M. *Cancer Cell.* **2008**, *14*, 180-192.
- (99) Crespo, A.; Fernandez, A. *Mol Pharm* **2008**, *5*, 430-437.
- (100) Wagner, E. F.; Nebreda, A. R. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 537-549.
- (101) Mayer, R. J.; Callahan, J. F. *Drug Discov Today* **2006**, *3*, 49-54.
- (102) Simard, J. R.; Grütter, C.; Pawar, V.; Aust, B.; Wolf, A.; Rabiller, M.; Wulfert, S.; Robubi, A.; Klüter, S.; Ottmann, C.; Rauh, D. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 18478-18488.
- (103) Tokarski, J. S.; Newitt, J. A.; Chang, C. Y.; Cheng, J. D.; Wittekind, M.; Kiefer, S. E.; Kish, K.; Lee, F. Y.; Borzilleri, R.; Lombardo, L. J.; Xie, D.; Zhang, Y.; Klei, H. E. *Cancer Res* **2006**, *66*, 5790-5797.
- (104) Kaspadya, M.; Narayanaswamy, V. K.; Raju, M.; Rao, G. K. *Lett in Drug Des Discov* **2009**, *6*, 21-28.
- (105) Fitzgerald, C. E.; Patel, S. B.; Becker, J. W.; Cameron, P. M.; Zaller, D.; Pikounis, V. B.; O'Keefe, S. J.; Scapin, G. *Nat Struct Biol* **2003**, *10*, 764-769.
- (106) Goedert, M.; Cuenda, A.; Craxton, M.; Jakes, R.; Cohen, P. *EMBO J* **1997**, *16*, 3563-3571.
- (107) Ben-Levy, R.; Hooper, S.; Wilson, R.; Paterson, H. F.; Marshall, C. J. *Curr Biol* **1998**, *8*, 1049-1057.
- (108) ter Haar, E.; Prabhakar, P.; Liu, X.; Lepre, C. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 9733-9739.
- (109) Beaumont, K.; Webster, R.; Gardner, I.; Dack, K. *Curr Drug Metab* **2003**, *4*, 461-485.
- (110) Rudolph, J., Cantin, L.-D., Magnuson, S., Bullock, W., Bullion, A.-M., Chen, L., Chuang, C.-Y., Liang, S., Majumdar, D., Ogutu, H., Olague, A., Qi, N., Wickens, P.L., *WO 2004/050651* **2004**.
- (111) Adrian, F. J.; Ding, Q.; Sim, T.; Velentza, A.; Sloan, C.; Liu, Y.; Zhang, G.; Hur, W.; Ding, S.; Manley, P.; Mestan, J.; Fabbro, D.; Gray, N. S. *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 95-102.
- (112) Eglen, R. M.; Reisine, T. *Assay Drug Dev Technol* **2009**, *7*, 22-43.
- (113) Johnson, L. N. *Q Rev Biophys* **2009**, *42*, 1-40.
- (114) Wu, W. I.; Voegtli, W. C.; Sturgis, H. L.; Dizon, F. P.; Vigers, G. P.; Brandhuber, B. J. *PLoS One* **2010**, *5*, e12913.
- (115) Akella, R.; Moon, T. M.; Goldsmith, E. J. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1784*, 48-55.

- (116) Perry, J. J.; Harris, R. M.; Moiani, D.; Olson, A. J.; Tainer, J. A. *J Mol Biol* **2009**, *391*, 1-11.
- (117) Tong, L.; Pav, S.; White, D. M.; Rogers, S.; Crane, K. M.; Cywin, C. L.; Brown, M. L.; Pargellis, C. A. *Nat Struct Biol* **1997**, *4*, 311-316.
- (118) Diskin, R.; Engelberg, D.; Livnah, O. *J Mol Biol* **2008**, *375*, 70-79.
- (119) Pierce, A. C.; ter Haar, E.; Binch, H. M.; Kay, D. P.; Patel, S. R.; Li, P. *J Med Chem* **2005**, *48*, 1278-1281.
- (120) Termathe, M. *Masterarbeit* **2010**, TU Dortmund.
- (121) Comess, K. M.; Sun, C.; Abad-Zapatero, C.; Goedken, E. R.; Gum, R. J.; Borhani, D. W.; Argiriadi, M.; Groebe, D. R.; Jia, Y.; Clampit, J. E.; Haasch, D. L.; Smith, H. T.; Wang, S.; Song, D.; Coen, M. L.; Cloutier, T. E.; Tang, H.; Cheng, X.; Quinn, C.; Liu, B.; Xin, Z.; Liu, G.; Fry, E. H.; Stoll, V.; Ng, T. I.; Banach, D.; Marcotte, D.; Burns, D. J.; Calderwood, D. J.; Hajduk, P. J. *ACS Chem Biol* **2011**, 234-244.
- (122) Collins, Q. F.; Xiong, Y.; Lupo, E. G., Jr.; Liu, H. Y.; Cao, W. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 24336-24344.
- (123) Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. *Mol Cell Proteomics* **2002**, *1*, 376-386.
- (124) www.kinaxo.com **3. März 2011**.
- (125) Klüter S. *Dissertation* **2010**, TU Dortmund.
- (126) Bohlke, N. *Masterarbeit* **2010**, TU Dortmund.
- (127) Wheeler, D. L.; Dunn, E. F.; Harari, P. M. *Nat Rev Clin Oncol* **2010**, *7*, 493-507.
- (128) Zandi, R.; Larsen, A. B.; Andersen, P.; Stockhausen, M. T.; Poulsen, H. S. *Cell Signal* **2007**, *19*, 2013-2023.
- (129) Zhang, Z.; Stiegler, A. L.; Boggon, T. J.; Kobayashi, S.; Halmos, B. *Oncotarget* **2010**, *1*, 497-514.
- (130) Wong, K. K. *Lung Cancer* **2008**, *60 Suppl 2*, 10-18.
- (131) Kwak, E. L.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Godin-Heymann, N.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Driscoll, D. R.; Fidias, P.; Lynch, T. J.; Rabindran, S. K.; McGinnis, J. P.; Wissner, A.; Sharma, S. V.; Isselbacher, K. J.; Settleman, J.; Haber, D. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 7665-7670.
- (132) Li, D.; Ambrogio, L.; Shimamura, T.; Kubo, S.; Takahashi, M.; Chirieac, L. R.; Padera, R. F.; Shapiro, G. I.; Baum, A.; Himmelsbach, F.; Rettig, W. J.; Meyerson, M.; Solca, F.; Greulich, H.; Wong, K. K. *Oncogene* **2008**, *27*, 4702-4711.
- (133) Wissner, A.; Mansour, T. S. *Arch Pharm (Weinheim)* **2008**, *341*, 465-477.
- (134) Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. *PLoS Med* **2005**, *2*, e73.
- (135) Littke, A. F.; Fu, G. C. *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 4176-4211.
- (136) Roy, A. D.; Subramanian, A.; Roy, R. *J Org Chem* **2006**, *71*, 382-385.
- (137) Chakravarty, S.; Dugar, S.; Perumattam, J. J.; Schreiner, G. F.; Liu, D. Y.; Lewicki, J. A. *WO 2000/12497A2* **2000**.
- (138) Shen, Z.; Hong, Y.; He, X.; Mo, W.; Hu, B.; Sun, N.; Hu, X. *Org Lett* **2010**, *12*, 552-555.
- (139) Engelman, J. A.; Chen, L.; Tan, X.; Crosby, K.; Guimaraes, A. R.; Upadhyay, R.; Maira, M.; McNamara, K.; Perera, S. A.; Song, Y.; Chirieac, L. R.; Kaur, R.; Lightbown, A.; Simendinger, J.; Li, T.; Padera, R. F.; Garcia-Echeverria, C.;

- Weissleder, R.; Mahmood, U.; Cantley, L. C.; Wong, K. K. *Nat Med* **2008**, *14*, 1351-1356.
- (140) Sos, M. L.; Fischer, S.; Ullrich, R.; Peifer, M.; Heuckmann, J. M.; Koker, M.; Heynck, S.; Stuckrath, I.; Weiss, J.; Fischer, F.; Michel, K.; Goel, A.; Regales, L.; Politi, K. A.; Perera, S.; Getlik, M.; Heukamp, L. C.; Ansen, S.; Zander, T.; Beroukhim, R.; Kashkar, H.; Shokat, K. M.; Sellers, W. R.; Rauh, D.; Orr, C.; Hoeflich, K. P.; Friedman, L.; Wong, K. K.; Pao, W.; Thomas, R. K. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**, *106*, 18351-18356.
- (141) Knight, Z. A.; Gonzalez, B.; Feldman, M. E.; Zunder, E. R.; Goldenberg, D. D.; Williams, O.; Loewith, R.; Stokoe, D.; Balla, A.; Toth, B.; Balla, T.; Weiss, W. A.; Williams, R. L.; Shokat, K. M. *Cell* **2006**, *125*, 733-747.
- (142) Hayakawa, M.; Kawaguchi, K.; Kaizawa, H.; Koizumi, T.; Ohishi, T.; Yamano, M.; Okada, M.; Ohta, M.; Tsukamoto, S.; Raynaud, F. I.; Parker, P.; Workman, P.; Waterfield, M. D. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 5837-5844.
- (143) Richters, A. *Masterarbeit* **2009**, TU Dortmund.
- (144) O'Hare, T.; Deininger, M. W.; Eide, C. A.; Clackson, T.; Druker, B. J. *Clin Cancer Res*, *17*, 212-221.
- (145) Zhang, L. H., Zhu, L. *WO/2001/004115* **2001**.
- (146) Kim, H. O., Kahn, M. *Synlett* **1999**, 1239-1240.
- (147) Ryono, D. E., Cheng, P. T. W., Bolton, S. A., Chen, S., Shi, Y., Meng, W., Tino, J. A., Zhang, H., Sulsky, R. B., *US2008/9465* **2008**.
- (148) Gill, A. L., Carr, M.G., Lyons, J.F., Thompson, N.T., Rees, D.C., *WO2005/100338* **2005**.
- (149) Sullivan, J. E.; Holdgate, G. A.; Campbell, D.; Timms, D.; Gerhardt, S.; Breed, J.; Breeze, A. L.; Bermingham, A.; Pauptit, R. A.; Norman, R. A.; Embrey, K. J.; Read, J.; VanScyoc, W. S.; Ward, W. H. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16475-16490.

Danksagung

Wenn ich heute auf die Zeit meiner Promotion zurückblicke, fallen mir unzählige spannende Tage und tolle Menschen ein, die mir stets zur Seite standen und von denen ich viel gelernt habe – einigen möchte ich an dieser Stelle meinen persönlichen Dank aussprechen:

In besonderem Maße danke ich Prof. Dr. Daniel Rauh für die stets interessanten Aufgabenstellungen und Ideen, für seine immerwährende Motivation, seinen Einsatz und seine Hilfsbereitschaft – all dies war grundlegend für das Gelingen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Herbert Waldmann möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Möglichkeit, diese Arbeit am CGC durchführen zu können, und für seine Unterstützung danken.

Weiterhin danke ich den Kollegen in der AG Rauh für die tolle und direkte Zusammenarbeit, ohne die viele dieser Arbeiten nicht möglich gewesen wären. Haridas danke ich für seine Hilfe, die gute Betreuung – insbesondere zu Beginn meiner Zeit am CGC – und die vielen Momente im Labor, in denen er uns alle immer wieder zum Lachen gebracht hat. Jeff, Christian und André möchte ich für die besonders gute Zusammenarbeit und zahlreichen Hilfestellungen danken – und natürlich auch für den einen oder anderen geselligen Abend. Ich danke Svenja, Zhizhou und André für das Korrekturlesen dieser Arbeit. André und Jeff möchte ich zudem für ihre Freundschaft danken. Sie heiterte stets meinen Laboralltag auf und war ohne Frage eine wichtige Stütze in Zeiten, in denen es mal nicht so gut lief.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie und besonders meinen Eltern, die mich während der ganzen Jahre in Allem unterstützt haben, was ich getan habe, und die immer für mich da waren. Meiner Freundin Anne möchte ich für ihre Liebe und Zuversicht danken, und dass sie mir stets Rückhalt gegeben hat.

Matthäus

Eidstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Matthäus Getlik

Dortmund, Mai 2011