

**Entwicklung neuartiger isoform-selektiver Inhibitoren
der
c-Jun N-terminalen Kinase 2 und 3**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Valentin Rudolf Wydra
aus Albstadt-Ebingen

Tübingen
2025

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

17.12.2025

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Laufer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

„Forsan et haec olim meminisse iuvabit.“

Vergil, *Aeneis* (Buch I, Vers 203)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bedanken bei...

...Meinem Doktorvater **Prof. Dr. S. Laufer**, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen gedurft zu haben, für die Anfertigung des Erstgutachtens, sowie für etliche stärkende Espressi und die große Geduld für mein Projekt.

...Dem Zweitbetreuer **Prof. Dr. M. Gehringer**, für seiner stetige Unterstützung und allzeit offene Türe.

...Dem Zweitgutachter **Prof. Dr. U. Rothbauer**, für das Anfertigen des Zweitgutachtens.

...**Dr. Roland Selig** und **Dr. Wolfgang Albrecht** von der HepaRegeniX GmbH, für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung bei der biologischen Testung und Konzeption dieser Arbeit. **Dr. R. Selig** sie hierbei explizit für das Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

...**Univ. Prof. Dr. L. Zender** von dem Universitätsklinikum Tübingen, für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis selbst einfache Zelltestung unter der Anleitung von **Stefan Zwirner**, dem hier auch nochmal besonders gedankt werden soll, durchführen gedurft zu haben.

...**Dr. Nicole Plank** und **Prof. Dr. P. Koch** von der Universität Regensburg, welche als verlässlicher Kooperationspartner mit Ihrer Hilfe beim Anfertigen einer Publikation sowie mit biologischen Testungen zu diesem Projekt beisteuerten.

...**Benedikt Masberg** und **Prof. Dr. M. Lämmerhofer** von der Universität Tübingen, für das Durchführen von Massenexperimenten und dem Liefern von HR-MS-Daten.

...**Dr. Florian Wittlinger** für die vielen gemeinsamen Workouts, dem Kreislaufen auf der Tartanbahn, sowie dem Hochpushen wenn mal wieder Crunchtime anstand. Für die gemeinsamen Zeit in den letzten 6 Jahren und für viele anregende Gespräche in allen Lebenslagen.

...**Gregor Schmidberger** für die besten Zeiten im 4N03 sowie in der gemeinsamen WG. Für seinen bodenständigen, staubtrockenen Witz, sowie für die besten Abenden im Schaf.

...**Dr. Theodor Dimitrov** für die vielen fachliche und auch un-fachlichen Gespräche beim Feiern, beim all wöchentlichen Essengehen, im guten alten 4N03 oder in der Schischabar.

...**Dr. Stanislav Andreev** für das Einführen in den AK Laufer-Lifestyle schon in meiner Zeit als Masterstudent, der Organisation von vielen gemeinsamen Urlauben mit der Truppe rund um „C. et al“ und dem always open Ear für Struggles aller Art.

...**Dr. Michael Forster** für die extreme chemische Expertise und die freundschaftliche Hilfsbereitschaft bei allen apparativen und synthetischen Fragestellungen und außerhalb des Labors.

...Den Top-Frauen und Top-Männern des „noisy Labors“: **Dr. Julia Galvez, Dr. Pascal Sander, Eric Eberlein, Dr. Leon Katzengruber**, sowie dem Ehrenmitglied **Dr. Laura Hillebrandt**, welche mich nach meinem Laborwechsel freundschaftlich und in bester Weise in das Nord-Labor aufgenommen hatten. Insbesondere sei **Eric Eberlein** für das Korrekturlesen diese Arbeit gedankt.

...Den verbliebenen Leuten des guten alten 4A03s und 4N03s, **Nico Seidler, Frederik Wilhelm Hacker, Mareike Möllers, Alexander Rasch, Raphael Ditzinger** und natürlich dem Vorzeigeschwaben des Aks, **Moritz Schwarz**. Insbesondere sei **Nico Seidler** und **Moritz Schwarz** für das Korrekturlesen diese Arbeit gedankt.

...Allen sonstigen (ehemaligen) Kollegen aus den AKs Laufer und Gehringer und kooperierenden AKs, insbesondere **Julia Liang, Dr. Stefan Gerstenecker, Dr. Ricardo Serafim** und **Dr. Thales Kronenberger**.

...Dem alt- ehrwürdigen **AkadOR Dr. Raimund Nieß**, der Sekretärin **Kristine Schmidt** sowie **Frau Bauer, Gerd Helms, Birgit Seiler** und **Mechtild Seybolt**, für die tatkräftige Unterstützung bei organisatorischen und technischen Problematiken aller Art, sowie bei der Ausstattung mit Chemikalien und Arbeitsgerät.

Ich möchte mich hiermit auch bei Allen bedanken die ich hier nicht explizit erwähnt habe, die mich aber durch meine Zeit als Doktorand im Arbeitskreis Laufer begleitet haben.

Zuletzt möchte ich natürlich meinen Eltern **Barbara** und **Rudolf Wydra** für Ihren Rückhalt und Ihre beständige Unterstützung in dieser Zeit und darüber hinaus danken.

Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit der Synthese, Analyse und Evaluation von neuartigen Molekülen (*small molecules*), welche als Inhibitoren der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) entwickelt wurden. Die drei Isoformen der JNKs (JNK1, JNK2, JNK3) unterscheiden sich untereinander in ihrer Aminosäuresequenz sowie in ihrem dreidimensionalen Aufbau nur marginal, was die Entwicklung von isoform-selektiven Inhibitoren zu einer anspruchsvollen Aufgabe macht.

Um mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen, etwa in ihren Signalwegen, aufzuklären, ist es jedoch erforderlich, sogenannte *high-quality chemical probes* zu entwickeln, die gezielt eine Isoform hemmen. Die Entwicklung solch einer JNK2 spezifischen Sonde in Form eines *small molecules*, war Ziel dieser Arbeit.

Die JNK2 ist wohl der am wenigsten untersuchte Vertreter innerhalb der JNK-Isoformen. Es konnte bereits im Mausmodell gezeigt werden, dass bei einem gezielten *Knockdown* von JNK2, in Kombination mit einem *Knockdown* der *upstream* gelegenen Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase (MAPKK) MKK4, ein positiver synergistischer Effekt auf die Leberregeneration erreicht werden kann. Demgegenüber führte solch eine kombiniertes *Silencing* von JNK1 und MKK4 zu einem Verlust dieses pro-regenerativen Effekts. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer spezifischen JNK2-selektiven *probe*. Eine gleichzeitige Hemmung von JNK3 kann, auch aufgrund der hauptsächlichlichen Lokalisation von JNK3 in Hirn, Herz und Hoden, aber nicht in der Leber, als weniger relevant bei der Untersuchung dieses Phänotyps betrachtet werden.

In einem struktur-basierten Design-Ansatz wurden unterschiedliche Grundstrukturen hinsichtlich ihrer Isoform-Selektivität gegenüber JNK2 iterativ optimiert. Der Fokus lag hierbei auf der chemischen Modifikation von reversiblen Aminopyrazol-basierten Inhibitoren. Als Grundlage diente hierzu eine Vielzahl verfügbarer Proteinkristallstrukturen aller Isoformen, sowie publizierte Struktur-Wirkungsbeziehungen (SARs).

Durch Testungen auf allen Isoformen, konnten hochselektive Leitstrukturen identifiziert werden (> 100-fach selektiver gegenüber JNK1), welche in unterschiedlichem Umfang weiter auf ihre metabolische Stabilität, sowie Aktivität und Isoform-Selektivität in zellulären Systemen, ihre Pharmakokinetik und schlussendlich auf ihre Gesamtselektivität im Kinom hin evaluiert wurden.

Basierend auf diesen klassischen „*ligand-first approach*“ konnte zudem eine Serie kovalenter Inhibitoren entwickelt werden, die letztendlich zu der Entwicklung und Validierung einer potentiellen *high-quality chemical probe* von JNK2/3 führte.

Zusammenfassung (Englisch)

The following thesis focuses on the synthesis, analysis and evaluation of novel molecules (small molecules), which were developed as inhibitors of the c-Jun N-terminal kinases (JNKs). The three JNK isoforms (JNK1, JNK2, JNK3) differ only slightly in their corresponding amino acid sequence or their three-dimensional structure, which makes the development of isoform-selective inhibitors challenging.

However, for the elucidation of the possible differences between the individual isoforms, e.g. in their respective signaling pathways, it is crucial to develop so-called “high-quality chemical probes”, which specifically inhibit only one isoform. The development of such a JNK2-selective small molecule probe was the objective of this work.

The JNK2 is probably the least studied representative within the JNK isoforms. It has already been demonstrated in a mouse model that targeted knockdown of JNK2, in combination with knockdown of the upstream mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) MKK4, has a positive synergistic effect on liver regeneration. In contrast, it was shown that the combined silencing of JNK1 and MKK4 negates this pro-regenerative effect. This emphasizes the need for a specific JNK2-selective probe. Simultaneous inhibition of JNK3 can be considered less relevant in the study of this phenotype, also due to the main localization of JNK3 in the brain, heart and testes, but not in the liver.

In a structure-based design approach, different scaffolds were iteratively optimized with regards to their isoform-selectivity towards JNK2. The focus here was on the chemical modification of reversible aminopyrazole-based inhibitors. This approach was based on a large number of already available protein crystal structures of each respective isoform as well as on published structure-activity relationships (SARs).

Via testing on all isoforms, highly selective lead structures were identified (> 100-times more selective against JNK1), which were further assessed to varying degrees for their metabolic stability, activity and isoform selectivity in cellular systems, pharmacokinetics and ultimately for their overall selectivity in the kinome.

Through this classical “ligand-first approach”, a covalent inhibitor series was subsequently developed, which eventually led to the development and validation of a potential high-quality chemical probe of JNK2/3.

Publikationsliste

(1) **Wydra, V. R.**; Plank, N.; Zwirner, S.; Selig, R.; Rasch, A.; Masberg, B.; Lämmerhofer, M.; Zender, L.; Koch, P.; Albrecht, W.; et al. A “Ligand First” Approach toward Selective, Covalent JNK2/3 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2025**

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5c00884.

(2) Wang, G.; Seidler, N. J.; Röhm, S.; Pan, Y.; Liang, X. J.; Haarer, L.; Berger, B.-T.; Sivashanmugam, S. A.; **Wydra, V. R.**; Forster, M.; et al. Probing the Protein Kinases' Cysteinome by Covalent Fragments. *Angewandte Chemie International Edition* **2025**

DOI: 10.1002/anie.202419736

(3) Ernst, L. N.; Stahlecker, J.; Mier, F.; Serafim, R. A. M.; **Wydra, V. R.**; Masberg, B.; Jaag, S. J.; Knappe, C.; Lämmerhofer, M.; Stehle, T.; et al. Design, Synthesis, and Molecular Evaluation of SNAr-Reactive N-(6-Fluoro-3-Nitropyridin-2-yl)Isoquinolin-3-Amines as Covalent USP7 Inhibitors Reveals an Unconventional Binding Mode. *Archiv der Pharmazie* **2025**

DOI: 10.1002/ardp.70053

(4) Ernst, L. N.; Jaag, S. J.; **Wydra, V. R.**; Masberg, B.; Knappe, C.; Gerstenecker, S.; Serafim, R. A. M.; Liang, X. J.; Seidler, N. J.; Lämmerhofer, M.; et al. Screening of Covalent Kinase Inhibitors Yields Hits for Cysteine Protease USP7 / HAUSP. *Drug Design, Development and Therapy* **2025**

DOI: 10.2147/DDDT.S513591.

(5) **Wydra, V. R.**; Ditzinger, R. B.; Seidler, N. J.; Hacker, F. W.; Laufer, S. A. A patent review of MAPK inhibitors (2018 – present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2023**

DOI: 10.1080/13543776.2023.2242584.

(6) Gerstenecker, S.; Haarer, L.; Schröder, M.; Kudolo, M.; Schwalm, M. P.; **Wydra, V.**; Serafim, R. A. M.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Laufer, S.; et al. Discovery of a Potent and Highly Isoform-Selective Inhibitor of the Neglected Ribosomal Protein S6 Kinase Beta 2 (S6K2). *Cancers* **2021**

DOI: 10.3390/cancers13205133.

(7) **Wydra, V.**; Gerstenecker, S.; Schollmeyer, D.; Andreev, S.; Dimitrov, T.; Massarico Serafim, R. A.; Laufer, S.; Gehringer, M. N-(6-Chloro-3-nitropyridin-2-yl)-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isoquinolin-3-amine. *Molbank* **2021**

DOI: 10.3390/M1181.

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivator-Protein-1
AS	Aminosäure
ASK	<i>apoptosis signal-regulating kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BB	<i>Building-Block</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CASK	<i>calcium/ calmodulin dependent serine protein kinase</i>
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	Carbonyldiimidazol
CK2	Casein-Kinase II
CML	chronisch myeloischen Leukämie
CRO	<i>Contact Research Organization</i>
C-Spine	<i>catalytic Spine</i>
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünschichtchromatographie
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E ₁	Eliminationsreaktion 1.ter Ordnung
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDC·HCl	(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid)
ePK	Eukaryotische Proteinkinase
ERK5/ BMK	<i>extracellular signal-regulated kinase/ Big MAPK</i>
EWG	<i>electron-withdrawing group</i>
FAH	Fumarylacetoacetat Hydrolase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
GSH	Glutathion

GTP	Guanosintriphosphat
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	<i>hydrophobic region</i>
IPMS	<i>intact protein mass spectrometry</i>
JIP	<i>JNK interacting protein</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LM	Lösemittel
MAP2	Mikrotubulin-assoziiertes Protein 2
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MLK	<i>mixed lineage kinase</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NLuc	NanoLuciferase
PAIN	<i>pan-assay interference</i>
PBS-Puffer	<i>phosphate-buffered saline</i> -Puffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PJAC	POSH-JIP <i>apoptotic complex</i>
PK	Pharmakokinetik
PKA	Proteinkinase A
POC	<i>Percentage of Control</i>
POSH	<i>plenty of SH3s</i>
KLIFS	<i>Kinase–Ligand Interaction Fingerprints and Structures</i>
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RIOK2	<i>right open reading frame kinase 2</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	<i>RNA-interference</i>
R-Spine	<i>regulatory Spine</i>

RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
SAPK	Stress-aktivierte Protein-Kinasen
SAR	<i>structure-activity relationships</i>
SDS-Page	<i>Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SERP	<i>scientific expert review panel</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
S _N	nucleophile Substitutions-Reaktion
S _{NAr}	nucleophile Substitutions-Reaktion am Aromaten
SWB	Struktur-Wirk-Beziehung
TDI	<i>time-dependent inhibition</i>
TE	<i>target engagement</i>
TEA	Triethylamin
THP	Tetrahydropyranyl
TFA	Trifluoressigsäure
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TIC	<i>total ion count</i>
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i>
TRT	<i>target residence time</i>
WB	Western Blot

Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i>	<i>I</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>III</i>
<i>Zusammenfassung (Englisch)</i>	<i>IV</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VI</i>
1 Einleitung	1
1.1 Struktureller Aufbau der Proteinkinasen	3
1.2 Die c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs)	9
1.3 Der Signalweg der JNKs	14
1.4 Proteinkinaseinhibitoren	16
1.4.1 JNK-Inhibitoren	18
2 Zielsetzung	24
3 Chemischer Teil	27
3.1 Die 4-Aminopyrazol-Grundstruktur	27
3.2 Substitution des HR-I adressierenden Motivs	27
3.2.1 Substitution des HR-I Harnstoff-Motifs	31
3.3 2-Amino-3-cyanothiophene und deren Abkömmlinge	32
3.3.1 Einführung von löslichkeitsvermittelnden Resten	35
3.3.2 Ein Kombinationsansatz	37
3.3.3 Die 2-Aminothiazolgrundstruktur	37
3.4 Substitution des HR-II-/ lösungsmitteladressierenden Motivs	38
3.4.1 Derivatisierung an der westlichen Carboxy-Komponente	39
3.5 Substitution am zentralen Aromaten	40
3.5.1 Einführung von Stickstoffen /Reduktionsansatz	44
3.5.2 Einführen vom Methylgruppen	45
3.5.3 Einführen einer Anilin Funktion am zentralen Aromaten	46
3.5.4 Picolinamid-und Isonicotinamid-Derivate	48
3.5.5 Versuch einer orthogonalen Synthesestrategie	49
3.6 Rigidisierung des 4-Aminopyrazol-Grundgerüsts	50
3.7 Para-Substituierte Derivate	52
3.8 Einführung von bekannten Typ I ½ -Resten	53
3.9 Adressieren von His120 über JNK-IN-8-Derivate	56
3.10 Invertieren der westlichen Amid-Einheit	58
3.10.1 Einführen von kovalenten Warheads	60
4 Biologische Testverfahren	62
4.1 ³³ PanQinase™ – Assay (Reaction Biology)	62
4.2 PhosphoSens – Assay (AssayQuant)	63

4.2.1	TDI-Bestimmung	64
4.2.2	Bestimmung der Enzyminaktivierungseffizienz (k_{inact}/K_i)	64
4.3	KINOMEScan® – KdELECT (Eurofins)	66
4.4	KINOMEScan® – scanEDGE (Eurofins)	68
4.5	Vergleich der drei Potenz-Bestimmenden Plattformen	69
4.6	Metabolische Stabilität in Mauslebermikrosomen (MLM)	70
4.7	Pharmakokinetik Studien	70
4.8	Western Blotting (WB)	71
4.8.1	Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	72
4.9	GSH – Stabilitätsassay	72
4.10	IPMS	74
4.11	NanoBRET – Assay	75
4.11.1	Verdrängungsexperiment NanoBRET basiert	76
4.11.2	Verdrängungsexperimente mit JNK2 bzw. JNK3-Mutante	77
5	Ergebnisse und Diskussion	78
5.1	Biochemische Evaluation	78
5.1.1	Biochemische Testung der Ausgangsverbindungen	78
5.1.2	Derivatisierung des HR-I Motivs	80
5.1.3	N-(3-cyanothiophen-2-yl)amid-Derivate und Abkömmlinge	82
5.1.4	Rigidisierung der Aminopyrazolstruktur	85
5.1.5	Derivatisierung des HR-II Motivs	86
5.1.6	Modifikation an der HR-I-gerichteten Harnstofffunktion sowie Verlängerungen/ Verkürzungen der Grundstrukturen	96
5.1.7	Kombination bekannter SARs aus den bisher beschriebene Studien	98
5.1.8	Invertierung der Amidkomponenten	100
5.1.9	Derivatisierung am Kernaromaten	102
5.1.10	SAR von Inhibitoren vom potentiellen Typ I ½	104
5.1.11	Adressierung von His120 über ionische Wechselwirkungen	106
5.1.12	Biochemische Evaluation von kovalenten Inhibitoren	107
5.2	Biologische Evaluation	114
5.2.1	Metabolismus-Daten	114
5.2.2	NanoBRET-Assay	116
5.2.3	Western Blots (WBs)	118
5.2.4	PK-Studie	125
5.2.5	Experimente zur biologischen Evaluation von kovalenten Inhibitoren	128
5.2.6	Testung der Kinom-Selektivität	135
6	Zusammenfassung der Ergebnisse & Fazit	140
7	Experimenteller Teil	146
7.1	Allgemeine Methoden, Materialien und Chemikalien	146
7.1.1	Reinheitsbestimmung (HPLC)	146
7.1.2	Identitätsbestimmung	147
7.2	WB-Protokoll	148
7.2.1	Eingesetzte Puffer und Medien für die Zellanzucht und WB-Herstellung	150

7.3	Allgemeine Synthesevorschriften (ASV):	152
7.4	Synthesevorschriften (Vorstufen):	156
7.4.1	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.2	156
7.4.2	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.2.1	160
7.4.3	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.3	162
7.4.4	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.4.1	171
7.4.5	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.1	179
7.4.6	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.2	185
7.4.7	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.3	191
7.4.8	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.4	195
7.4.9	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.5	199
7.4.10	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.6	204
7.4.11	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.7	208
7.4.12	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.8	212
7.4.13	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.9	221
7.4.14	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.10	226
7.4.15	Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.10.1	230
7.4.16	Sonstige Vorstufen	237
7.5	Synthesevorschriften (Endstufen):	241
7.5.1	Synthese der in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Testverbindungen	241
7.5.2	Synthese der in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Testverbindungen	252
7.5.3	Synthese der in Kapitel 5.1.4 beschriebenen Testverbindungen	260
7.5.4	Synthese der in Kapitel 5.1.5.1 beschriebenen Testverbindung	261
7.5.5	Synthese der in Kapitel 5.1.5.2 beschriebenen Testverbindungen	265
7.5.6	Synthese der in Kapitel 5.1.5.3 beschriebenen Testverbindungen	290
7.5.7	Synthese der in Kapitel 5.1.6 beschriebenen Testverbindungen	292
7.5.8	Synthese der in Kapitel 5.1.7 beschriebenen Testverbindungen	298
7.5.9	Synthese der in Kapitel 5.1.7.1 beschriebenen Testverbindungen	300
7.5.10	Synthese der in Kapitel 5.1.8 beschriebenen Testverbindungen	306
7.5.11	Synthese der in Kapitel 5.1.9 beschriebene Testverbindungen	310
7.5.12	Synthese der in Kapitel 5.1.10 beschriebenen Testverbindungen	313
7.5.13	Synthese der in Kapitel 5.1.11 beschriebenen Testverbindungen	319
8	Anhang	323
8.1	Liste aller Endverbindungen	323
8.2	Zusammenfassung der SARs der synthetisierten Aminopyrazol-Derivaten	336
8.3	Liste aller durchgeführten Syntheserouten	337
8.4	Pharmakokinetische Rohdaten	347
9	Literaturverzeichnis	353

1 Einleitung

Kinasen sind Enzyme, welche die Übertragung des γ -Phosphats des Kofaktors Adenosintriphosphat (ATP) auf ein Substrat katalysieren und damit eine Phosphoryl-Gruppe übertragen.¹ Die Substrate können hierbei Proteine, Zucker oder Lipide sein, wobei man bei den eukaryotischen Proteinkinasen (ePKs) zwischen Tyrosinkinasen und Serin-/Threoninkinasen unterscheidet.^{2, 3} Ebenfalls vorhandene dual-spezifische Kinasen sind sowohl in der Lage Tyrosin als auch Serin oder Threonin an der jeweiligen Hydroxylgruppe zu phosphorylieren.⁴ Die Rückreaktion wird von den Gegenspielern der Kinasen, den Phosphatasen katalysiert.⁵ Selten wird von ePKs auch Guanosintriphosphat (GTP) als Cofaktor akzeptiert.^{6, 7}

Die enzymatisch katalysierte Phosphorylierungsreaktion wurde erstmals von Burnett & Kennedy et al. anhand der Übertragung auf Casein beobachtet.⁸ Genauere Aufklärung dieses Phosphorylierungs-Mechanismus lieferte Krebs und Fischer et al. mit Ihrer Forschungen zur katalytischen Umwandlung von Glykogen (Glykogenolyse) und den Untersuchungen über die Umwandlung von Phosphorylase b (un-phosphoryliert) zu Phosphorylase a (phosphoryliert).^{9, 10} Sutherland und Wosilait entdeckten parallel dazu das Konzept des Wechselspiels zwischen Kinasen und Phosphatasen anhand von aus Hundeleber isolierten Phosphorylasen und den zugehörigen dephosphorylierenden Enzymen.¹¹ Das Enzym Phosphorylase b bzw. a ist im deutschen mittlerweile als Glycogenphosphorylase bekannt und wird selbst von der Phosphorylase-Kinase phosphoryliert und von der Proteinphosphatase-1 wieder dephosphoryliert.^{9, 12, 13}

Die Gesamtheit der Kinase-kodierenden Gene machen einen beträchtlichen Teil des menschlichen Genoms aus (ca. 2 %) und wird allgemein hin als menschliches „Kinom“ bezeichnet.¹⁴ Dies entspricht einer Enzymsuperfamilie mit ca. 500 Vertretern.¹ Aufgrund ihrer Phylogenese sowie der Homologie ihrer Aminosäuresequenz in der katalytischen Domäne können die über das Kinom kodierten Kinasen in 7-8 Kinase-Gruppen, sowie in 7-8 atypischen Kinase-Gruppen eingeteilt werden.¹⁴⁻¹⁶ Die atypischen Kinasen zeichnen sich dadurch aus, zwar Kinaseaktivität zu besitzen, aber nicht dem kanonischen Aufbau innerhalb der Kinase-Bindedomäne zu folgen.¹⁴ Für ca. 10 % der hierdurch kodierten Kinasen wird wiederum prognostiziert, dass aufgrund des Verlustes mindestens einer konservierten Aminosäure (AS) im katalytischen Zentrum, diese Vertreter keine Kinaseaktivität besitzen, obwohl sie den Aufbau einer typischen Kinase-Domäne aufzeigen. Diese Proteine werden als Pseudokinasen bezeichnet und besitzen soweit bekannt anderweitige regulatorische Funktionen.¹⁷

Einleitung

Kinasen gelten als zentrale Regulatoren der Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen.¹⁸ Durch die Phosphorylierung ihrer Zielsubstrate, die dadurch Veränderungen in ihrer Konformation, Interaktionsverhalten und Aktivität erfahren können, führen sie teilweise kaskadenartig zum Ablauf komplexer intrazellulärer Prozesse. Sie sind so Bestandteil praktisch aller essentiellen Stoffwechselprozesse, wie Genexpression, Zellteilung, Apoptose, Metabolismus, Muskelkontraktion und vielen Weiteren.^{18, 19} Entsprechend ist es direkt ersichtlich, dass eine Proteingruppe, welche ein derartiges Spektrum an essentiellen Zellfunktionen durch eine Vielzahl an spezialisierten Vertretern aktiviert, bei Fehlregulation schwerwiegende Folgen nach sich ziehen kann.

Eines der wohl prominentesten Beispiele für eine pathologische Fehlregulation von Kinasen ist im Krankheitsbild der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zu finden. Bei dieser Krankheit wird das „Philadelphia Chromosom“ in den meisten Patienten gefunden.²⁰ Diese kleine, nicht native Variante von Chromosom 22 entsteht durch eine genetische Translokation zwischen den Chromosomen 22 und 9.²¹ Hierdurch wird das auf Chromosom 9 befindliche Protoonkogen der Tyrosinkinase *ABL1* in die *breakpoint cluster region (BCR)* translokiert wodurch das *BCR-ABL* Fusions-Gen entsteht, welches für die Proteinbiosynthese der hyperaktiven, nicht natürliche Tyrosinkinase *BRC-ABL* verantwortlich ist.²² Diese führt unweigerlich zum Krankheitsbild der CML.²³ Die Entdeckung dieser Fehlregulation der *ABL1*-Kinase führte zur Entwicklung des ersten kommerziell erfolgreichen (Tyrosin-) Kinaseinhibitors Imatinib (Gleevec, Novartis) und läutete den Siegeszug der Kinaseinhibitor-Entwicklung ein, welcher bis heute anhält.^{1, 16, 24, 25}

1.1 Struktureller Aufbau der Proteinkinasen

Die aus ca. 300 Aminosäuren und 12 Subdomänen bestehende Kinasedomäne ist in ihren katalytischen Motiven hochkonserviert.^{15, 26} Sie gliedert sich in zwei Teilbereiche, einen hauptsächlich aus β -Faltblättern bestehenden kleineren *N-Lobe*, welcher über eine kleine Scharnierregion (*Hinge*) verbrückt ist zu einer wiederum aus hauptsächlich α -Helices bestehenden, größeren *C-Lobe*.^{27, 28} Die Kluft zwischen der *N-* und *C-Lobe* bildet zusammen mit der *Hingeregion* die orthosterische ATP-Bindetasche aus in die ATP bindet, wobei die Adenosin-Base über zwei ausgebildete Wasserstoffbrücken zum Aminosäurerückgrat der *Hingeregion* verankert wird.²⁹ Bei der kanonische Struktur-Einteilung in klassischen ePKs, insbesondere bei der Bezifferung der Sekundärstrukturen (α -Helices/ β -Faltblätter), wird sich grundsätzlich auf die ursprüngliche Bezifferung der Proteinkinase A (PKA) bezogen, deren Kristallstruktur als erste Proteinkinase-Kristallstruktur aufgeklärt wurde.^{1, 27, 28} In Folge von Unterschieden in der Primärstruktur, sowie der unterschiedlichen Qualität der Kristallstrukturdaten sind jedoch nicht immer alle Strukturelemente in jeder aufgenommenen Kinasedomäne gleich aufgelöst. Um eine Vergleichbarkeit zu anderen Kinasedomänen zu gewährleisten wird im Folgenden für die dargestellten Sekundärstrukturen die ursprüngliche Zählweise und Einteilung wie in der PKA-Kristallstruktur verwendet.

N-Lobe:

Innerhalb des kleineren *N-Lobes* mit seinen fünf strukturgebenden β -Faltblättern befindet sich der sogenannte *P-Loop* (Abb. 1A; hell-orange) zwischen dem β 1- und β 2-Faltblatt. Dieser stark flexible Abschnitt wird aufgrund der vielen beinhaltenden Glycinen auch als *glycin-rich-Loop* bezeichnet und besitzt das Motiv GXGXXG.¹ Im *N-Lobe* liegt die α C-Helix welche im Wechselspiel mit anderen Motiven diverse regulatorische und unterstützende Funktion bei der Katalyse übernimmt.^{1, 30, 31} Zusammen mit dem Phenylalanin des DFG-Motivs und einem auf dem β 4 befindlichen Leucin formt sie die sogenannte *regulatory Spine* (R-Spine), bestehend aus insgesamt vier Aminosäuren.³² Auf dem β 3-Faltblatt befindet sich das konservierte AXK-Motiv, wobei dem katalytischen Lysin eine wichtige Funktion bei dem Transfer der Phosphorylgruppe auf das Substratprotein zukommt.³¹

C-Lobe:

Die deutlich größere *C-Lobe* besteht hauptsächlich aus α -Helices und kleineren β -Faltblatt-Abschnitten ($\beta 6$ - $\beta 9$ wobei lediglich $\beta 7$ & $\beta 8$ in der gewählten Struktur für JNK2 aufgelöst sind, siehe Abb. 1A).¹⁶ Die meist ungeordnete, *loop*-reiche Region innerhalb des *C-Lobes* die unmittelbar auf die αE -Helix folgt, enthält die restlichen, für die Transferreaktion wichtigen, katalytischen Motive. Dazu gehören der katalytische *Loop* (Abb. 1A; magenta) mit dem darin beinhaltenen Y/HRD-Motiv (Abb. 1A; rot) sowie das Aktivierungssegment (Abb. 1A; blau), welches mit dem DFG-Motiv (Abb. 1A; dunkelblau) beginnt und, je nach Definition, mit dem APE-Motiv oder mit Beginn der F-Helix (Abb. 1A; orange) endet.³¹⁻³³ Der hauptsächlich α -helikale Strukturabschnitt nach der αF -Helix (u.a. die GHI-Subdomäne) ist zwischen den einzelnen ePKs konserviert, kann jedoch auch *Inserts* wie den MAPK-*Insert* enthalten.^{31, 34-36}

Aktivierungssegment:

Das Aktivierungssegment, welches in Abb. 1B separat dargestellt ist, lässt sich in mehrere Untermotive unterteilen. Es umfasst das darin enthaltene DFG-Motiv (Abb. 1B; rot), den Aktivierungs- (A-) *Loop* (Abb. 1B; blau), den P+1-*Loop* (Abb. 1B; magenta) und die daran anschließende kleinen helikalen Struktur welche meist als EF-Helix (Abb. 1B; lila-pink) bezeichnet wird und das APE-Motiv (Abb. 1B; hell-blau) enthält.^{31, 33} Auf dem A-*Loop* befinden sich im Falle der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) jeweils zwei phosphorylierbare Aminosäuren (für JNK2 Thr183 und Tyr185), welche von den jeweiligen *upstream* gelegenen MAPKs phosphoryliert werden können (primäre Phosphorylierungsstellen), wodurch die MAPKs wiederum aktiviert werden.^{35, 37, 38} Das zunächst ungeordnete Aktivierungs-Segment nimmt infolge der Phosphorylierung und der daraus resultierenden Wechselwirkungen der Phosphatgruppen eine konservierte, stärker geordnete Konformation an.^{31, 33} Sobald es zu einer Phosphorylierung des A-Loops kommt, kann durch die beschriebene Konformationsänderung die Substratbinderegion zugänglicher werden.^{39, 40} Allgemein befindet sich die Substratbinderegion innerhalb des Aktivierungssegments gegenüberliegen zur *Hinge*-Region zwischen der D- und der G-Helix.^{28, 41} Dies ist schlüssig, da das zu phosphorylierende Substrat in räumlicher Nähe zum Kosubstrat ATP positioniert sein muss. Die Binderegion wird unter anderem von Teilen des A-Loops, des P+1-Loops und der APE-Region ausgebildet.¹⁶ Der P+1-*Loop* wird so bezeichnet, da er das Substrat an der Aminosäure bindet, welche direkt nach der zu phosphorylierenden Aminosäure folgt.³¹

Regulatorische Motive und „Spines“

Die Kinasen können sowohl in einem aktiven als auch in einem inaktiven Zustand vorliegen und entsprechend zwei Konformationen ausbilden.^{39, 42} Neben der Phosphorylierung der primären Phosphorylierungsstellen ist eines der Hauptstrukturmerkmale, durch welches man eine aktive von einer inaktiven Kinase unterscheidet, die Positionierung des DFG-Motivs. Man unterscheidet zwischen einer DFG-in (aktiver Zustand) und DFG-out Konformation (inaktiver Zustand).⁴³ Zu erkennen ist die jeweilige Konformation an der Positionierung des enthaltenen Phenylalanins (DFG-in = Phe zeigt Richtung bzw. unter die α -C-Helix), sowie des Aspartats, welche sich jeweils im kanonischen DFG-out-Zustand um 180° im Vergleich zum DFG-in-Zustand drehen, wodurch keine katalytische Reaktion mehr möglich und die R-*Spine* nicht aufgebaut ist.^{31, 44, 45} DFG-out Konformationen sind nur bei inaktiven Kinasen zu finden, da dort das DFG-Motiv die ATP-Bindung blockiert (DFG-out = Phe zeigt in die ATP-Bindetasche).⁴⁴⁻⁴⁶ Eine DFG-in Konformation alleine führt jedoch nicht automatisch zu einer katalytisch aktiven Kinase.³¹ In Abb. 1A-C ist eine DFG-in Konformation dargestellt.

Neben der DFG-in/out Konformation wird auch zwischen einer αC_{in} / αC_{out} -Konformation unterschieden. Es kommt bei aktiven Kinasen zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen dem Lysin des AXK-Motives und einer auf der α C-Helix befindlichen, konservierten Glutaminsäure.¹⁹ Hierdurch kommt es zu einer Annäherung und korrekten Positionierung der α C-Helix zur ATP-Bindetasche.^{27, 31} Diese Konformation wird auch als αC_{in} definiert. Die inaktive Konformation ohne die hier besprochene Salzbrücke wird als αC_{out} abgekürzt.¹

Ein weiteres Charakteristikum einer aktiven bzw. inaktiven Kinase ist die Ausbildung hydrophober „*Spines*“ (siehe Abb. 1C). Das hierzu etablierte „*Spine*“-Modell beinhaltet für aktive Kinasedomänen sowohl die Ausbildung einer „*regulatory Spine*“ (R-*Spine*) (Abb. 1C; orange) als auch eine „*catalytic Spine*“ (C-*Spine*) (Abb. 1C; grün).^{32, 47} Die beiden *Spines* bilden sich aus hydrophoben Aminosäuren übereinanderliegender Sekundärstrukturen. So bildet sich die R-*Spine* bei der JNK2 von unten nach oben aus dem His149 des HRD-Motivs, dem Phe170 des DFG-Motivs, dem Leu77 auf der C-Helix sowie dem Leu88 auf dem β 4-Strang. Die C-*Spine* wird aus hydrophoben Aminosäure gebildet, welche auf der α F-Helix, der α D-Helix und dem β 7- und β 2-Faltblatt liegen und die Adeninbase inkorporieren. ATP wird also ebenfalls benötigt, um die C-*Spine* aufzubauen.⁴⁷ Diese beiden „Rückgrate“ einer aktiven Kinasedomäne bauen sich auf der α F-Helix auf, welche zum einen hydrophobe Reste zur C-*Spine* beisteuert aber auch über ein Aspartat Wechselwirkungen zum His149 der R-*Spine* aufbaut.⁴⁷ Die α F-Helix bildet bildlich gesprochen das Fundament der darauf errichteten *Spine*-Säulen aus.

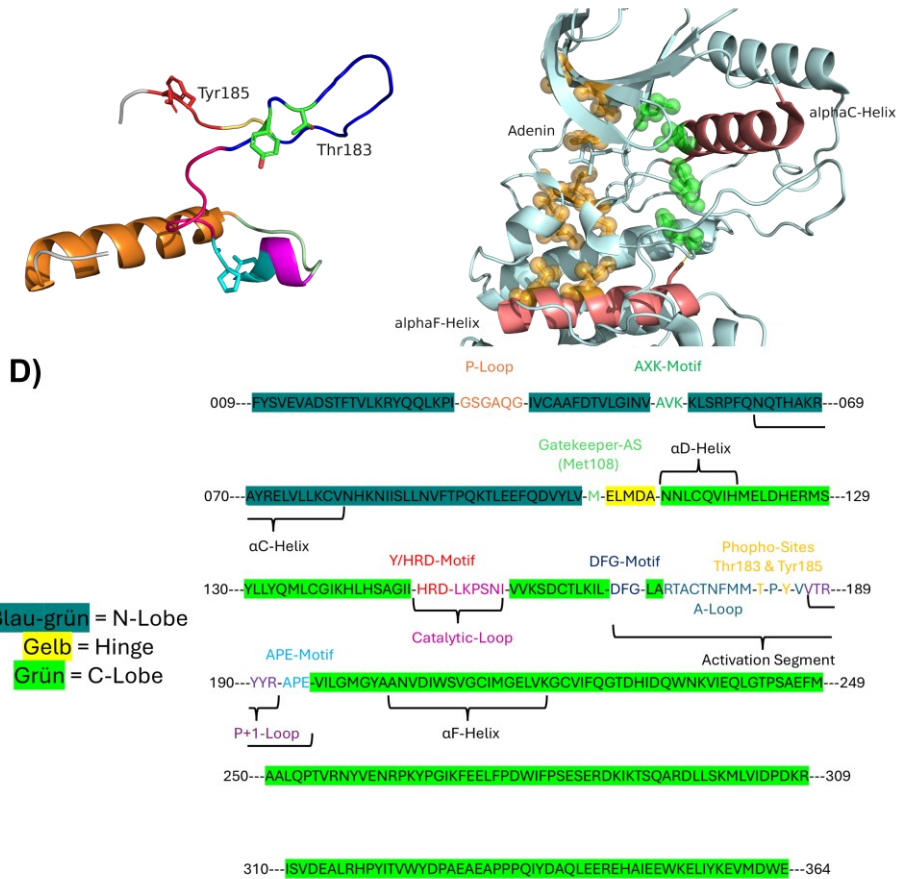
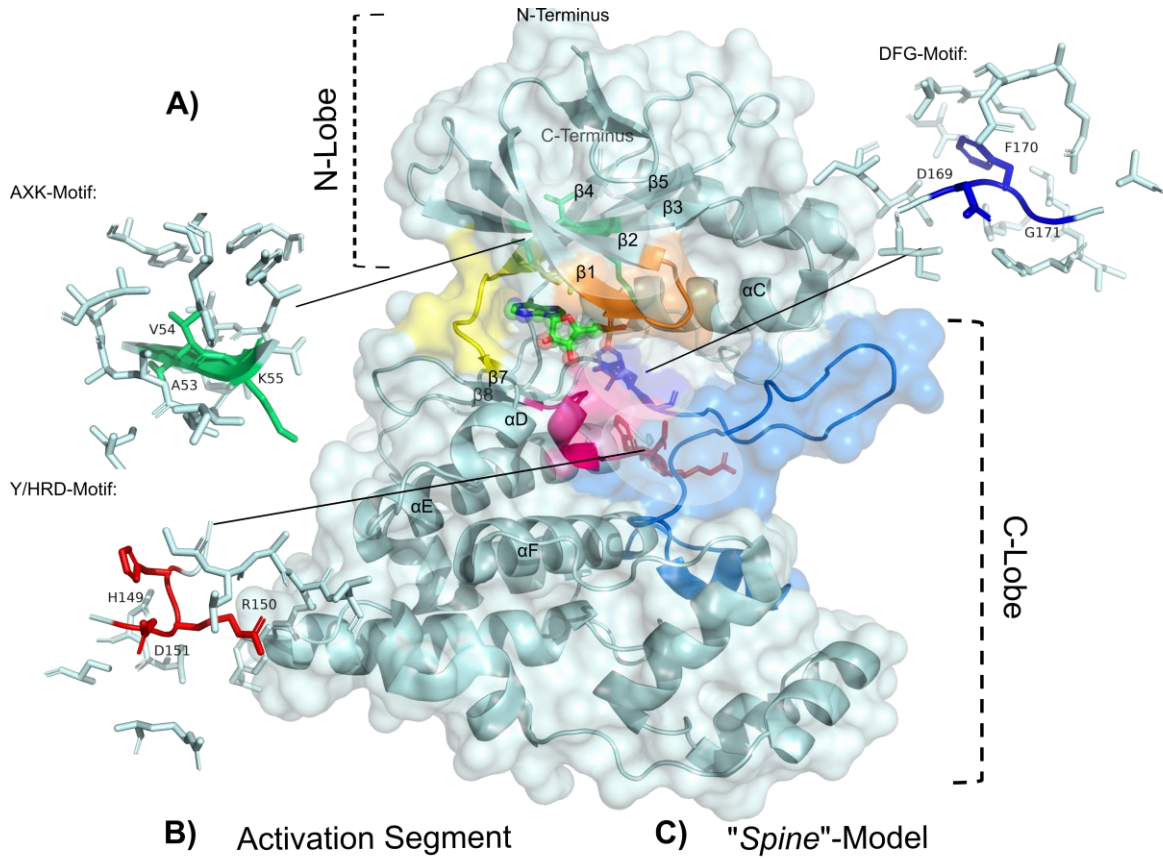


Abbildung 1: **A)** Allgemeiner, struktureller Aufbau der Kinase-Domäne am Beispiel von JNK2 mit AMP kokristallisiert in DFG-in-Konformation (PDB = 7N8T). Abbildung nachempfunden nach Röhms et al. und Fabbro et al.^{16, 48} Farbkodierung: grün = AXK-Motiv; orange = P-Loop; gelb = Hinge; blau = DFG-motiv und restlicher Teil des Aktivierungssegments; rot-magenta = katalytischer Loop mit Y/HRD-Motiv. **B)** Separate Darstellung des Aktivierungssegments von JNK2 (PDB = 7N8T). Farbkodierung: rot = DFG-Motiv; blau = A-Loop; grün = primäre Phosphorylierungsstellen bei JNK2 Thr183 & Tyr185; pink = P+1-Loop; hell-blau = APE-Motiv; violett = α EF-Helix ohne APE-Motiv; grau-grün = Loop zwischen α EF- und α F-Helix; orange = α F-Helix. Darstellung nachempfunden nach Nolen et al.³³ **C)** „Spine“-Model nach Kornev et al.^{32, 47} Farbkodierung: grün = R-Spine; orange = C-Spine; lachsfarben = α C- & α F-Helix. **D)** Aminosäuresequenz von humaner JNK2 mit Einteilung der einzelnen AS-Abschnitte in zentrale Motive (AS-Sequenz entnommen aus: PDB = 7N8T).

Katalytische Motive:

Obwohl allen hier behandelten Motive eine Funktion zukommt, sei es auch nur unterstützend wie im Falle des P-Loops, welcher bei der Positionierung von γ -Phosphat von ATP beteiligt ist, sind für die eigentliche katalytische Aktivität nach einer zusammenfassenden Arbeit von Fabbro et al., hauptsächlich drei Motive von zentraler Bedeutung welche in Abbildung 1A spezifisch dargestellt sind: Das AXK-Motiv, das Y/HRD-Motiv und das DFG-Motiv.^{16, 39} Der durch die katalytischen Motive vermittelte Mechanismus der enzymatischen Phosphorylierung ist in Abb.2 näher erläutert.

Das AXK-Motiv (Abb.1A; grün) enthält ein katalytisches Lysin (Lys55; JNK2) welches in aktiver Kinasekonformation mit einer auf der α C-Helix gelegenen Glutaminsäure (Glu53; JNK2) eine Salzbrücke ausbildet.¹⁹ Von dem Glutamat in Position gehalten, kann das Lysin nun die α - und β -Phosphate von ATP koordinieren.^{42, 49} Weiterhin konserviert bei ePKs ist das Y/HRD-Motiv (Abb. 1A, rot) im katalytischen Loop. Das darin enthaltene Aspartat ist für die katalytische Übertragung der Phosphorylgruppe auf das Zielsubstrat entscheidend. Asp151 (im Falle von JNK2) agiert hierbei wahrscheinlich als Protonenakzeptor für das Hydroxidproton der zu phosphorylierenden Aminosäure und positioniert die Substrat Hydroxylgruppe für den nucleophilen Angriff auf das γ -Phosphat (siehe auch Abb. 2).^{39, 50} Das auf dem Y/HRD-Motiv befindliche Tyrosin/ Histidin interagiert beim Aufbau der R-Spine (Abb. 1C) mit dem DFG-Motiv (Abb. 1A; blau).³² Das im DFG-Motiv enthaltene Aspartat (Asp169; JNK2, siehe Abb.2) wiederum bindet über ionischen Wechselwirkungen zwei Magnesiumionen, welche wiederum die β - und γ -sowie die α - und γ - Phosphatgruppen von ATP koordinieren (siehe Abb.2).¹⁹

Die Hinge-Region und der Aufbau der ATP-Bindetasche:

Traxler et al. beschrieb ein mittlerweile allgemeingültiges Pharmakophormodell, welches anhand der Bindung von ATP in aktiven Kinasen, die für orthosterische Kinaseinhibitoren adressierbare Binderegionen innerhalb der ATP-Bindetasche beschreibt.⁵¹ Entsprechend wurde die Adenin-Binderegion, in der Adenin mit der *Hingeregion* über zwei Wasserstoffbrücken interagiert, die Zuckertasche, die Phosphatbinderegion sowie die *hydrophobic region I* (HR-I) und *hydrophobic region II* (HR-II) definiert, wobei die HR-I Region von der *gatekeeper* Aminosäure (bei JNK2 Met108) versperrt wird.⁵¹ Es ist jedoch durchaus möglich mit Kinaseinhibitoren die *gatekeeper* Aminosäure von ihrer Position zu verdrängen und die HR-I zu besetzen.⁵² Zu beachten ist auch der in Abb. 2 dargestellte, in der HR-I befindliche, Aminosäure-Unterschied zwischen JNK1 und JNK2/3. Die Auswirkungen dieses Austauschs auf die Adressierbarkeit der einzelnen Isoformen mittels JNK-Inhibitoren wird in Kapitel 1.4.1. noch weiter erörtert werden.

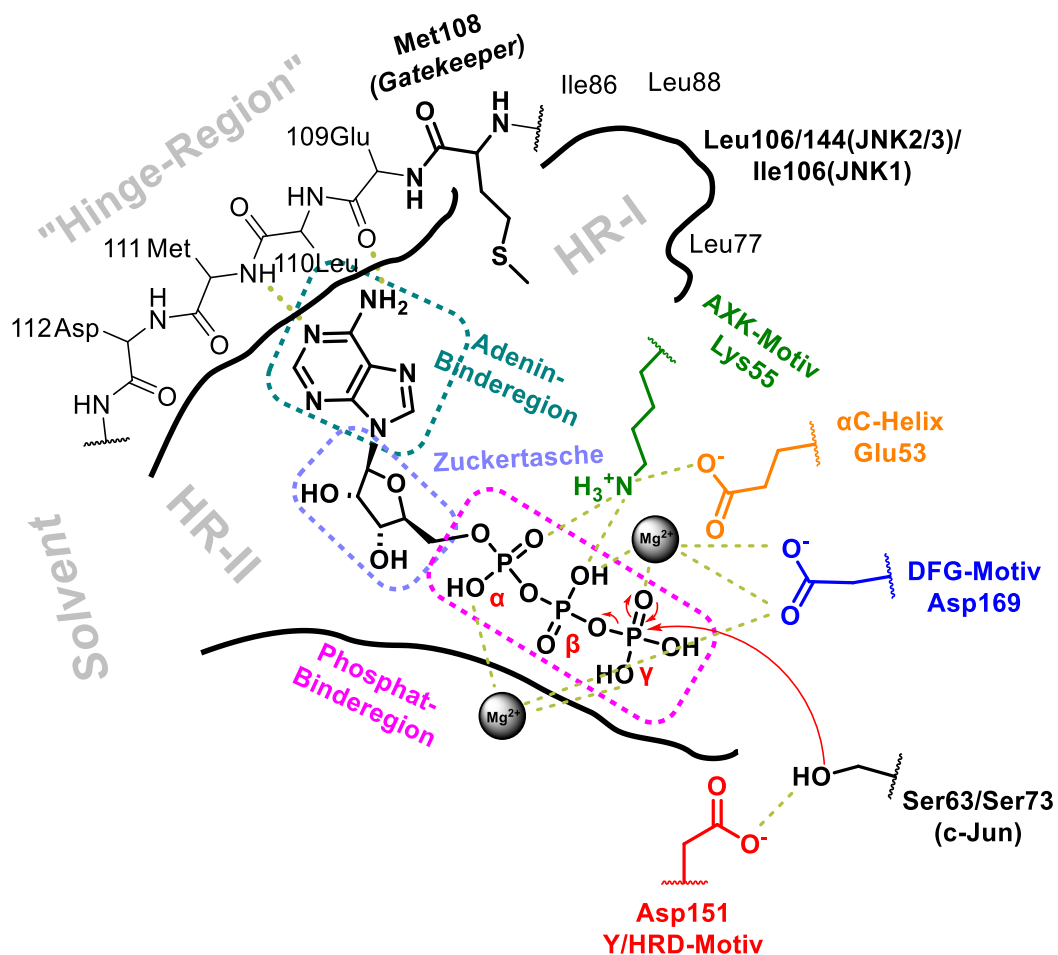


Abbildung 2: Schematische Darstellung der JNK2 ATP-Bindetasche (PDB = 7N8T) mit Einteilung der Binderegionen, sowie schematischer Phosphorylierungs-Mechanismus des c-Jun Substrats. Die Einteilung der Binderegionen erfolgte nach Traxler et al.⁵¹ Der schematisch dargestellte Transfer der Phosphorylgruppe wurde nach einer Abbildung von Adams et al erstellt.¹⁹

1.2 Die c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs)

Auch wenn sich die Bezeichnung „c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs)“ für die hier beschriebene Enzyme mittlerweile etabliert hat, so wurden zum Zeitpunkt ihrer parallelen Entdeckung durch mehrere Arbeitsgruppen diverse Namen dieser Proteine in Umlauf gebracht. Die JNKs, bzw. ein Anteil der Isoform-Vertreter, wurden schon 1990 von Kyriakis et al. aus Rattenlebern isoliert und als Serin/Threonin-Proteinkinasen beschrieben.⁵³ Sie wurden ursprünglich nach dem damals untersuchten Substrat benannt und noch als pp54 Mikrotubulin-assoziiertes Protein-2 (MAP-2) -Kinasen bezeichnet. In diesen frühen Studien zeigte sich nach der Injektion von Cycloheximid, einem fungiziden Antibiotikum und Translationshemmer, in das Peritoneum von Ratten eine deutliche Aktivierung einer Kinase mit einer Masse von etwa 54 kDa.^{53, 54} Diese so bezeichnete Cycloheximid-aktivierte pp54 MAP-2-Proteinkinase konnte sowohl durch die Behandlung mit Tyrosin-Phosphatase als auch durch Serin/Threonin-Phosphatase deaktiviert werden und benötigt somit eine entsprechende Bis-Phosphorylierung für Ihrer Aktivität.⁵⁵ Dies ließ den Rückschluss zu, dass *upstream* die MAP2-Kinase wiederum von einer dual-spezifischen Kinase phosphoryliert werden könnte, welche per Definition in der Lage sind sowohl Tyrosin, als auch Serin und Threonin zu phosphorylieren.^{4, 55} Wenig später (1993) wurde durch das Einbringen von transformierenden Onkogenen sowie durch UV-Induktion, die Aktivierung von zwei Proteinkinase beschrieben, welche jeweils eine Masse von 46 kDa und 55 kDa aufwiesen und in der Lage waren, c-Jun innerhalb der Aktivierungsdomäne doppelt an den Aminosäuren Ser73 und Ser63 zu phosphorylieren. Hibi et al. bezeichnete diese Kinasen nun als erster als c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs) und beschrieb sie weiter als entfernte Verwandte der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen.^{56, 57} Da das 46 kDa schwere Protein eine höhere Bindung zu c-Jun aufwies, wurde diesem Enzym initial der Name JNK1 zugewiesen.⁵⁷ Mittlerweile ist jedoch bestätigt, dass JNK1 sowie JNK2 und JNK3 jeweils als p46 und p54-Isoform existieren, was durch alternatives Spleißen am C-Terminus der Enzyme zustande kommt (siehe Tabelle 1).⁵⁸ Da die JNKs (zell-)stressaktiviert sind bspw. induziert durch Zytokine wie TNF- α , Hitzeschock, UV-Strahlung oder Proteinsyntheseinhibitoren wie Cycloheximid, wurden parallel zur Bezeichnung von Hibi et al., die JNKs von Kyriakis et al. auch als Stress-aktivierte Protein-Kinasen (SAPKs) bezeichnet.⁵⁹ Zu den SAPKs, welche als Unterkategorie der MAPKs anzusehen sind, werden neben den JNKs auch die p38-Isoformen sowie die *extracellular signal-regulated kinase 5* (ERK 5; auch *Big MAPK* (BMK)) gezählt.⁵⁴

Die JNKs werden von den drei Genen *JNK1*, *JNK2* und *JNK3* codiert.⁵⁸ Entsprechend bestehen sie aus drei in allen Wirbeltieren konservierten Isoformen, welche sich durch alternatives Spleißen in 10-11 Spleißvarianten (nach Definition ebenfalls Isoformen)

Einleitung

unterscheiden lassen. Hierbei besitzt das *JNK1*- und *JNK2*-Gen jeweils vier mögliche Spleißprodukte und das *JNK3*-Gen zwei bzw. drei.³⁷ Meist wird die N-terminal verlängerte Varianten von JNK3 nicht beachtet, wodurch nur zwischen den beiden Isoformen JNK3α1 und JNK3α2 unterschieden wird.⁵⁸ Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich einerseits dadurch, ob die korrespondierenden *messenger ribonucleic acid*- (mRNA-) Moleküle Exon 6a oder 6b inkorporiert haben und andererseits darin, ob durch alternatives Spleißen der C- oder N-Terminus des resultierenden Proteins verlängert ist.³⁷ Wohingegen die JNK1 und JNK2 Isoformen ubiquitär im Organismus exprimiert werden, wird JNK3 ausschließlich im Gehirn, und zu geringen Mengen in Herz und Hoden exprimiert.⁶⁰

Der *Knockout* einzelner Isoformen für sich führt zu lebensfähigen, normal entwickelten Maus-Embryonen, ebenso wie der kombinierte *Knockout* von *Jnk2* und *Jnk3* bzw. *Jnk1* und *Jnk3*. Ein gleichzeitiger *Knockout* von *Jnk1* und *Jnk2* führt jedoch reproduzierbar zu letalen Hinterhirn-Anecephalien (Neuralrohrdefekten) bei den Föten.⁶⁰ *Knockout*-Krankheitsmodelle in Mäusen lassen auch den eventuellen Nutzen von isoform-selektiver Inhibition zur Therapie von Krankheiten im Menschen erkennen. Dies wurde von Graczyk et al. tabellarisch zusammengefasst.⁶¹ Entsprechend wird der Hemmung der JNK3-Isoform ein positiver Effekt hauptsächlich bei neurodegenerative Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington zugeschrieben, aber auch bei Schlaganfall oder Rückenmarksverletzungen.⁶¹⁻⁶⁵

Die JNK1-Isoform wird eher mit fibrotischen Krankheiten assoziiert. Entsprechend wurde ein JNK1-selektiver *small-molecule*-Inhibitor in klinischen Studien bereits zur Behandlung von idiopathischer pulmonaler Fibrose (CC-90001; NCT03142191) eingesetzt.⁶⁶ Gleichwohl konnten im Mausmodell auch gezeigt werden, dass *Jnk1*^{-/-} Mäuse sowohl weniger Hauptsymptome der rheumatoiden Arthritis zeigen, als auch weniger Steatohepatitis ausbilden als der Wildtyp im entsprechenden Modell.^{67, 68}

Die Hemmung von JNK2 wird bei Lebererkrankungen bzw. Leberschädigung meist als vorteilhaft erachtet.^{69, 70} Ein sehr schlüssiger Zusammenhang hierzu wurde von Wüstefeld et al. beobachtet. Die Erkenntnisse aus dieser Publikation hierzu standen zu Beginn dieser Arbeit als Ausgangspunkt und sollen im Weiteren nun genauer ausgeführt werden.⁷¹

In einem *in vivo* RNA-*interference*-(RNAi-) Screening identifizierte Wüstefeld et al. die MKK4, eine *upstream* der JNKs liegende MAPKK, als zentralen Ansatzpunkt für die Therapie chronischer Leberschädigung, beispielsweise bei Patienten mit alkoholbedingter oder nicht-alkoholischer Fettleber.⁷¹ Hierbei wurden FAH^{-/-}-Mäuse, welche in Ihrer Leber einen *Knockout* für das Enzym Fumarylacetoacetat Hydrolase (FAH) besitzen, genutzt.⁷² Dieses Enzym ist essentiell für den Aminosäureabbau bzw. Metabolismus von Tyrosin und Phenylalanin. Ein Fehlen dieses Enzyms bewirkt einer Akkumulation von 4-

Fumarylacetoacetat in der Leber. Dieses Abbauprodukt ist lebertoxisch und eine Akkumulation führt zu Leberversagen. Allerdings können die Mäuse durch Zufütterung des Medikaments Nitisinon, einem Inhibitor der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, am Leben gehalten werden. Dieses Medikament verhindert die Bildung von Fumarylacetoacetat, indem es den Tyr-/ Phe-Metabolismus *upstream* der FAH hemmt.⁷³

Über hydrodynamische Injektion werden nun Vektoren in die Leber der Mäuse eingebracht, die Sequenz-Abschnitte besitzen die für FAH, als auch für sogenannte *small hairpin* RNAs (shRNAs) kodieren. Diese werden über das *Sleeping Beauty* Transposon System in das Genom der Leberzellen integriert.^{74, 75} Wird nun Nitisinon abgesetzt kommt es zum Absterben von FAH^{-/-}-Zellen und zur Repopulation der Leber mit Zellen welche FAH als auch shRNAs exprimieren. Diese exprimierten shRNAs werden nun von Zellen selbst prozessiert und in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut, welcher eine komplementäre mRNA erkennt und diese abbaut.⁷⁶ Hierdurch kommt es zu einem *Knockdown* des Zielgens bzw. zu einer verringerten Biosynthese des korrespondierenden Proteins. Je nachdem, ob die Reduktion des Zielproteins von Vorteil, von Nachteil oder indifferent für die Leberzell-Repopulation ist, setzen sich nun Leberzellen je nach eingebrachter shRNA bei der Repopulation unterschiedlich gut durch.⁷¹

In einer *follow-up*-Studie hierauf, wurden Mäuse mit bereits wiederhergestellten Lebern mit CCl₄ behandelt um erneut eine Leberschädigung hervorzurufen. Auch dieses nachgeschaltete Model führt, orthogonal zur ersten Studie, bei der Repopulation zu einem erneuten Selektionsdruck auf die Hepatozyten.⁷¹

Über *polymerase chain reaction* (PCR) können die RNA-Moleküle quantifiziert, und damit ihre positiven oder negativen Effekte auf die Leberregeneration, nach initialer Repopulation oder nach CCl₄-Behandlung evaluiert werden. Nach der Identifizierung von MKK4 als zentraler Regulator, wurde dieses System auf eine duale Expression von shRNA(MKK4) sowie shRNA(JNK2) bzw. shRNA(JNK1) übertragen. Hierbei zeigten sich folgende Effekte:

- Dualer MKK4-JNK1-*Knockdown* eliminiert den progenerative Effekt, der bei alleiniger MKK4-Hemmung beobachtet wird.⁷¹
- Dualer MKK4-JNK2-*Knockdown* verstärkt den progenerativen Effekt der MKK4-Hemmung zusätzlich.⁷¹

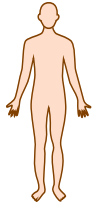
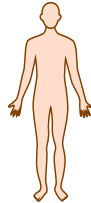

Bei dem Vergleich zwischen dem *Knockdown* sowie *Knockout* der einzelnen Isoformen in Maus-Modellen wird auch ein gewisser Phänotyp ersichtlich, welcher auch auf Zell-Ebene beobachtet werden kann. Die einzelnen Isoformen besitzen scheinbar partiell gegensätzliche regulatorische Funktionen und das Ausschalten der jeweiligen Gene kann zu einem gegensätzlichen pathophysiologischen Effekt führen. Beispielsweise führt der

Einleitung

Knockout von *Jnk1* im Kainsäure induzierten Neuronen-Degenerations-Modell zu einer stärkeren Neurodegeneration und der *Knockout* der *Jnk3* zu einer Verringerung im Vergleich zum Wildtyp.⁷⁷ Beispiele für unterschiedliche oder gegenläufige Regulation auf Zellebene von p53, ATF2 und c-Jun durch die JNK1- und JNK2-Isoform sind beschrieben.^{58, 78, 79} Andere Arbeitsgruppen sehen jedoch die regulatorischen Funktionen der einzelnen Isoformen auf Zellebene als nicht, bzw. als weniger signifikant unterschiedlich, oder zumindest nicht gegenläufig an. Der eben beschriebene phänotypische *outcome* in *Knockout*-Tierstudien wird entsprechend auf unterschiedliche Stabilitäten der einzelnen Spleiß-Varianten oder auf unterschiedlich starke Expression (gewebeabhängig) der einzelnen Isoformen zurückgeführt. Teilweise werden die Funktionen der einzelnen Isoformen auch als redundant beschrieben.^{37, 38, 80-82}

Interessanterweise gibt es praktisch keines der um die 100 Substrate der JNKs, welches fest abgrenzbar nur von einer der drei JNK-Isoformen adressiert und phosphoryliert wird.³⁷ Auch wenn Bogoyevitch et al. in einer Übersichtsarbeit bereits mehrere potentiell isoform-selektive Substrate benannte, werden die dort beschriebenen Substrate lediglich von einer der Isoformen stärker adressiert, was auch für das „Hauptsubstrat“ c-Jun bereits beschrieben wurde.^{78, 83} Für die E3 Ubiquitin Ligase ITCH (JNK1-spezifisch) und den RNA-Polymerase 1 spezifischen Transkriptionsfaktor TIF-1A (JNK2-spezifisch) könnte man aufgrund der zu Grunde liegenden Ausgangspublikationen zu der Erkenntnis kommen, dass diese Substrate potentiell isoform-spezifisch sein könnten, allerdings sind hierfür weitere Studien notwendig.⁸⁴⁻⁸⁶ Zusätzlich muss die Problematik von unterschiedlicher Expression der einzelnen Isoformen beachtet werden.³⁸

Tabelle 1: Übersicht über die drei unterschiedlichen JNK-Isoformen.

Gen	<i>JNK1</i>	<i>JNK2</i>	<i>JNK3</i>
Kinasen	JNK1 (Mapk8; SAPK γ)	JNK2 (Mapk9; SAPK α)	JNK3 (Mapk10; SAPK β)
Spleißvarianten / Isoformen³⁷	JNK1 α 1, JNK1 α 2 JNK1 β 1, JNK1 β 2	JNK2 α 1, JNK2 α 2 JNK2 β 1, JNK2 β 2	JNK3 α 1(L), JNK3 α 2(L), JNK3 α 2(S)
p46-Formen (46 kDa)	JNK1 α 1, JNK1 β 1	JNK2 α 1, JNK2 β 1	-
p54-Formen (54-55 kDa) (verlängerter C-Terminus)	JNK1 α 2, JNK1 β 2	JNK2 α 2, JNK2 β 2	JNK3 α 2(S)
Formen mit verlängerten N-Terminus	-	-	JNK3 α 1(L) (48 kDa) + Verlängerter C-Terminus: JNK3 α 2(L) (57 kDa)
Enthält Exon 6a	JNK1 α	JNK2β	JNK3 α
Enthält Exon 6b	JNK1 β	JNK2α	-
Verteilung in Geweben⁶⁰	Ubiquitär 	Ubiquitär 	Hauptsächlich im Gehirn, aber auch in Herz und Hoden 
Knockout in Mäusen⁶⁰	(<i>Jnk1</i> ^{-/-}) lebensfähig (<i>Jnk1</i> ^{-/-} ; <i>Jnk2</i> ^{-/-}) letal	(<i>Jnk2</i> ^{-/-}) lebensfähig	(<i>Jnk3</i> ^{-/-}) lebensfähig
	-	(<i>Jnk2</i> ^{-/-} ; <i>Jnk3</i> ^{-/-}) lebensfähig	-
	(<i>Jnk1</i> ^{-/-} ; ..)	-	.. <i>Jnk3</i> ^{-/-}) lebensfähig
Positiver outcome bei <i>Knockout</i> -Maus-Modellen sowie Anzeichen auf therapeutischen Nutzen ⁶¹	<i>Jnk1</i> ^{-/-} : Multiple Sklerose; Arthritis; Rückenmarksverletzung; Diabetes; Leberfibrose; Steatohepatitis Leberkrebs;	<i>Jnk2</i> ^{-/-} : Leberschädigung; Papillome	<i>Jnk3</i> ^{-/-} : Neurodegenerative Erkrankungen allg.; Parkinson; Schlaganfall; Rückenmarkverletzung; Alzheimer; Chorea Huntington
Substrate	(ITCH) ⁸⁴	(TIF-1A) ⁸⁵	-

Nicht selektive Substrate: $\approx 100^{37}$

Nucleare Substrate und Transkriptionsfaktoren : c-Jun; JunB; JunD; ATF2; JDP2; Elk1,3,4; Smad2/3/4; p53; NFAT1/2//4; Myc; Stat1/3...

Mitochondriale Substrate: Bad; Bax; Bcl2; Bim; Mcl1; SMAC (Diablo); Noxa (PMAIP1)...

Cytosolische und sonst. Substrate: Kinasen (Akt1; DLK;...), Phosphatasen (DUSP8; PPM1J;...), Ubiquitin-Ligasen (ITCH; Rad18), Proteine des Cytoskeletts (DCX; Tau;...), etc.

1.3 Der Signalweg der JNKs

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) gehören zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) und sind damit Bestandteil der MAPK-Signalkaskade.⁵⁴ Extrazellulärer Stimuli führen zunächst über die entsprechenden Rezeptoren zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-kinase-kinasen (MAPKKK), welche die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-kinasen phosphorylieren (MAPKK). Diese wiederum phosphorylieren und aktivieren die nachgeschalteten MAPKs, zu denen auch die JNKs zählen (siehe Abb. 3).⁸⁷ Die MAPKs haben diverse Substrate, wobei die JNKs nicht nur sehr viele Substrate besitzen, sondern auch sehr unterschiedliche. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die einzelnen Isoformen in sehr vielen Kompartimenten anzutreffen sind und auch partiell nach Aktivierung zum Effektort wie bspw. in den Zellkern abwandern.³⁷ Die Hauptgruppe der Substrate bilden die Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, ATF2, p53 und Elk1. Phosphoryliertes c-Jun bildet als heterodimer mit phosphoryliertem c-Fos einen Aktivator-Protein-1- (AP-1-) Komplex aus, welcher als eigentlicher Transkriptionsfaktor zu einer vermehrten Transkription von Gene führt.⁸⁸ Die *upstream* gelegenen Kinasen der JNK-Signalkaskade sowie die einzelnen JNKs können zusammen mit diversen Gerüstproteinen wie den JNK *interacting proteins* (JIP-1/3) und weiteren *multi-domain* Proteinen wie dem *plenty of SH3s*-Protein (POSH) assoziieren und einen Funktionskomplex bilden.⁸⁹⁻⁹²

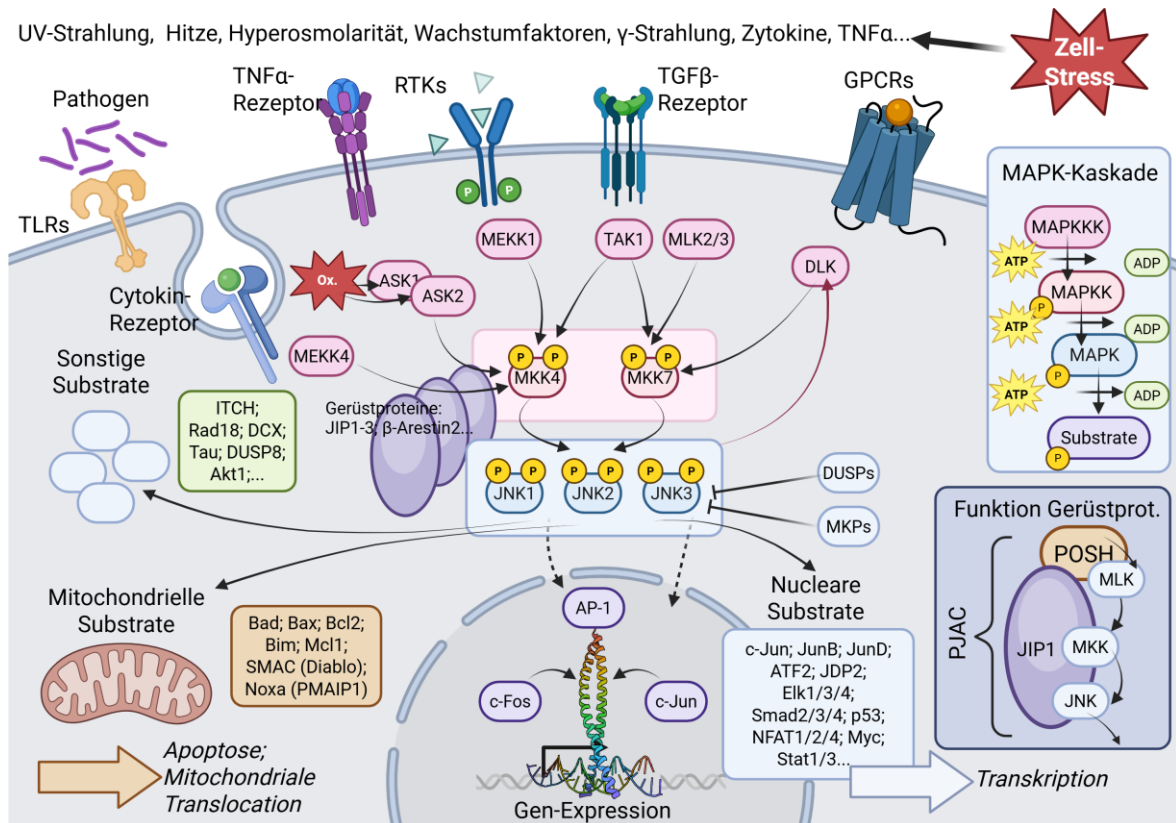


Abbildung 3: Vereinfachte Veranschaulichung der Signalwege der JNKs, mit schematischer Darstellung der MAPK-Kaskade und Aufbau des POSH-JIP *apoptotic complexes* (PJAC), eines Proteinkomplexes aus Gerüstprotein und assoziierten Proteinen der JNK/ MAPK-Kaskade. Die Sub-Darstellung der MAPK-Kaskade ist abgeleitet von Abbildung 1 von Davis et al.³⁸ Die Sub-Darstellung des PJAC ist abgeleitet von Abbildung 6 von Kukekov et al.⁸⁹ Darstellung des JNK-Signalwegs abgeleitet von Abbildung 1 von Zeke et al.³⁷ Diese Bild wurde mittels <https://BioRender.com> erstellt.

Ein Beispiel für solch einen Assoziationskomplex mit entsprechender Protein-Protein-Interaktionen ist der POSH-JIP *apoptotic complex* (PJAC) (siehe Abb. 3). Hierbei bindet POSH einen Vertreter der *mixed lineage kinase* (MLK; MAPKKK) und tritt in Kontakt mit JIP-1 welches wiederum Interaktionen zu die MKKs (MAPKK) und JNKs (MAPK) ausbildet. Auf diese Weise kommen alle Komponente der Signalkaskade in räumliche Nähe, wodurch eine sukzessive Aktivierung/ Phosphorylierung ermöglicht wird.^{89, 90}

Die zahlreichen, meist zellstress-assoziierten extrazellulären Signale werden über eine Vielzahl an Signalwegen und Rezeptortypen (siehe Abb. 3) an die JNKs als einen der Endpunkte dieser Wege weitergeleitet. Zu den aktivierenden Rezeptoren zählen z.B. Hormon aktivierte G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), Rezeptor Tyrosinkinase (RTK), *tumor necrosis factor α*- (TNF α -) und *transforming growth factor β*- (TGF β -) Rezeptoren, Cytokin-Rezeptoren, Pathogene erkennende *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und für die Embryonalentwicklung wichtige Wnt-Rezeptoren (nicht abgebildet).^{37, 93-98} Diese Rezeptor-Signale und im Fall der *apoptosis signal-regulating kinases* (ASKs) auch intrazellulärer oxidativer Stress führen zu einer Aktivierung der unterschiedlichen MAPKKKS wie TAK1, den MLKs, DLK, und den MEKKs.^{38, 99, 100} Diese bewirken dann eine duale Phosphorylierung von MKK4/7 welche wiederum die JNKs phosphorylieren.^{38, 101, 102}

1.4 Proteinkinaseinhibitoren

Bis Ende 2024 wurden insgesamt 84 niedermolekulare Kinaseinhibitoren von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen.¹ Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit (Oktober 2025) wurden, soweit dem Autor bekannt, bereits 8 weitere Kinaseinhibitoren von der FDA als Arzneimittel zugelassen.¹⁰³ Diese kontinuierliche Erweiterung unterstreicht die weiterhin hohe therapeutische Relevanz von Proteinkinaseinhibitoren im Rahmen neuartiger, zielgerichteter Therapieansätze.

Grundsätzlich lassen sich Kinaseinhibitoren anhand mehrerer Kriterien klassifizieren:

- Anhang ihrer Bindeposition (allosterische vs orthosterisch).
- Anhand ihres Bindemodus (reversible vs kovalent-irreversible vs kovalent-reversible).
- Anhand ihrer Bindungspräferenz für die aktive oder inaktive Kinase-Konformation.
- Welche Teile der Bindetasche sie besetzen.

Entsprechend unterscheidet man bei reversiblen Inhibitoren kanonisch zwischen Inhibitoren vom Typ I-V, wobei kovalent-bindende Inhibitoren meist als Typ VI-Kinaseinhibitoren bezeichnet werden.¹

Typ I: Proteinkinaseinhibitoren vom Typ I binden innerhalb der orthosterischen ATP-Bindetasche von Kinasen in deren aktiver Konformation und damit in der DFG-in-Konformation.¹⁰⁴ Praktisch als ATP-Mimetika wirkend, konkurrieren sie entsprechend mit dem Kofaktor ATP, welches in einer Konzentration im unteren millimolaren Bereich in den Zellen (je nach Zelltyp variierend) vorliegt.¹⁰⁵

Typ II: Inhibitoren vom Typ II sind ebenfalls ATP-kompetitiv, besetzen jedoch die orthosterische Binderegion von Kinasen in inaktiver Konformation, entsprechend in einer DFG-out-Konformation und stabilisieren diese. Dazu bilden sie Interaktionen mit der nur in inaktiven Kinasen erreichbaren hydrophoben *Deep-pocket* aus.^{43, 106}

Typ I ½: Einen speziellen Subtyp stellen die ATP-kompetitiven Inhibitoren vom Typ I ½ dar. Diese binden orthosterisch an Kinasen wie Inhibitoren vom Typ I, interagieren aber zusätzlich mit der *R-Spine* bzw. interkalieren in diese. Hierdurch wird die *R-Spine* verzerrt und eine inaktive DFG-in-Konformation wird ausgebildet und stabilisiert.⁵²

Typ III: Allosterisch-bindende Inhibitoren, welche allerdings in unmittelbarer Nähe der ATP-Bindetasche an Kinasen binden, werden als Proteinkinaseinhibitoren vom Typ III beschrieben.¹⁰⁷

Typ IV: Inhibitoren vom Typ IV binden allosterisch, außerhalb der ATP-Bindetasche und sind per Definition wie alle allosterischen Inhibitor-Arten nicht ATP-kompetitiv.¹⁰⁷

Typ V: In den letzten Jahren wurden auch immer mehr Inhibitoren vom Typ V beschrieben, welche bivalente Kinaseinhibitoren darstellen und damit zwei unterschiedliche Binderegionen der Kinase gleichzeitig besetzen.¹⁰⁸

Oft wird auch eine genauere Aufschlüsselung der eben gegebenen Einteilung beschrieben, in der Inhibitoren vom Typ I $\frac{1}{2}$ sowie Typ II in die Subtypen A und B unterteilt werden (Typ I $\frac{1}{2}$ A/B; bzw.: Typ II A/B). Inhibitoren vom Subtyp A sind durch eine höhere *target residence time* (TRT) und damit eine längere Verweildauer am Zielenzym charakterisiert, was durch die Besetzung der sogenannte *back cleft* bedingt ist. Die Einteilung der ATP-Bindetasche in *front cleft*, *gate area* und *back cleft* stellt ein ergänzendes Strukturmodell nach Roskoski Jr. et al. dar. Die *back cleft* besteht hierbei aus den mittig stehenden Abschnitt der α C-Helix, den β 4- & β 5-Faltblättern, Teilen der tiefer liegenden α E-Helix sowie den drei Aminosäuren zwischen HRD-Motiv und α E-Helix. Inhibitoren vom Subtyp B binden nur in dieser *front cleft*.^{1, 109, 110}

1.4.1 JNK-Inhibitoren

Trotz der hohen Konservierung der ATP-Binderegion innerhalb der Kinasendomäne von ePKs mit kanonischem Aufbau, finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele für orthosterische, niedermolekulare Kinaseinhibitoren, die trotz des ähnlichen Aufbaus der Bindetasche, eine ausgeprägte Selektivität zeigen.¹¹¹⁻¹¹⁴ Diese kann sich auf bestimmte Kinase-Unterfamilien oder sogar nur auf einzelne Isoformen innerhalb des bekannten Kinoms richten.^{111, 115} Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei JNK-Isoformen, welche ausschließlich für die Ausbildung der ATP-Bindetasche verantwortlich sind, zeigt sich, dass sich die einzelnen Isoformen innerhalb der ATP-Bindetasche in nur drei Aminosäuren unterscheiden (siehe Abb. 4B).¹¹⁶

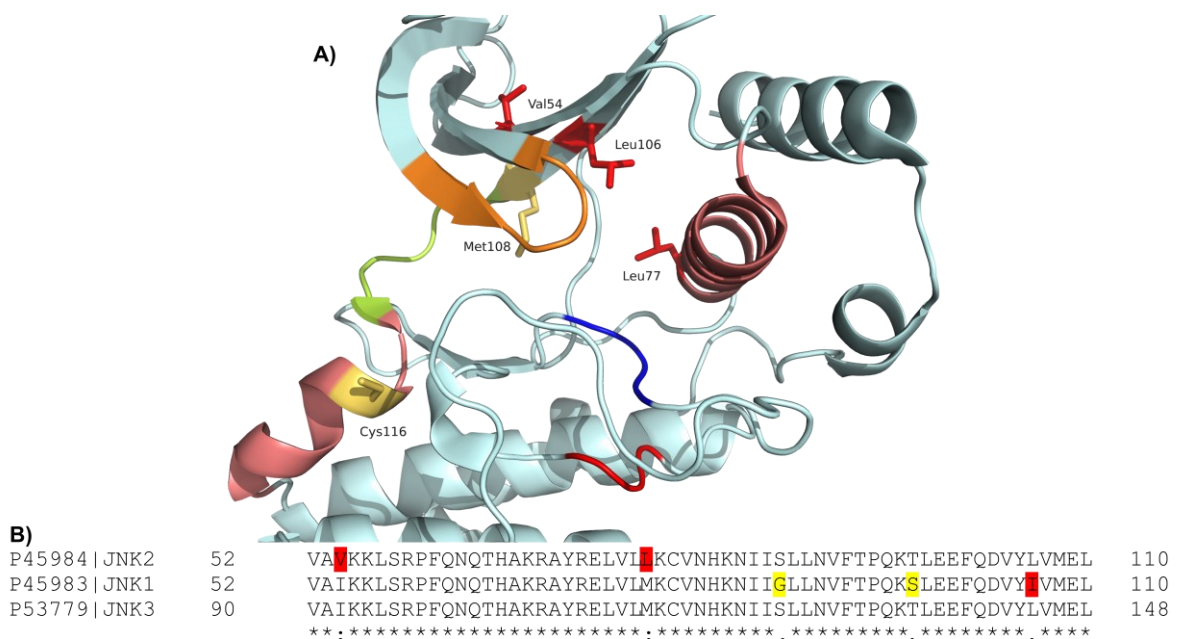


Abbildung 4: **A)** Strukturelle Darstellung der AS-Unterschiede zwischen den einzelnen JNK-Isoformen innerhalb der ATP-Bindetasche (PDB = 8ELC). Farbkodierung: rot = unterschiedliche AS im Vergleich zu JNK1 & 3 sowie das HRD-Motiv; lachsfarben = α C-Helix (rechts) und α D-Helix (links); limetten-grün = AS welche die *Hinge* ausbilden; blau = DFG-Motiv; orange = *P-Loop*; gelb = *Gatekeeper*-AS Met108(JNK2) und kovalent adressierbares Cys116(JNK2) als hauptsächlich in JNKs konserviertes Cys in prominenter α D+2-Position.^{117, 118} **B)** Vergleich der AS-Sequenzen zwischen den einzelnen JNK-Isoformen JNK1-3. Erstellt mit UniProt.¹¹⁹ Farbkodierung: rot = unterschiedliche AS welche am Aufbau der ATP-Bindetasche beteiligt sind; gelb = unterschiedliche AS welche nicht am Aufbau der ATP-Bindetasche beteiligt sind. Das Gesamtschema ist abgeleitet von Abbildung 1 einer bereits publiziert Arbeit (Wydra et al.).¹¹⁶

Der Aminosäure-Unterschied zwischen den Isoformen, welcher nachweislich für die Selektivität von Aminopyrazol-basierten JNK-Inhibitoren gegenüber JNK1 verantwortlich ist, besteht im Austausch von Ile106 (JNK1) zu Leu106 (JNK2) bzw. Leu144 (JNK3). Park et al. konnte mittels Mutagenese-Experimenten sowie einer Reihe von Kristallstrukturen die entscheidende Bedeutung dieses Unterschieds für die Ausbildung der JNK1-Selektivität aufzeigen.¹²⁰

Hierbei wurden IC₅₀-Werte von unterschiedlichen JNK2/3-selektiven Inhibitoren an einer hergestellten JNK3L144I-Mutante biochemisch untersucht. Inhibitoren, welche auf der Wildtyp JNK3wt-Kinase 2-3-stellig nanomolare Aktivitätswerte zeigte, verschlechterten sich dadurch auf 4-5-stellige nanomolare IC₅₀-Werte. Diese Werte entsprachen weitgehend den Aktivitäten gegenüber JNK1, welche im Wildtyp bereits ein Ile an dieser Position besitzt. Darüber hinaus konnte Park et al. diese unterschiedlich-selektiven JNK-Inhibitoren mit JNK3 kokristallisieren. Durch das Übereinanderlegen der einzelnen Strukturen in Kombination mit Docking-Studien der selektiven Verbindung **SR-12326** in JNK3L144I konnte gezeigt werden, dass die Van-Der-Waals-Abstände zu L144 bei isoform-selektiveren Inhibitoren kleiner sind, als bei den weniger selektiven Derivaten. Eine Docking-Simulation von **SR-12326** in einer JNK3L144I-Mutante ergab außerdem, dass die Van-Der-Waals-Abstände zwischen den entsprechenden Bezugsatomen zwischen Ile144 und **SR-12326** durch den Leu zu Ile-Austausch zunehmen. Aus diesen orthogonalen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die isoform-selektiven Inhibitoren weniger gut mit Ile106 in JNK1 interagieren können, oder mit dieser sogar kollidieren, was wohl die Selektivität gegenüber JNK1 bedingt.¹²⁰

Die beiden weiteren Aminosäure-Unterschiede, welche zwischen JNK2 und den beiden anderen Isoformen auftreten, sind weniger gut untersucht. Lu et al. postulierte, dass der Val54 (JNK2) zu Ile54 (JNK1) bzw. Ile92 (JNK3)-Austausch vermutlich ausgenutzt werden kann, um JNK2-Selektivität zu erreichen. Diese Hypothese beruht auf der Lage und Orientierung von Val54, welches sich auf dem β 3-Faltblatt befindet und dessen Aminosäurerest aus der ATP-Bindetasche raus orientiert ist. Ein bindender Inhibitor kann folglich nicht direkt mit dessen Aminosäureseitenkette wechselwirken, sondern nur mit dem Rückgrat von Val bzw. Ile was den jeweiligen Rest nach oben weg drückt. Aufgrund seiner geringeren Größe könnte Valin von einem bindenden Inhibitor stärker verdrängt werden als der voluminösere Isoleucinrest in JNK1 und JNK3. Entsprechend steht an dieser Stelle der HR-I bei der JNK2 potentiell mehr Raum zur Verfügung.¹²¹ Es benötigt jedoch weitere Experimente, welche diese Hypothese bestätigen.

Zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit sind dem Autor keine weiterführenden Untersuchungen zu dem Leu77 (JNK2) zu Met77 (JNK1) bzw. Met115 (JNK3)-Austausch

Einleitung

und dessen Adressierung mit potentiell isoform-selektiven JNK2-Inhibitoren bekannt. Aufgrund der Position dieses Austausches, welcher sich in der Mitte der α C-Helix befindet, ist zu erwarten, dass man nur mit Inhibitoren welche in die *back cleft* binden, dieses Leu adressieren können wird. Demnach dürften ausschließlich Kinaseinhibitoren vom Typ II-A und Typ I $\frac{1}{2}$ -A in der Lage sein diesen Unterschied auszunutzen.¹

Eine letzte Besonderheit innerhalb ATP-Binderegion der JNKs ist das zugängliche und von unterschiedlichen Inhibitoren bereits kovalente adressierte Cys116 (JNK1; JNK2) bzw. Cys154 (JNK3), welches sich direkt vor der HR-II auf der α D-Helix+2-Position befindet.^{115, 118, 121} Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass nur die JNK-Isoformen ein Cystein an exakt dieser Position besitzen.¹¹⁷ Neue Publikationen als auch ein Abgleich mit der *Kinase-Ligand Interaction Fingerprints and Structures-* (KLIFS-) Datenbank zeigten, dass sowohl die *right open reading frame kinase 2* (RIOK2) als auch die *calcium/ calmodulin dependent serine protein kinase* (CASK) an dieser Position ein Cystein aufweisen.^{122, 123}

Im Folgenden ist eine Auswahl an unterschiedlichen JNK-Inhibitoren dargestellt (siehe Abb. 5), deren Aktivitäts- sowie Selektivitätswerte in Tabelle 2 aufgezeigt sind. Diese geben einen Überblick über das Spektrum an bereits untersuchten Ansätzen für die JNK-Inhibition.

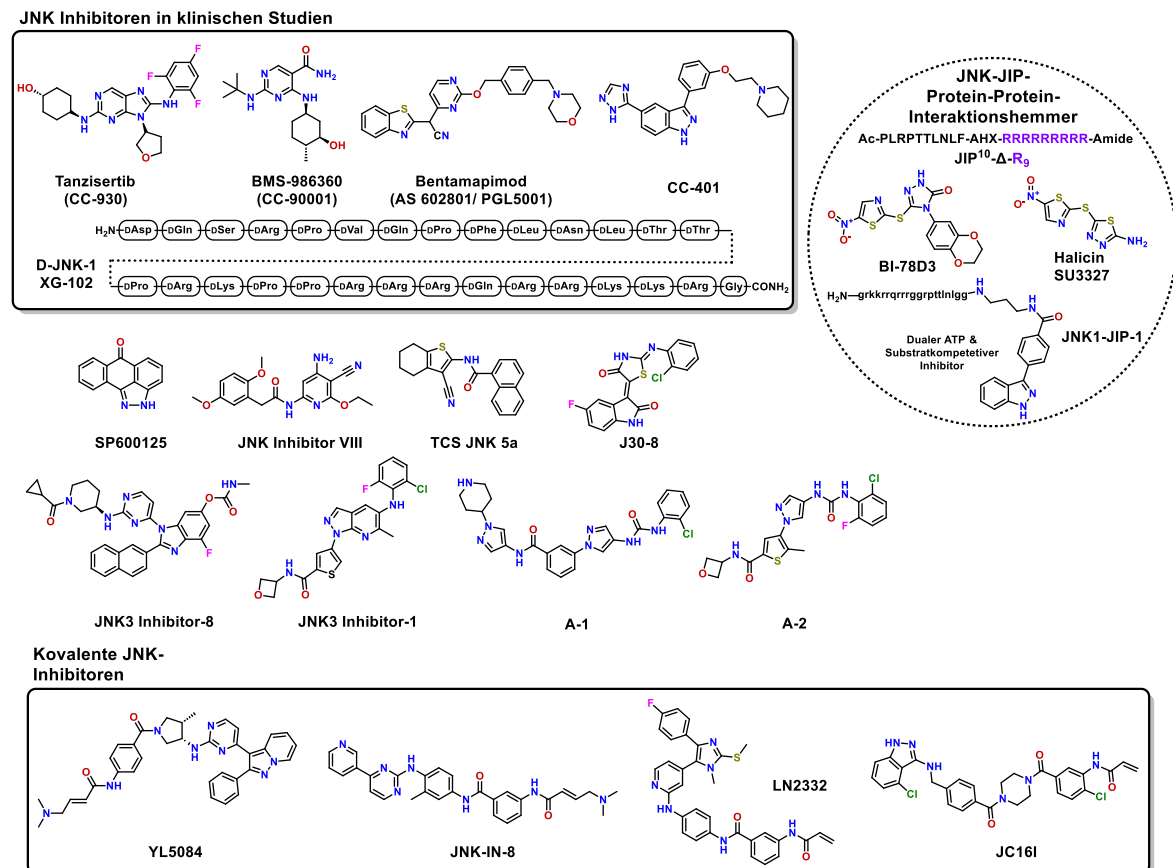


Abbildung 5: Zusammenstellung verschiedener, unterschiedlich isoform-selektiver JNK-Inhibitoren mit unterschiedlicher Grundstruktur, Bindemodus und Mechanismus der Hemmung, sowie Aufführung der fünf bereits in klinischen Studien untersuchten JNK-Inhibitoren.

Wie in Abb. 5 dargestellt, wurden bereits fünf JNK-Inhibitoren in klinischen Studien untersucht. **Tanzisertib** (CC-930), welches auf zelluläre Ebene eine leichte Tendenz zur JNK2-Isoform aufzeigt, wurde bereits zweifach in klinischen Phase-II-Studien zur Behandlung von fibrotischen Lungenkrankheiten (NCT01203943) als auch gegen diskoiden Lupus (NCT01466725) untersucht.^{66, 124} **CC-90001** welches auf zellulärer Ebene eher Richtung JNK1 tendiert, wurde ebenfalls zur Behandlung von fibrotischen Krankheiten der Lunge in klinischen Studien eingesetzt (NCT03142191), allerdings auch zur Behandlung von nicht-alkoholbedingter Fettleber sowie Leberzirrhose (NCT04048876), sowie bei festen Tumoren in fortgeschrittenem Stadium (NCT05625412).⁶⁶ **PGL5001** wiederum wurde in einer Phase-II Studie zur Behandlung von Endometriose untersucht (NCT01630252) und **CC-401** in einer Studie gegen myeloische Leukämie (NCT00126893). Der D-retroinverse, peptidbasierte Inhibitor **XG-102** (D-JNK-1; AM-111) weist laut Patentdaten eine leichte JNK2/3 Selektivität auf.¹²⁵ Der Wirkstoff wurde bereits in drei Phase-III-Studien untersucht zur Behandlung von akutem sensorineuralem Hörverlust (NCT02809118), von Innenohr Hörverlust (NCT02561091) und zur Reduktion von intraokularen Entzündungsreaktionen und postoperativen Schmerzen nach Katarakt-Operationen (NCT02508337).

Einleitung

Tabelle 2: Übersicht über die Hemmwerte der in Abb. 5 dargestellten Verbindungen.

	Bezeichnung	IC ₅₀ JNK1 [nM]	IC ₅₀ JNK2 [nM]	IC ₅₀ JNK3 [nM]	Zelluläre Aktivität [nM]	Selektivität*			
						JNK1/ JNK2	JNK3/ JNK2	JNK1/ JNK3	JNK2/ JNK3
Klinische Kandidaten	Tanzisertib ¹²⁴	61±24	7±2	6±2	IC ₅₀ (p-c-Jun) = 200±60	8,7x	0,9x	10,2x	1,2x
	BMS-986360 ⁶⁶	11±3	31±5	-	IC ₅₀ (p-c-Jun) = 480±50	0,4x	-	-	-
	Bentamapimod ¹²⁶	80	90	230	-	0,9x	2,6x	0,3x	0,4x
	CC-401 ¹²⁶	K _i = 25- 50	K _i = 25- 50	K _i = 25-50	-	-	-	-	-
	XG-102 ¹²⁵	24359± 10020	802± 115	1294± 256	-	30,4x	1,6x	18,8x	0,6x
Reversible Inhibitoren	SP600125 ¹²⁷	40	40	90	IC ₅₀ (p-c-Jun) ≈ 5000- 10000	1,0x	2,3x	0,4x	0,4x
	JNK Inhibitor VIII ¹²⁸	45±3	160±40	-	920±660	0,3x	-	-	-
	TCS JNK 5a ^{129**}	>10000	316	200	-	31,6x	0,6x	50,0x	1,6x
	J30-8 ¹³⁰	>100000 (JNK1α1)	>100000 (JNK2α2)	40±7	-	1,0x	0,0004x	≥2500x	≥2500x
	JNK3 Inhibitor-8 ¹³¹	10000	2203	21	IC ₅₀ (p-c-Jun) ≈ 10000	4,5x	0,01x	476,2x	104,9x
	JNK3 Inhibitor-1 ¹³²	387	74	5	-	5,2x	0,07x	77,4x	14,8x
	A-1 ^{133***}	679	25	23	IC ₅₀ (p-c-Jun) = 1436	27,2x	0,9x	29,5x	1,1x
A-2 ^{134***}	8300	150	67	-	55,3x	0,4x	123,9x	2,2x	
Kovalente Inhibitoren	YL5084 ¹²¹	2173±90	70±1	84±10	EC ₅₀ JNK1 (NanoBRET) = 1500 EC ₅₀ JNK2 (NanoBRET) = 132	31,0x	1,2x	25,9x	0,8x
	JNK-IN-8 ¹¹⁸	4,7	19	1,0	IC ₅₀ (p-c-Jun- HeLa) = 486	0,2x	0,05x	4,7x	19x
	LN2332 ¹³⁵	-	-	0,6	-	-	-	-	-
	JC161 ¹¹⁵	1120±50	856±14	5,3±0,1	IC ₅₀ (p-c-Jun) = 691±26	1,3x	0,006x	211,3x	161,5x
JNK-JIP	JIP¹⁰-Δ-R₉ (JIP-JNK-Hemmung nicht nachgewiesen) ¹³⁶	1100± 130	89±5	1200±70	IC ₅₀ (p-c-Jun) ≤ 5000	12,4x	13,5x	0,9x	0,07x
	BI-78D3 ¹³⁷	280	JIP1-JNK1 = 500 nM	IC ₅₀ (p-c-Jun) = 12400	-	-	-	-	
	Halicin ¹³⁸	700	JNK1-JIP1 = 239 nM	IC ₅₀ (p-c-Jun) = 6230	-	-	-	-	
	JNK1-JIP1 ^{139***,****}	0,7	JNK1-JIP1 = 0,9 nM	-	-	-	-	-	

* Werte gerundet. ** Daten aus pIC₅₀ umgerechnet. *** Eigens vergebener Verbindungsname. **** Dualer, bivalenter JNK-JIP-Interaktion-Hemmer und JNK Inhibitor. Die numerischen Werte wurden aus den entsprechenden Publikationen entnommen. Farbkodierung: Gelb = Selektivität >10x; Hell-Grün = >30x; Dunkel-Grün = >100x.

Abgebildet sind u.a. klassische pan-JNK-inhibitoren wie bspw. **SP600125**, welcher relativ un-selektiv auch eine Reihe an anderen Kinasen signifikant hemmt, als auch die *high-quality* pan-JNK-probe **JNK-IN-8**.^{118, 127} Betrachtet man die Selektivitätswerte der unterschiedlichen Leitstrukturen fällt auf, dass es sowohl reversible, als auch kovalente Vertreter gibt, welche eine hohe Selektivität ausschließlich für JNK3 zeigen.

Beispiele hierfür sind der Inhibitor **J30-8** ($\geq 2500x$ gegenüber JNK1/2), der mittlerweile als *high-quality chemical probe* ausgewählte **JNK3 Inhibitor-8** (476,2x gegen JNK1; 104,9x gegen JNK2) als auch der kürzlich veröffentlichte, kovalente Inhibitor **JC16I** (211,3x gegen JNK1; 161,5x gegen JNK3) mit seiner erstaunlich hohen Enzyminaktivierungseffizienz ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ (JNK3) = $9,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).^{115, 130, 131} Zudem gibt es mehrere Vertreter die eine gewisse JNK2/3-Selektivität aufzeigen, wie **A-1** oder **A-2**, **TCS JNK 5a** oder **YL5084**.^{121, 129, 133, 134} Allerdings konnte bis zur Fertigstellung diese Arbeit nur der peptidbasiert JNK-JIP-Interaktions-Inhibitor **JIP10-Δ-R₉** als alleinig JNK2-selektiver Inhibitor ausgemacht werden, welcher auch nur marginale Selektivitäten gegenüber JNK1/3 zeigt.¹³⁶ Ein ähnliches Bild zeigt sich bei selektiven JNK1 Inhibitoren. Der klinische Kandidat **BMS-986360** weist in zellulären Systemen eine gewisse Selektivität für JNK1 auf, welche jedoch im biochemischen Assay nur gering ausgeprägt ist.⁶⁶ Neben den klassischen, orthosterischen Kinaseinhibitoren sind auch eine Reihe von allosterischen Inhibitoren beschrieben, welche in der *common docking groove* der JNKs binden. Diese in der Nähe der αD-Helix befindliche Binderegion ist reich an Aminosäuren mit sauren Seitenketten und bindet sogenannte D-Motive, welche sich u.a. auf dem JIP-Protein befinden. Entsprechend werden diese Inhibitoren hier als JNK-JIP-Interaktionshemmer beschrieben.^{138, 140, 141} Es sind für diese allosterische Binderegion für die JNKs sowohl *small molecules* (**BI-78D3**, **Halicin**) als auch Peptidomimetika (**JIP¹⁰-Δ-R₉**) und duale, bivalente Inhibitoren bekannt (**JNK1-JIP1**).¹³⁶⁻¹³⁹

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuartiger, JNK2/3-selektiver Inhibitoren. Längerfristig sollte mit diesen Verbindungen der bereits im Mausmodell beobachtete, durch einen dualen JNK2- und MKK4-*Knockdown* hervorgerufenen, synergistisch positiven Effekt auf die Leberregeneration auf der Ebene von niedermolekularen Inhibitoren (*small molecules*) nachvollzogen und damit orthogonal bestätigt werden.⁷¹ Hierzu wird eine *high-quality chemical probe* für JNK2/3 benötigt, welche *in vivo* einsetzbar ist. Wenn möglich, sollte eine reine JNK2 *in vivo probe* entwickelt werden. In Kombination mit selektiven MKK4-Inhibitoren appliziert, könnte so der über *Knockdown*-Experimente erhaltene Phänotyp reproduziert werden. Darüber hinaus ließe sich auf diese Weise auch der isolierte Beitrag einer selektiven JNK2-Inhibition zur Leberregeneration untersuchen.

Die entwickelten Inhibitoren sollten insbesondere eine Selektivität gegenüber JNK1 aufzeigen, da bereits gezeigt werden konnte, dass ein *Knockdown* von JNK1 die positiven Effekte eines MKK4-*Knockdown* auf die Leberregeneration aufhebt.⁷¹ Hierzu sollten verschiedene Grundstrukturen untersucht werden, deren Ausgangsverbindungen idealerweise bereits eine moderate Selektivität zwischen JNK1 und JNK2 aufweisen.

Eine selektive Hemmung der JNK2-Isoform sollte hierbei angestrebt werden. Eine Selektivität gegenüber JNK3 ist für die Bestätigung der Arbeits-Hypothese nicht zwingend erforderlich, da JNK3 physiologisch überwiegen im Gehirn und nur geringfügig auch im Herz und im Hoden exprimiert wird. Dagegen wird JNK2, ebenso wie JNK1 ubiquitär in nahezu allen Zellen und damit auch in der Leber exprimiert.⁶⁰ Eine gegenüber JNK1-selektive Hemmung in Zellen dürfte ausreichend sein, um den Phänotyp der verbesserten Leberregeneration potentiell beobachten zu können. Die biochemisch nachgewiesene, möglichst hohe Selektivität (*probe*-Kriterium **> 30-fach** gegenüber JNK1), sollte anschließend auch in einem zellulären Assay-System bestätigt werden. Es wurde ein NanoBRET-Assay verwendet um sowohl die Aktivität, als auch die Selektivität der Verbindungen in Zellen zu bestimmen.

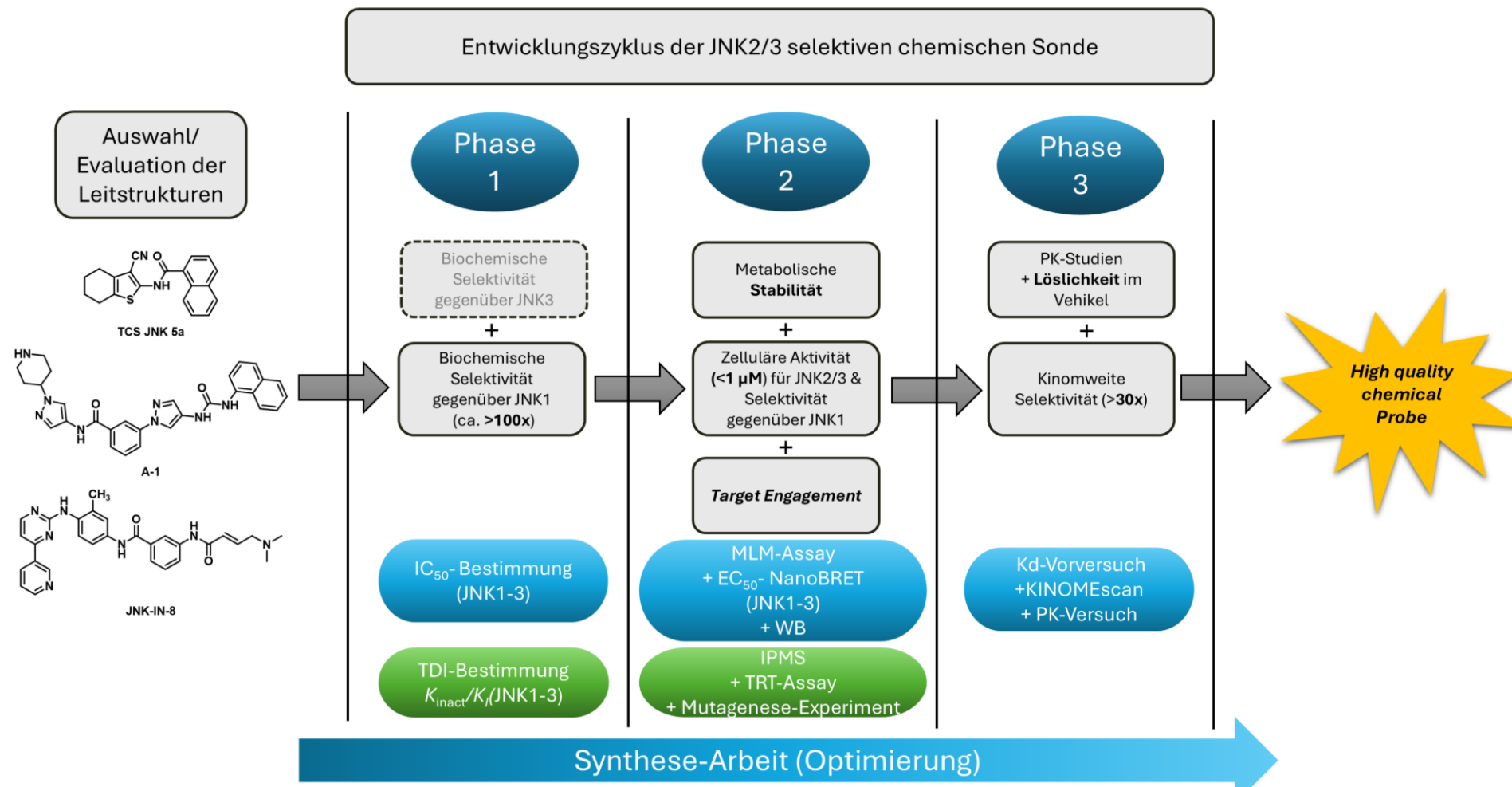
Um die Eignung des *probe*-Kandidaten auch *in vivo* sicher zu stellen, waren weitere Testungen der entwickelten Leitstrukturen erforderlich, insbesondere Studien zur metabolischen Stabilität sowie pharmakokinetische Studien. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine Leitstruktur so weit zu optimieren, dass sie alle Kriterien für eine *high-quality chemical probe* (hochqualitative chemischen Sonden) erfüllt.^{142, 143} Für die ebenfalls evaluierte kovalenten Inhibitoren galten wiederum leicht abweichende Kriterien die erfüllt werden mussten (siehe Tabelle 3), wie beispielsweise die Bestimmung der Enzyminaktivierungsrate k_{inact}/K_i .¹⁴³

Tabelle 3: *High-quality chemical probe* Kriterien.^{142, 143}

Kriterien	Reversible Inhibitoren	Kovalente Inhibitoren
Biochemische Wirksamkeit	<100 nM (IC ₅₀ , K _i , K _d ...)	Bestimmung der Inaktivierungsrate (k_{inact}/K_i)
Zelluläre Wirksamkeit	<1 µM	<1 µM
Zielstrukturvalidierung (<i>Target Engagement</i>)	Bestimmung der Zielstrukturbindung in Zellen Oder: Bestimmung der Zielstrukturstabilisation in Zellen Oder: Biophysikalische Bestimmung über spezifische Biomarker (bspw. Phosphorylierungsstellen)	Bestimmung der Bindungsamino-säure
Selektivität	> 30-fach innerhalb der Proteinfamilie	Proteom-weite Selektivität Oder: > 30-fach innerhalb der Proteinfamilie
Kontrollen (inaktiv)	Kontrollverbindung mit ähnlicher Struktur und gleicher reaktiver Gruppe aber >100-fach schwächerer Bindung	
Chemische Stabilität	Stabilität in Medium	Keine überhöhte/promiskuitive Reaktivität
Zelltoxizität	Toxizität in Zellen erst ab >10-fach zellulärer Potenz (sofern nicht durch Modulation der Zielstruktur erwünscht)	
Verbindungsspezifische Eigenschaften	Vermeiden von PAINs (<i>pan-assay interferences</i>) und promiskuitive Strukturmotive . + Gute Löslichkeit	

Wie im Fließschema in Abbildung 6 dargestellt, lässt sich der Verlauf dieser Arbeit in drei Phasen gliedern. Da die JNKs zu den umfassend untersuchten Kinasen gehören, stand eine große Auswahl potenzieller Startstrukturen zur Verfügung, aus denen zunächst die geeignetste Grundstruktur identifiziert werden musste. Im Anschluss sollten Derivate dieser gewählten Verbindung generiert und in Phase 1 hinsichtlich ihrer biochemische Aktivität (IC₅₀) sowie ihrer Isoform-Selektivität gegenüber den drei JNK-Isoformen untersucht werden. Bei ausreichender Selektivität gegenüber JNK1 sollten in Phase 2 Zellversuche durchgeführt werden, um zu überprüfen ob die Sonden-Kriterien (u.a. Aktivität <1µM; NanoBRET) wie in Abb. 6 dargestellt erfüllt werden. In Phase 3 erfolgte schließlich die Bewertung der *in vivo* Anwendbarkeit der Sonden durch pharmakokinetische Studien sowie die Bestimmung der Selektivität der Leitstrukturen im Kinom.

Zielsetzung

Abbildung 6: In Phasen eingeteilter schematischer Arbeitsablauf für die Entwicklung einer *high-quality chemical probe* für JNK2/3.*

* Versuche die allein für kovalenten Inhibitoren durchgeführt wurde, sind in grün Markiert.

3 Chemischer Teil

3.1 Die 4-Aminopyrazol-Grundstruktur

Als primärer Ausgangspunkt für die hier dargelegte Arbeit wurde der bereits publizierte, auf einer 4-Aminopyrazol-Grundstruktur basierende Inhibitor **A-1** gewählt (siehe Abb. 7). Dieser Aminopyrazol-Abkömmling eignete sich als Ausgangsverbindung, da er bereits über moderate JNK1/JNK2-Selektivität (27-fach) verfügte.¹³³ Mögliche Modifikationsstellen der Ausgangsstruktur lassen sich grob in drei Abschnitte einteilen:

- 1) Die östlichen Motive (HR-I adressierend, blau markiert).
- 2) Die westlichen Motive (HR-II adressierend, rot markiert).
- 3) Der zentrale Kern inklusive des *Hinge*-Bindemotivs (grün markiert).

Über Carbonylfunktionalitäten (Amid-Motiv, gold markiert; Harnstoff-Motiv, violett markiert) werden westliche und östliche Motive mit dem zentralen Kern-Strukturelement verbunden. Diese verknüpfenden Carbonyl-Motive wurden im weiteren Verlauf der Strukturoptimierung ebenfalls substituiert.

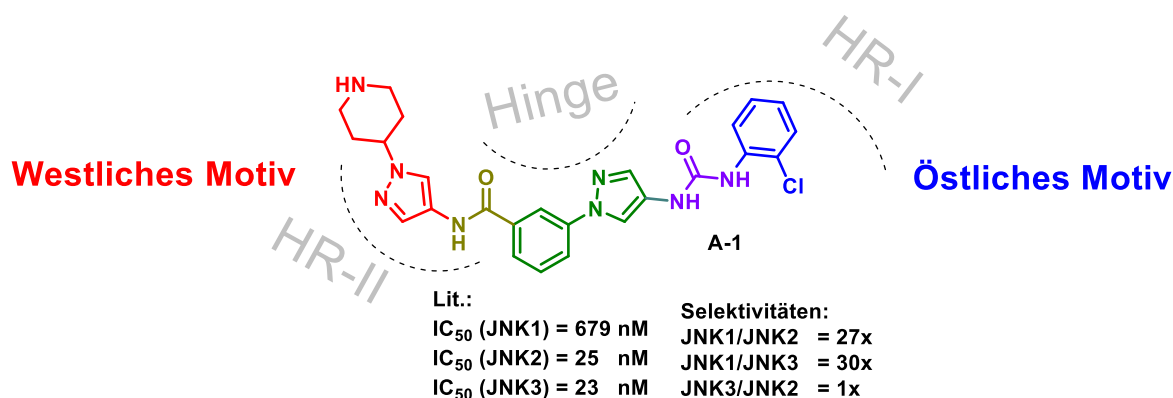


Abbildung 7: Ausgangsverbindung **A-1**. Dargestellte Hemmdaten wurden aus der entsprechenden Literatur übernommen.¹³³ Farbkodierung: rot gefärbt = HR-II Motiv; gold gefärbt = Amid-Linker; grün gefärbt = zentraler aromatischer Kern mit *Hinge*-Motiv; violett gefärbt = Harnstoff-Linker; blau gefärbt = HR-I Motiv.

3.2 Substitution des HR-I adressierenden Motivs

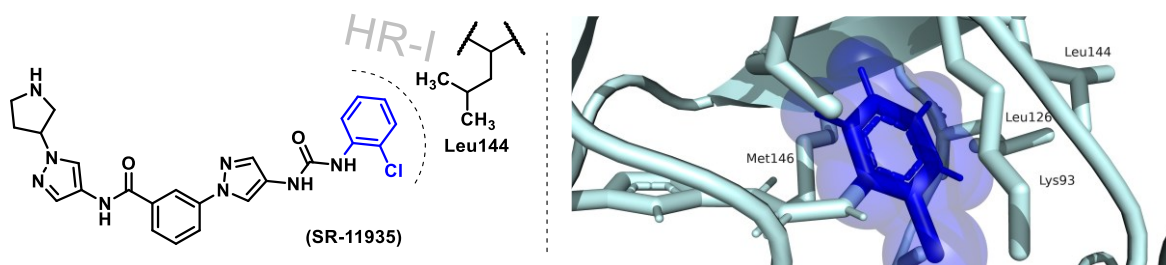
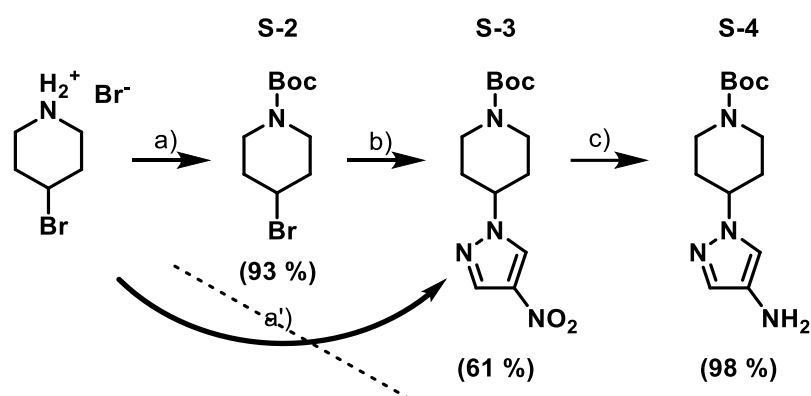


Abbildung 8: Chemische Umgebung der HR-I von JNK3 mit gebundenem Aminopyrazolinhibitor **SR-11935** (PDB = 4WHZ).¹³³

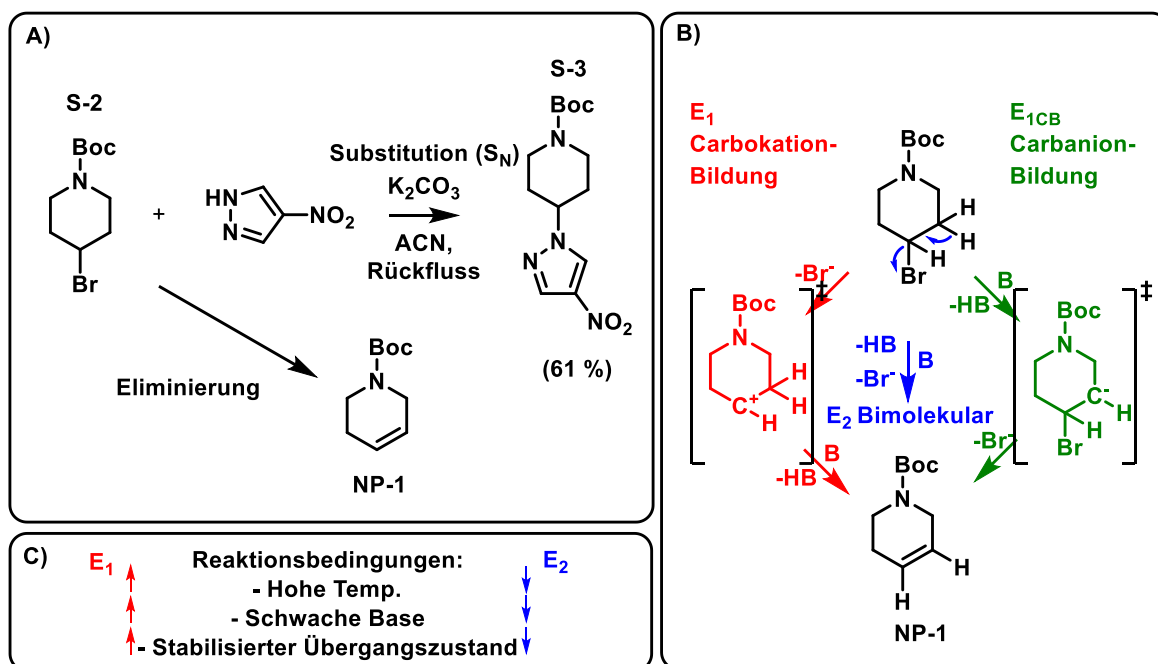
Aufgrund des in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Aminosäure-Unterschiedes von Ile106(JNK1) zu Leu106/144(JNK2/3) innerhalb der HR-I, galt die Adressierung von Leu106/144 als erster Ansatzpunkt um höhere Selektivität gegenüber JNK1 zu erzielen.¹²⁰ Entsprechend wurden zuerst die östlichen Motive optimiert. Die publizierte Synthese für **A-1** nach Zheng et. al wurde hierbei leicht angepasst angewandt.¹³³

In dieser verwendeten orthogonalen Synthese musste zunächst der *Building-Block* (BB) **S-4** synthetisiert werden. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde in Abweichung zur beschriebenen Route auf eine Schutzgruppenstrategie für das Schlüsselintermediat **S-4** zurückgegriffen (siehe Schema 1).



Schema 1: Synthese von Schlüsselintermediat **S-4**. Route leicht abgewandelt nach Zheng et al., welche direkt über Schritt a') verläuft.¹³³ **a)** 4-Bromopiperidin·HBr (1 eq.), Di-*tert*-butyldicarbonat (1 eq.), DIPEA (2 eq.), DCM, RT (93 %); **b)** **S-2** (1,8 eq.), 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), ACN (trocken), 85°C (61 %); **c)** **S-3** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave[®] Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,014 eq.), EtOAc, 40 °C (98 %).

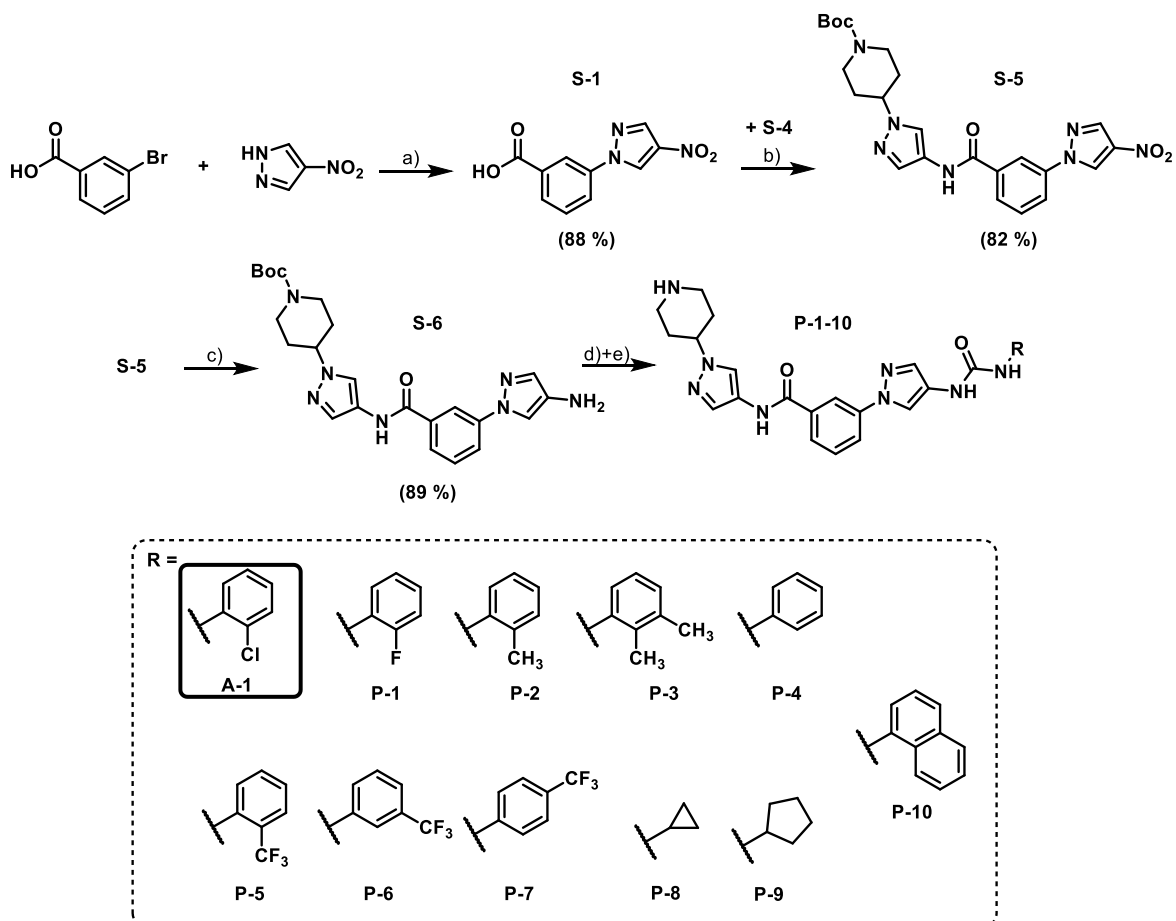
Hierzu wurde der Ausgangsstoff 4-Bromopiperidin·HBr vorerst mit einer *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe versehen (**a**) und anschließend dann über eine nucleophile Substitutions-Reaktion (S_N) mit 4-Nitropyrazol verknüpft (**b**). Abweichend von Zheng et al., wurde diese Reaktion in ACN unter Rückflussbedingungen durchgeführt und nicht wie beschrieben in DMF bei 40°C, da in einem Testansatz mit DMF keine Umsetzung beobachtet werden konnte. Bei der so durchgeführten Reaktion konnten jedoch nur mittlere Ausbeuten erhalten werden (61 %). Ein Eliminierungsprodukt (**NP-1**) konnte aus dem Ansatz isoliert und per NMR nachgewiesen werden (siehe Abb. **2A**), dessen Entstehung wohl für die geringere Ausbeute bei Schritt **b**) verantwortlich war. Das gewünschte Produkt (**S-3**) wurde im Glasreaktor bei 7 bar H₂-Beladung und Pd/C-Katalyse in Schritt **c**) weiter zum Schlüssel-Intermediat **S-4** hydriert.



Schema 2: **A)** Synthese von **S-3** mit entstehenden Nebenprodukt **NP-1**. **B)** Mechanistische Darstellung der konkurrierenden Mechanismen E_1 (E_{1cb}) und E_2 für die Entstehung von **NP-1**. Schema abgeleitet von den zusammenfassenden Studien von Hughes et al., Hanhart & Ingold et al und McLennan et al.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ **C)** Reaktionsbedingungen und ihr Einfluss auf die Ordnung des Eliminierungs-Mechanismus.¹⁴⁷

Mechanistisch ist für die Bildung von **NP-1**, aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen eine Eliminierungsreaktion 1. Ordnung (E_1) wahrscheinlich (im Gegensatz zu E_2 - oder E_{1cb} -Reaktionen). Dies liegt an der eingesetzten, verhältnismäßig schwachen Base K_2CO_3 , welche eine initiale Deprotonierung in 3.er bzw. 5.er Position am Piperidin-Ring wenig wahrscheinlich macht. Ein hierdurch entstehendes Carbanion wäre schlecht stabilisiert, wodurch insbesondere E_{1cb} -Reaktionen keine Rolle spielen sollten.¹⁴⁶ Ein durch die Elimination der Abgangsgruppe gebildetes sekundäres Carbokation sollte jedoch durch die elektronenschiebenden Effekte, wie durch Hyperkonjugation der benachbarten Alkylmotive leicht stabilisiert werden, wobei jedoch protisches Lösemittel die Stabilisierung zusätzlich erhöhen würde.^{147, 148} Die hohe eingesetzte Temperatur ist ein weiteres Indiz, welches für einen E_1 Mechanismus spricht (siehe Schema **2A + C**).¹⁴⁷ Bei basenkatalysierten Kreuzkupplungsreaktionen zwischen **S-2** und Arylhalogeniden in Dimethylacetamid (60 °C) ist die Eliminierung zu **NP-1** als Nebenreaktion bereits beobachtet worden.¹⁴⁹

Nach Zheng et al. konnte eine C-N Verknüpfung zwischen 4-Nitropyrazol und 3-Brombenzoesäure via liganden-gestützter Ullmann-Kupplung zum benötigten zweiten Schlüsselintermediat **S-1**, realisiert werden (siehe Schema **3** Reaktion **a**). Diese C-N-Verknüpfung kristallisierte sich im späteren Verlauf als limitierender Reaktionsschritt heraus, da nur eine begrenzte Derivatisierung des zentralen Benzolaromaten, sowie des *Hinge*-bindenden Pyrazols über diese Reaktion realisierbar war. Eine detailliertere Betrachtung erfolgt in Abschnitt **3.5**.

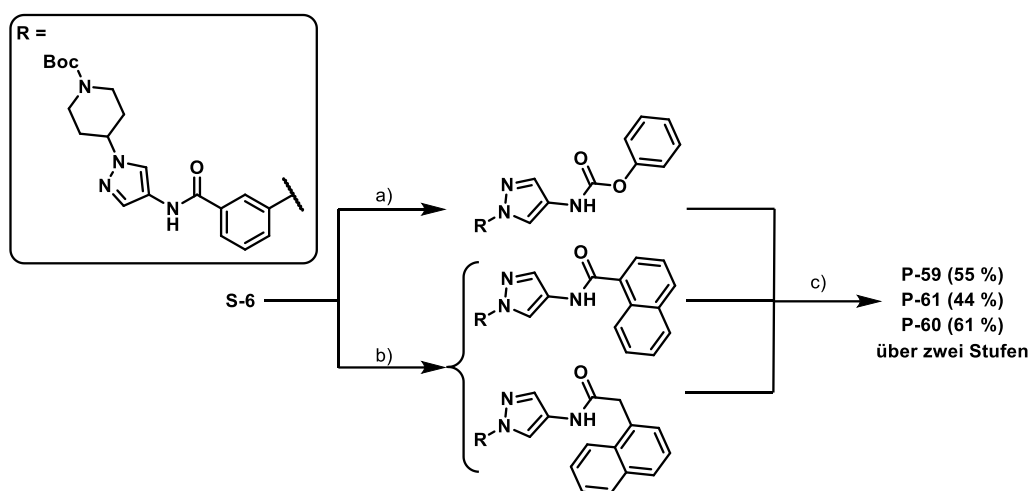


Schema 3: Zweiter Abschnitt der leicht abgewandelte Syntheseroute nach Zheng et al.¹³³ Reaktionsvorschriften der jeweiligen Endstufenderivatisierung (**d**) & **e**) hier exemplarisch für die Synthese von **A-1** beschrieben: **a**) 4-Nitro-1H-pyrazol (1 eq.), 3-Brombenzoesäure (1,5 eq.), Cs₂CO₃ (3 eq.), *trans*-N,N'-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,4 eq.), Cu(I) (0,2 eq.), DMF (trocken), 95 °C (88 %); **b**) **S-1** (1 eq.), **S-4** (1,02 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBt Monohydrat (enthält 20 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), RT (82 %); **c**) **S-5** (1 eq.), Fe(0) (10 eq.), NH₄Cl (10 eq.), EtOH:H₂O (2:1), 65-70 °C (89 %); **d**) **S-6** (1 eq.), 2-Chlorphenylisocyanat (1 eq.), DCM, RT; **e**) Produkt aus **d**) (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (5 eq.), EtOH, 50 °C (79 %).

Weiter der Syntheseroute von Zheng et al. folgend, wurde **S-1** mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl) in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und der Hilfsbase *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) an *Building-Block* **S-4** kondensiert. Eine Béchamp-Reduktion mit Fe(0) als Elektronenquelle stellte sich für Schritt **c**) als effiziente Alternative zur entsprechenden Reduktion mit Pd/C nach Zheng et al heraus.¹³³ Abschließend wurde das Schlüsselintermediat **S-6** mit entsprechenden Isocyanaten versetzt (**d**). Hierdurch war, in Kombination mit einer direkt folgenden Boc-Entschützung (**e**)), die Substitution des östlichen, HR-I adressierenden Motivs möglich. Nach der Entschützung mit ethanolischer HCl (1,25 M) bei 50-60 °C wurden die entstehenden Produkte bevorzugt als Hydrochlorid isoliert.

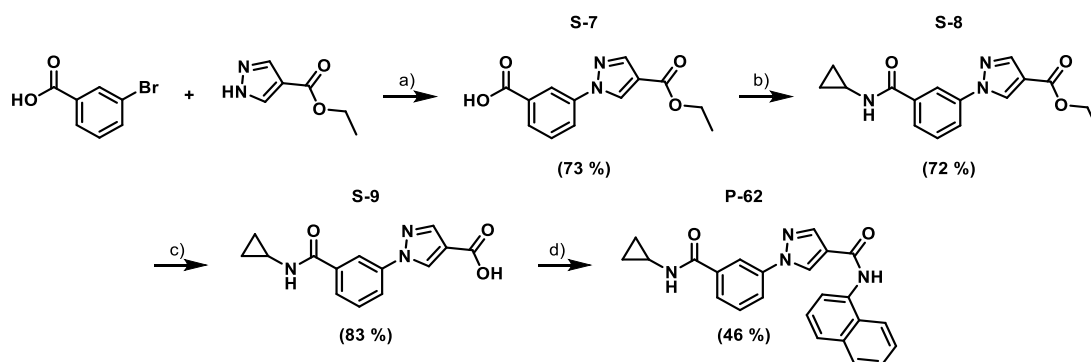
3.2.1 Substitution des HR-I Harnstoff-Motifs

Ausgehend von Schlüsselintermediat **S-6**, waren auch Substitutionen des Harnstoffs möglich. Das entsprechende Phenylcarbammat konnte unter Zusatz von Phenylchlorformiat erhalten werden. 1-Naphthoesäure und Naphthylessigsäure konnte mit EDC·HCl und HOBT an **S-6** gekoppelt werden. Final wurden die so synthetisierten Intermediate mittels ethanolischer HCl entschützt (**c**); siehe Schema 4).



Schema 4: Austausch der HR-I-Funktionalität: **a)** **S-6** (1 eq.), Phenylchlorformiat (1 eq.), TEA (1 eq.), THF, RT; **b)** **S-6** (1 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), RT; **c)** Produkt aus a) bzw. b) (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (5-10 eq.), EtOH, 60 °C.

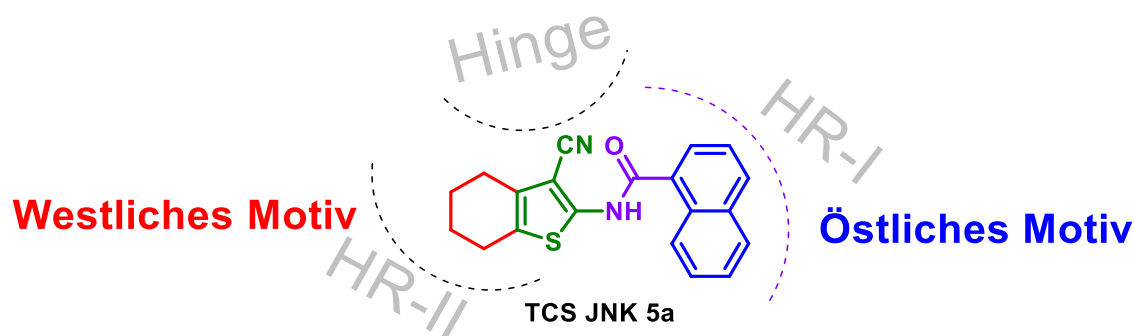
Im späteren Verlauf der durchgeführten Studien wurde, ebenfalls nach einer Syntheseroute von Zheng et al., das mit **P-61** eingeführte Naphthylamid-Derivat invertiert, um das entsprechende Pyrazol-4-carboxamid **P-62** zu erhalten (siehe Schema 5).¹³³



Schema 5: Synthese eines Pyrazol-4-carboxamid-Derivats. **a)** Ethyl-4-pyrazolcarboxylat (1 eq.), 3-Brombenzoesäure (1,2 eq.), Cs₂CO₃ (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,05 eq.), DMF (trocken), 100 °C (73 %); **b)** **S-7** (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (4 eq.), DMF (trocken), RT (72 %); **c)** **S-8** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (5 eq.), MeOH:H₂O (1:1), RT (83 %); **d)** **S-9** (1 eq.), Oxalylchlorid (2,4 eq.), DMF (kat.), THF:DCM (2:1), 35-40 °C; **d-2)** 1-Naphthylamin (1 eq.), Pyridin, 0°C-RT (46 %).

3.3 2-Amino-3-cyanothiophene und deren Abkömmlinge

Parallel zu der Optimierung der Aminopyrazol-Strukturen wurde die Substanzklasse des ebenfalls selektiven JNK2/3 Inhibitors, **TCS JNK 5a** (auch als **JNK Inhibitor IX** bezeichnet; sie Abb. 9) derivatisiert und weiter untersucht.¹²⁹



Lit.:

pIC_{50} (JNK1) < 5,0 \Rightarrow IC_{50} (JNK1) = 10000 nM

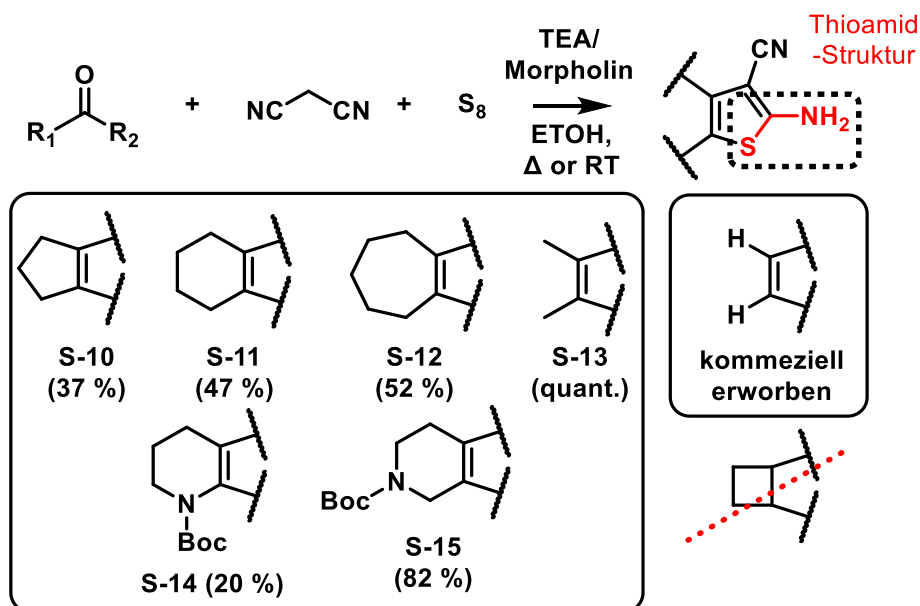
pIC_{50} (JNK2) = 6,5 \Rightarrow IC_{50} (JNK2) = 316 nM

pIC_{50} (JNK3) = 6,7 \Rightarrow IC_{50} (JNK3) = 200 nM

pIC_{50} (p38) < 4,8 \Rightarrow IC_{50} (p38) = 15849 M

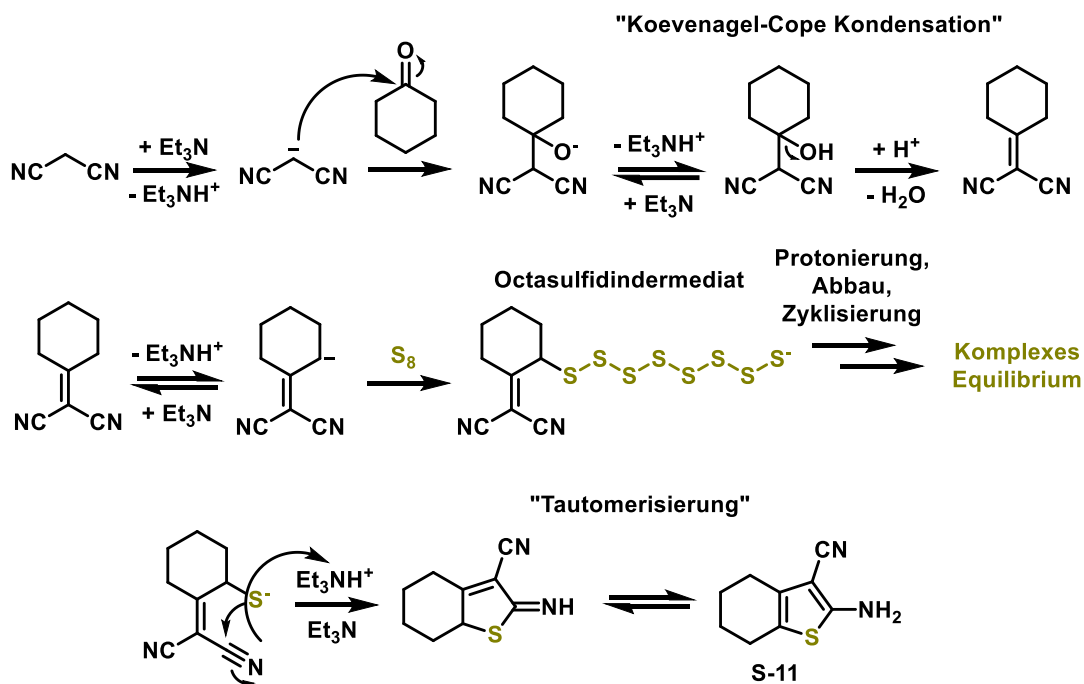
Abbildung 9: Ausgangsinhibitor **TCS JNK 5a**. Dargestellte Hemmdaten wurden aus der entsprechenden Literatur übernommen.¹²⁹ Farbkodierung: rot gefärbt = HR-II Motiv; grün gefärbt = zentrale aromatischer Kern mit *Hinge*-Motiv; violett gefärbt = Amid-Linker; blau gefärbt = HR-I Motiv.

Für die Derivatisierung dieses Grundgerüsts wurde auf die Route von Angell et al. zurückgegriffen.¹²⁹ Aufgrund der schnellen Derivatisierbarkeit, z.B. via Amid-Kupplung an der thioamid-ähnlichen Funktion, lag der Fokus zuerst auf den westlichen, HR-II adressierenden Strukturelementen. Hier galt es ein selektiveres, sowie besser löslichkeitsvermittelndes HR-II-Motiv zu finden. Das substituierte zentrale 2-Amino-3-cyanothiophen ließ sich über eine Gewald-Reaktion in einem Schritt aus den entsprechenden Ketonen oder Aldehyden mit Malononitril und elementarem Schwefel unter Basenzusatz (wie Triethylamin (TEA) oder Morpholin) herstellen (siehe Schema 6).^{129, 150}



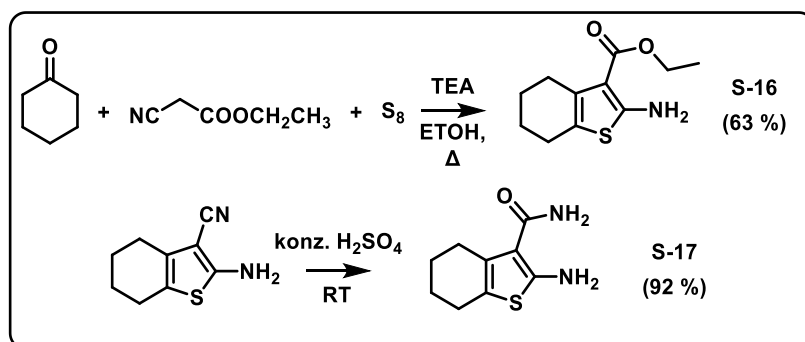
Schema 6: Synthese des 2-Amino-3-cyanothiophen Grundgerüsts: Keton-Komponente (1 eq.), S_8 (1 eq.), Malononitril (1 eq.), TEA oder Morpholin (1-2 eq.), EtOH, 50-70 °C bzw. RT (**S-14** + **S-15**).

Der genaue Mechanismus der Gewald-Reaktion wurde bislang nicht vollständig aufgeklärt. Man geht jedoch davon aus, dass nach einer initialen Knoevenagel-Cope-Kondensation der Carbonyl-Komponente an das deprotonierte α -CH-azide Kohlenstoff-Atom des Malonodinitrils, der Schwefel nucleophil und basenkatalysiert an der α -Position zur Unsatigung addiert und ein Octasulfid ausbildet. Unterschiedliche und potentiell parallel verlaufende Reaktionen führen schließlich zur Bildung des Monosulfids. Dieses Zwischenprodukt ist als alleiniges Intermediat in der Lage, den stabilen Thiophenring über einen intramolekularen nucleophilen Angriff des Monosulfids an das Nitril, welcher gefolgt wird von einer Tautomerisierung zum entsprechenden 2-Aminothiophenring, auszubilden (siehe Schema 7).¹⁵⁰⁻¹⁵²



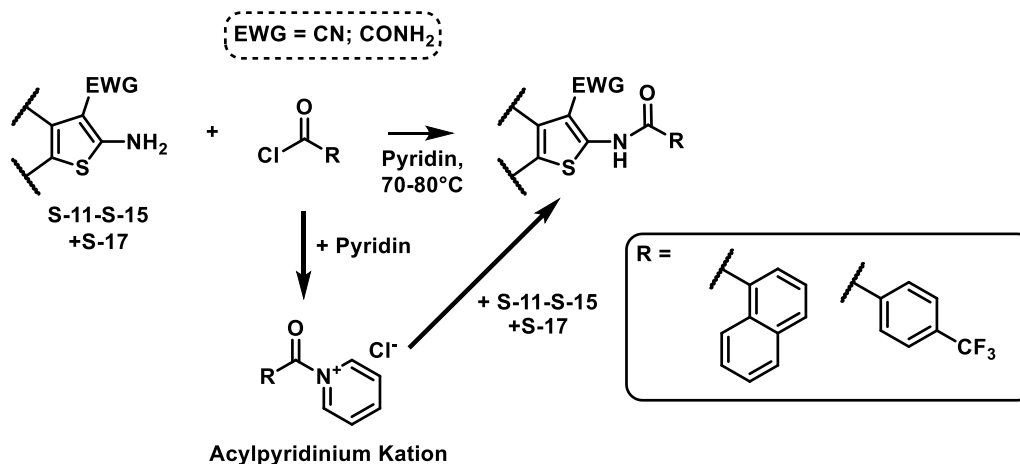
Schema 7: Plausibler Mechanismus der Gewalt-Reaktion mit Cyclohexanon und Malonodinitril nach den Studien von Sharma et al.¹⁵¹

Über diese Reaktion ließ sich zwar das Cyclopentyl-Derivat (**S-10**) herstellen, das Cyclobutylketon ließ sich jedoch nicht unter den in Schema 6 beschriebenen Bedingungen über eine Gewalt-Reaktion zum korrespondierenden Aminothiophen umsetzen. Beim Einsatz von Oxopiperidin-Derivaten konnte die Reaktion bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt werden (**S-14**, **S-15**). Auch der Austausch einer Nitril-Funktionalität des Malononitrils mit anderen *electron-withdrawing groups* (EWGs), wie Estern, führte zu dem gewünschten Produkt (**S-16**; siehe Schema 8). Der *Building-Block* **S-17** wurde wiederum aus **S-11** über eine „praktisch wasserfreie“ saure Nitrilhydrolyse in konzentrierter Schwefelsäure (96 %) als Lösemittel (LM) hergestellt.



Schema 8: Herstellung weiterer in Position 3 derivatisierte 2-Aminothiophen-Derivate.

Die Endverbindungen wurde über Amid-Kupplungen von 1-Naphthylcarbonsäurechlorid, bzw, 4-Trifluormethylbenzoesäurechlorid mit den jeweiligen 2-Aminothiophenen hergestellt (siehe Schema 9).



Schema 9: Amid-Kupplungen der thioamidartigen Struktur von 2-Aminothiophen-Derivaten mit Säurechloriden in Pyridin.¹⁵³

Um eine ausreichende Umsetzung zu gewährleisten mussten die Reaktionen bei verhältnismäßig hohen Temperaturen (70 °C) durchgeführt werden. Als Lösemittel wurde Pyridin eingesetzt, das zum einen die entstehenden Protonen abfängt, zum anderen jedoch auch mit dem Säurechlorid zu einer reaktiven Acylpyridinium-Spezies reagiert und somit als Acylgruppenüberträger fungieren kann.¹⁵³

3.3.1 Einführung von löslichkeitsvermittelnden Resten

Die Gruppe der *N*-(Thiophen-2-yl)amid-Derivaten zeichnete sich durch geringe Löslichkeiten aus. Dies führte insbesondere bei Solubilisierungs-Versuchen in injizierbaren Vehikeln zu Problemen (Kapitel 4.7).

Wie in Abbildung 10 dargestellt und ebenfalls von Angell et al. bereits synthetisch beschrieben, lassen sich über das Einfügen von Stickstoffen in den Cyclohexylring, löslichkeitsvermittelnde Gruppen einfügen.¹²⁹

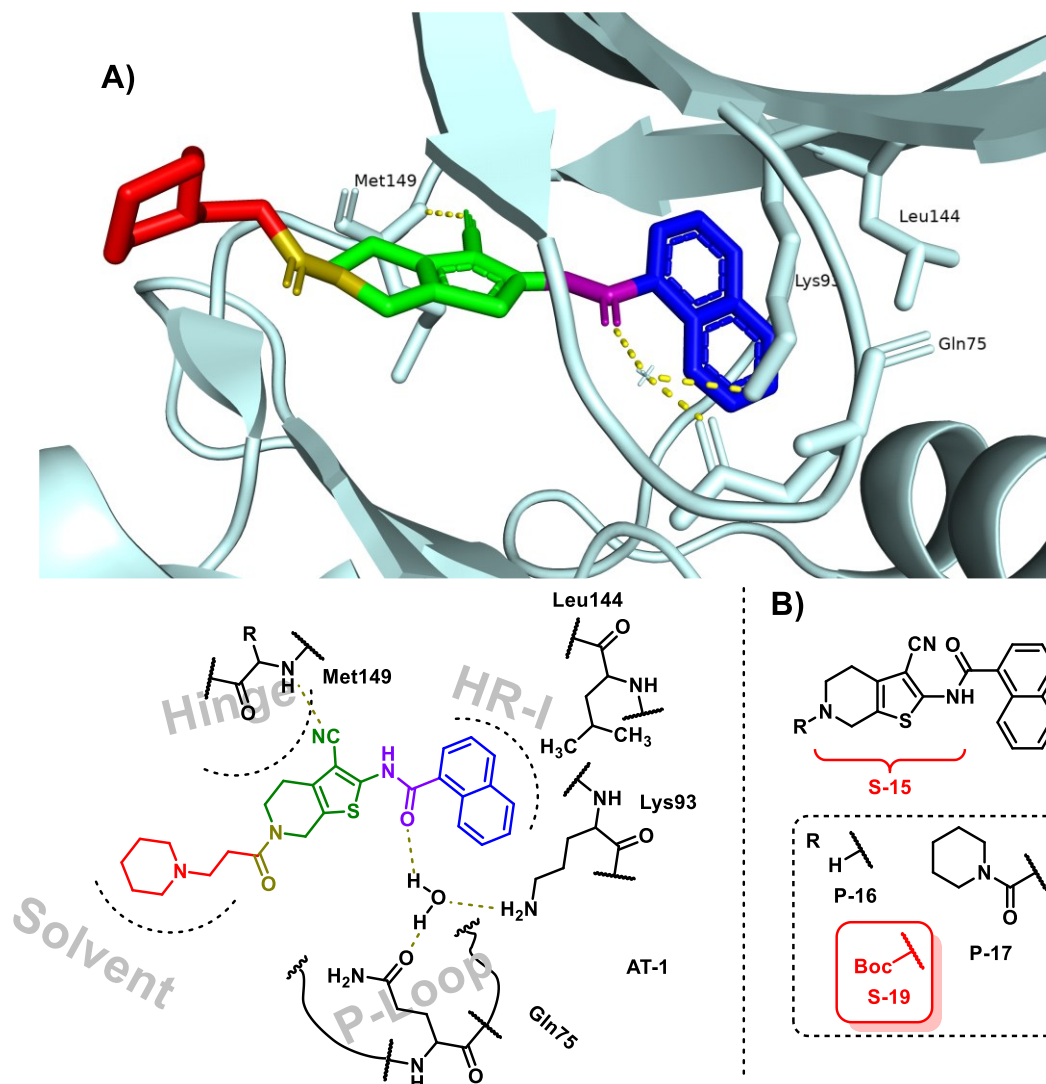
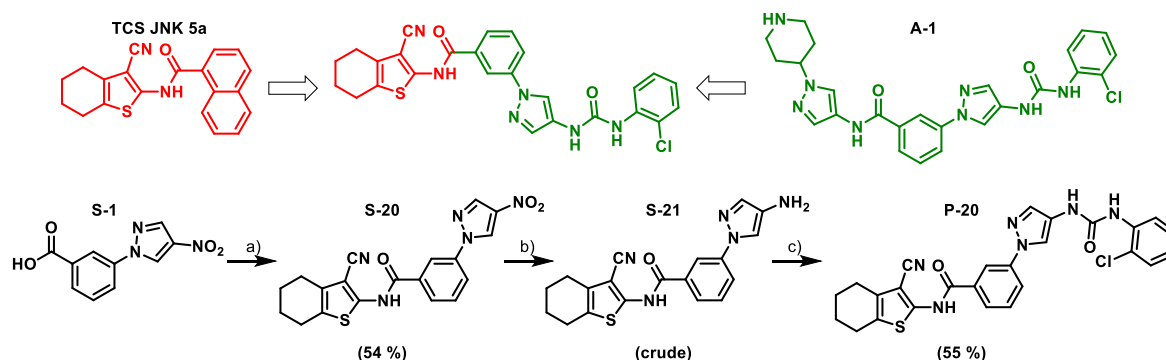


Abbildung 10: **A)** Darstellung der Chemische Umgebung des von **TCS JNK 5a** abgeleiteten Inhibitors **AT-1**, kokristallisiert in JNK3 (PDB = 200U). **B)** Synthetisieren Inhibitoren mit Löslichkeitsvermittelnden Resten.

Der Synthese von Angell et al., für den publizierten Inhibitor **AT-1** folgend, konnten der *Building-Block* **S-15** (Abb. 10), wie in Schema 9 dargestellt, in Pyridin bei 80 °C mit Naphthoesäurechlorid zum entsprechenden Amid **S-19** umgesetzt werden.¹²⁹ Analog zu Angell et al. wurde im Anschluss daran die Boc-Schutzgruppe mit ethanolischer HCl abgespalten um die Testverbindung **P-16** als Hydrochlorid zu generieren.¹²⁹ Diese Verbindung konnte nun weiter derivatisiert werden. Eine Umsetzung mit 4-Morpholincarboxylchlorid führte zu Testverbindungen **P-17**. Hypothetisch sollte **P-16** aufgrund der Protonierbarkeit des eingeführten, basischen Piperidin-Stickstoffes und **P-17** aufgrund der polaren Harnstoff-Funktionalität besser in wässrigen Systemen löslich sein als die Ausgangsverbindung **TCS JNK 5a**. Allerdings führt das Einführen einer Harnstofffunktion nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung die Löslichkeit in polaren Lösemitteln.¹⁵⁴ Für eine genaue Aussage zur Löslichkeit von **P-16** und **P-17** wären experimentelle Daten notwendig. Da diese Endverbindungen jedoch ungenügende Aktivitäts- und Selektivitätswerte zeigten wurden diese Versuche nicht mehr durchgeführt.

3.3.2 Ein Kombinationsansatz

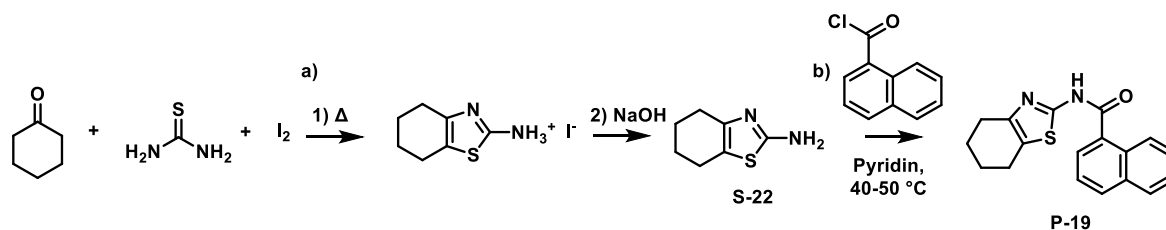
Es wurde versucht das 2-Aminothiophen-Grundgerüst, sowie das Aminopyrazol-Grundgerüst miteinander zu kombinieren. Entsprechende Synthese erfolgte ebenfalls als Kombination aus den beiden vorweg beschriebenen Syntheserouten und ist in Schema 10 dargestellt.



Schema 10: Kombination aus dem 2-Aminothiophen und Aminopyrazol-Grundgerüst. **a)-1** S-1 (1 eq.), Oxalylchlorid (3 eq.), DMF (kat.), DCM (trocken), RT; **a)-2** S-11 (1 eq.), Pyridin, 0-80 °C (54 %); **b)** S-20 (1 eq.), Fe(0) (10 eq.), NH₄Cl (10 eq.), EtOH:H₂O (3:1), 65-70 °C (*crude*); **c)** S-21 (1 eq.), 2-Chlorphenylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (55 %).

3.3.3 Die 2-Aminothiazolgrundstruktur

Neben dem Austausch des *Hinge*-bindenden Nitril-Motivs durch eine Amidfunktion, wurde auch versucht ein Thiazol als *Hinge*-Binder einzuführen. Aufgrund der geringen Größe des Nitrils, sollte das freie Elektronenpaar des Thiazols einen ähnlichen Abstand zur *Hinge* besitzen, sofern die unterschiedliche Grundstrukturen in gleicher Weise binden. Die Synthese ist in Schema 11 dargestellt.



Schema 11: Synthese des Thiazol-Derivats P-19. **a)-1** Cyclohexanon (1 eq.), Thioharnstoff (2 eq.), I₂ (1 eq.), 105 °C; **a)-2** NaOH (aq.), DCM, RT (*crude*); **b)** S-22 (1 eq.), Naphthoesäurechlorid (1 eq.), Pyridin (trocken), 40-50 °C (27 %).

Die durchgeführte Aminothiazolsynthese führte intermediär zu einem Hydroiodid-Salz (**a)-1**), wovon zunächst durch Deprotonierung die freie Base **S-22** hergestellt wurde (**a)-2**).¹⁵⁵ Diese wurde durch Zusatz von 1-Naphthoesäurechlorid zum gewünschten Produkt **P-19** umgesetzt (**b**).

3.4 Substitution des HR-II-/ Lösungsmitteladressierenden Motivs

Publikationen zu JNK3-selektiven Aminopyrazol- und Indazol-basierten Grundgerüsten legten Nahe, dass die Verkleinerung der HR-II- bzw. lösemitteladressierenden Strukturen zu einer besseren Selektivität zwischen JNK1 und JNK3 führen sollte.^{132, 134} Da die orthosterischen Taschen von JNK2 und JNK3 eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, wurde rückgeschlossen, dass ähnliche Selektivitätseffekte auch zwischen JNK1 und JNK2 auftreten könnten. Von den entsprechenden Kristallstrukturen ausgehend, konnte jedoch auf keine spezifische Wechselwirkung geschlossen werden, die diesen Effekt begründet hätten (siehe Abb. 11).

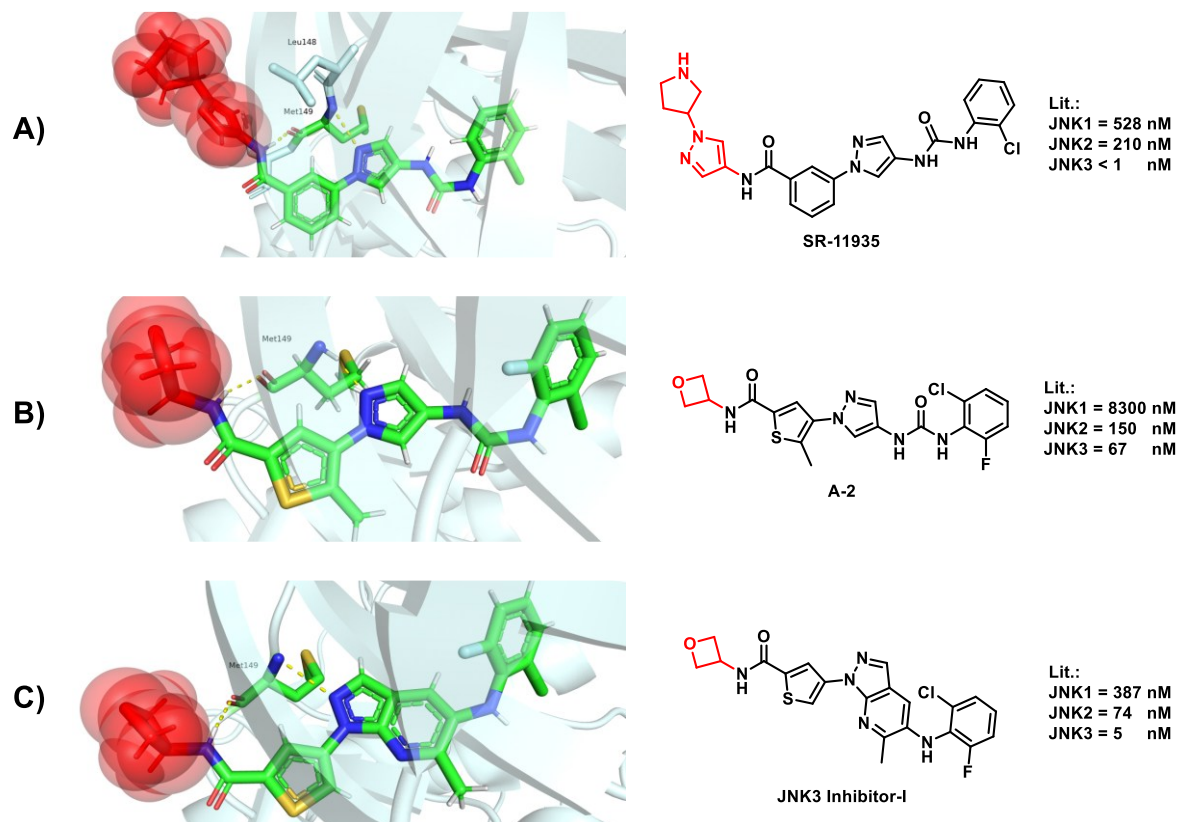
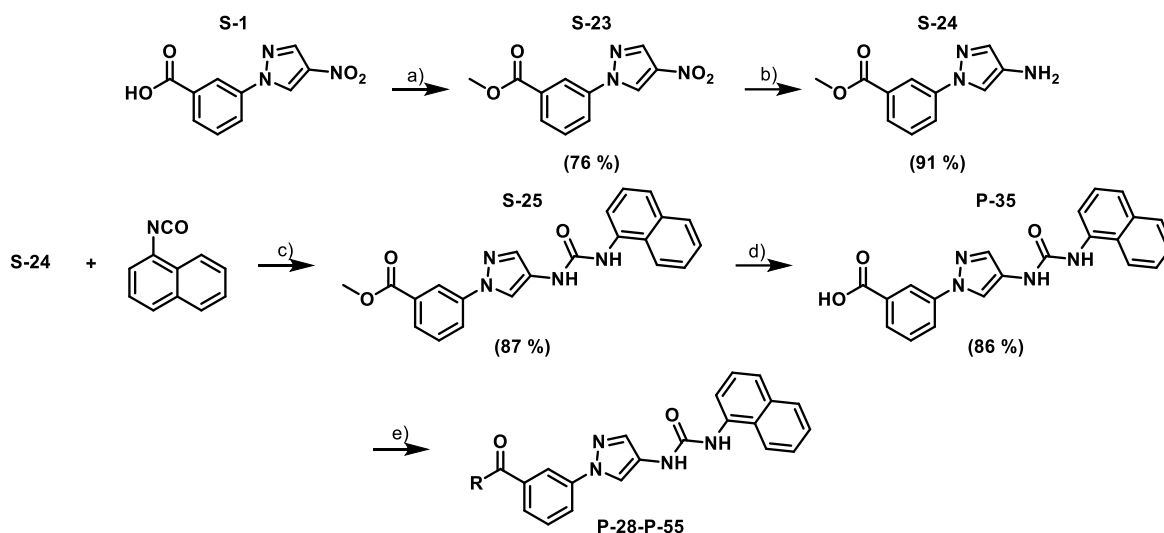


Abbildung 11: Kristallstrukturen von JNK3 kokristallisiert mit unterschiedlich selektiven orthosterischen Inhibitoren. Die jeweiligen HR-II-/ lösemitteladressierenden Motive (rot markiert) zeigen in den jeweiligen Kristallstrukturen keine spezifische Interaktion. **A)** SR-11935 gebunden an JNK3 (PDB = 4WHZ). **B)** Inhibitor A-2 gebunden an JNK3 (PDB = 7KSI). **C)** Inhibitor JNK3 Inhibitor-I gebunden an JNK3 (PDB = 7S1N). Die jeweiligen Inhibitionswerte wurden den einzelnen Publikationen entnommen.¹³²⁻¹³⁴

3.4.1 Derivatisierung an der westlichen Carboxy-Komponente

Unter Beibehaltung der Amid-Funktionalität sollten neue HR-II adressierende Reste eingefügt werden. Hierzu wurde die wie in Schema 12 dargestellte „Ester-Route“ etabliert. Als Besonderheit sei anzumerken, dass teilweise bis zu den finalen Endverbindungen keine chromatographische Aufreinigung notwendig war um die entsprechenden Verbindungen in ausreichender Reinheit zu isolieren. Hierdurch ist ein schnelles, weiteres *Upscaling* dieser Syntheseroute möglich.

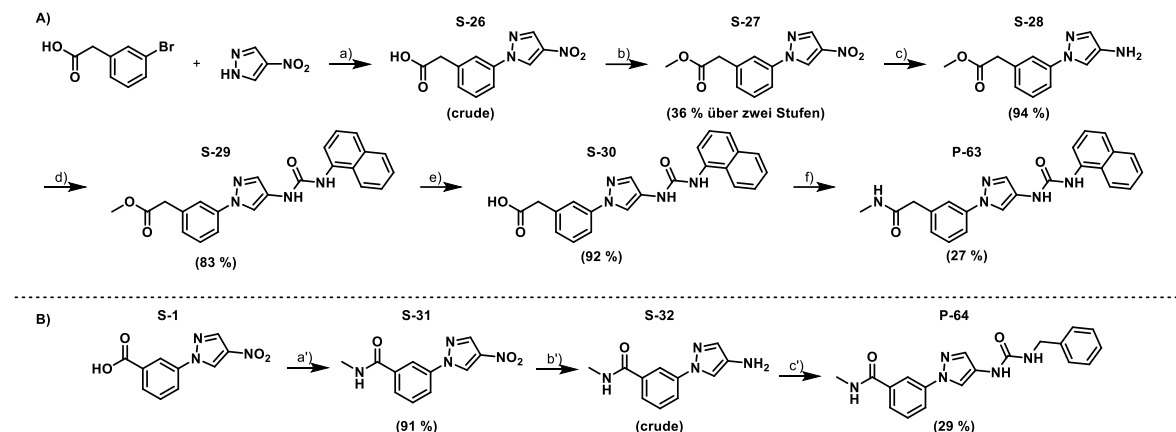


Schema 12: „Ester“-Route zur Derivatisierung von HR-II-/ lösemitteladressierender Motive. Reaktionsvorschriften der jeweiligen Endstufenderivatisierung (e) hier exemplarisch für die Synthese von P-38 beschrieben: **a)** S-1 (1 eq.), H₂SO₄ (kat.), MeOH, Reflux (76 %); **b)** S-23 (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (3:1), 60 °C (91 %); **c)** S-24 (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM, 0 °C- RT (87 %); **d)** S-25 (1 eq.), KOH (7,5 eq.), MeOH:H₂O (20:1), 60 °C (86 %); **e)** P-35 (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (4 eq.), DMF (trocken), 0 °C-RT (92 %).

In dieser Route wurde der *Building-Block* S-1 mittels Fischer-Veresterung in MeOH als Lösemittel und unter saurer Katalyse mit konz. H₂SO₄ zum Methylester S-23 umgesetzt und damit geschützt (b). Die restliche Synthese folgte den Synthesevorschriften aus Schema 3 bis zur erneuten Verseifung des Methylesters mit KOH (d). Die jeweiligen Endverbindungen wurden über Amid-Kupplungen mit EDC·HCl und HOBT erhalten (e).

3.4.1.1 Verlängern des Aminopyrazol-Scaffolds

Um feststellen zu können, ob man durch eine Verlängerung der eher linearen Aminopyrazol-basierten Struktur, den zur Verfügung stehenden chemischen Raum besser ausnutzen könnte, wurden lineare Syntheserouten (Routen A+B siehe Schema 13) entwickelt. Hierdurch konnten sowohl die östliche, als auch die westliche Struktureinheit um eine Methylenheit verlängert werden.

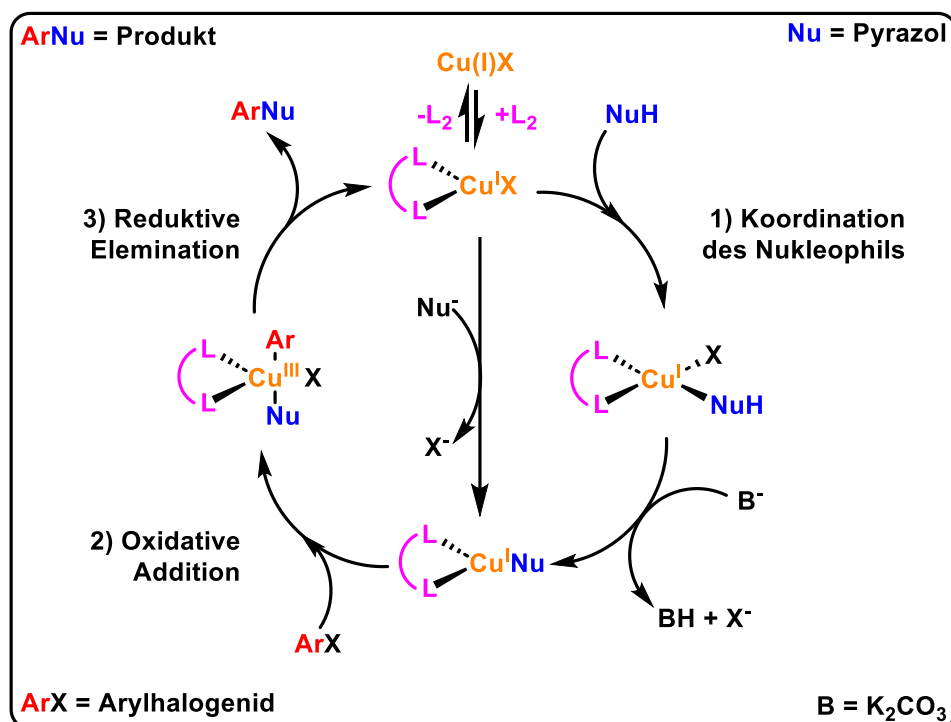


Schema 13: **A)** Syntheseroute zur Verlängerung der westlichen Struktureinheit: **a)** 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 3-Brom-phenylessigsäure (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF (trocken), 95 °C (*crude*); **b)** **S-26** (1 eq.), H₂SO₄ (kat.), MeOH, 65 °C (36 %, über zwei Stufen); **c)** **S-27** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (94 %); **d)** **S-28** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM, RT (83 %); **e)** **S-29** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (5 eq.), MeOH:H₂O (1:1), RT (92 %); **f)** **S-30** (1 eq.), 2 M Methylamin (THF) (2 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (27 %). **B)** Syntheseroute zur Verlängerung der östliche Struktureinheit: **a')** **S-1** (1 eq.), 2 M Methylamin (THF) (1 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), 0 °C-RT (91 %); **b')** **S-31** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (*crude*); **c')** **S-32** (1 eq.), Benzylisocyanat (1 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), RT (29 %).

3.5 Substitution am zentralen Aromaten

Als zentraler Reaktionsschritt, welcher die Derivatisierung an der zentralen aromatischen Struktur einschränkte, erwies sich die liganden-gestützte Ullmann-Kupplung. Diese wurde standardmäßig nach Zheng et al. zur C-N-Kupplung von Pyrazolen mit Arylhalogeniden genutzt.¹³³ Diese spezifische Kupplung von Halogenarylen mit *N*-Heterozyklen wie Pyrazolen wurde zuerst von Antilla et al bzw. S. L. Buchwald beschrieben.¹⁵⁶

Der allgemeine Mechanismus dieser Ullmann-artigen, liganden-gestützten Kreuzkupplung mit nicht-ionische Liganden ist im nachfolgenden beschrieben:

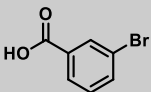
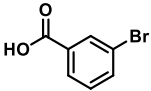
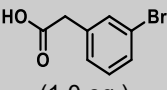
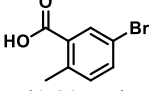
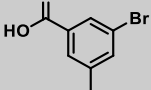
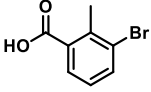
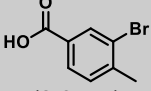
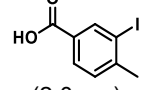
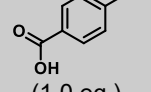
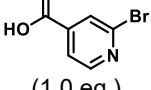


Schema 14: Schematisch dargestellter, plausibler Mechanismus der cyclischen, Ullmann-artigen, liganden-gestützten Kupplung für nicht-ionische Liganden nach Yang et al.¹⁵⁷

Die Reaktion der klassischen Ullmann-Kupplung beschreibt eine Homokupplungsreaktion zwischen zwei elektronenarmen Halogenarenen unter Zusatz von stöchiometrischen Mengen Cu(0)-Pulver.¹⁵⁸ In diesem Fall der Ullmann-artigen Kreuzkupplung, koordiniert der nicht ionische, bidentate Ligand *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin im ersten Schritt an ein Cu(I)-Halogenid. An diesen Cu(I)-Komplex koordiniert im Folgenden dann das Nukleophil, welches im Falle der hier durchgeführten Reaktion einem Pyrazol-Derivat entspricht. Überschüssige Protonen des Nukleophiles können hierbei entweder vor oder nach der Koordination durch die zugesetzte Base abgefangen werden. Daraufhin erfolgt die oxidative Addition des eingesetzten Arylhalogenids, wodurch ein Cu(III)-Komplex gebildet wird. Aus diesem wird schließlich das gewünschte Produkt reaktiv eliminiert und der liganden-stabilisierte Katalysator regeneriert. Bei ionischen Liganden wird davon ausgegangen, dass es zuerst zu einer oxidativen Addition kommt und dann zu einer Koordination des Nukleophils an den Cu(III)-Komplex.¹⁵⁷ Im Folgenden ist eine Zusammenstellung der durchgeführten Ullmann-Kupplungen dargestellt, über die Synthesebausteine mit unterschiedlichen Substitutionsmustern am zentralen Aromaten erhalten wurden (siehe Tabelle **4-a/b**).

Chemischer Teil

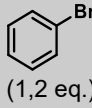
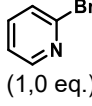
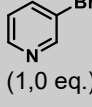
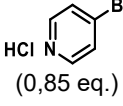
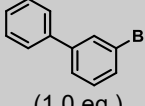
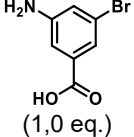
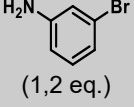
Tabelle 4-a: Reaktionsbedingungen bei der liganden-gestützten Ullmann-Kupplung mit Pyrazolen

Nr.	Halogenaromat	Pyrazol-Derivat	Base	Kat./Ligand*	Temperatur	Ausbeute*
S-1	 (1,5 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,2 eq./ 0,4 eq.	95 °C	87 %
S-7	 (1,0 eq.)	Ethyl 1H-pyrazol-4-carboxylate (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,05 eq./ 0,2 eq.	100-105 °C	73 %
S-26	 (1,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95 °C	nicht isoliert (36 % nach 2 Schritten)
S-45	 (1,28 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,3 eq./ 0,3 eq.	100 °C	69 %
S-48	 (1,2 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,3 eq./ 0,3 eq.	100 °C	60 %
SX-1	 (1,2 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,3 eq./ 0,3 eq.	Rückfluss**	Masse detektiert/ Nicht isoliert
SX-2a	 (2,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,3 eq./ 0,3 eq.	120 °C	Konnte nicht isoliert werden
SX-2b	 (2,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,2 eq./ 0,4 eq.	110 °C	Konnte nicht isoliert werden
SX-3	 (1,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95 °C	Nur geringe Umsetzung/ nicht isoliert
S-63	 (1,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95 °C	95 %

* Eingesetzter Kat. = Cu(I)I und eingesetzter Ligand = *trans*-N,N'-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin.

** Beschriebene Ausbeuten basieren auf Einzelbestimmungen (n = 1). *** Ansatz wurde sukzessiv 16 h bei 100 °C, 1 d bei 120 °C und 1 d bei Reflux gerührt.

Tabelle 4-b: Reaktionsbedingungen bei der liganden-gestützten Ullmann-Kupplung mit Pyrazolen

Nr.	Halogenaromat	Pyrazol-Derivat	Base	Kat./Ligand*	Temperatur	Ausbeute**
S-35	 (1,2 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95°C	100 %
S-37	 (1,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95°C	86 %
S-39	 (1,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95°C	49 %
S-41	 (0,85 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (4,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95°C	68 %
S-43	 (1,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95°C	65 %
S-54	 (1,0 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	K ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,1 eq./ 0,2 eq.	90-95°C	56 %
S-109	 (1,2 eq.)	4-Nitro-1H-pyrazol (1,0 eq.)	Cs ₂ CO ₃ (3,0 eq.)	0,05 eq./ 0,3 eq.	100-105°C	52 %

* Eingesetzter Kat. = Cu(I)I und eingesetzter Ligand = *trans*-N,N-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin.

** Beschriebene Ausbeuten basieren auf Einzelbestimmungen (n = 1).

Bei dem Versuch Methylgruppen am aromatischen Kern einzuführen, konnten nur Produkte isoliert werden, deren Methylierung sich nicht in *ortho*-Stellung zur C-N-Verknüpfung befand (siehe Tabelle 4-a, **SX-1/SX-2a** und **SX-2b**). Ein Phenyllessigsäure-Derivat konnte erst nach weitere Veresterung rein isoliert werden (siehe Tabelle 4-a, **S-26**). Falls das Produkt nach durchgeführter Ullmann-Kupplung nicht rein isoliert werden konnte, bot sich eine direkte Veresterung in MeOH gleichzeitig auch als Aufreinigungsmethode an. Das veresterte Produkt präzipitierte meist im eingesetzten MeOH (**S-23** und **S-27**) direkt und konnte durch einfache Filtration in ausreichender Reinheit isoliert werden. *Para*-ständige Bombenzoesäuren setzten schlecht um und das entsprechende Derivat wurde mit guten Ausbeuten nur über einen synthetischen Umweg synthetisiert (siehe Schema 24). Einfache Phenyl-, Biphenyl-, und Pyridinyl-Derivate konnten mit guten Ausbeuten wie beschrieben gekuppelt werden (siehe Tabelle 4-b, **S-35-S-41**). 2-Bromisonicotinsäure konnte erfolgreich auf diese Weise umgesetzt werden (siehe Tabelle 4-a, **S-63**), wobei das gleichartige Picolinsäure-Derivat über die entsprechende 6-Fluorpicolinsäure via S_NAr-Reaktion synthetisiert werden musste (**S-60**).

Anilin-Derivate wurde ebenso gut toleriert (**S-54** & **S-109**) und wie von Zheng et al beschrieben, konnte anstatt von 4-Nitropyrazol auch der Pyrazol-4-carbonsäureethylester über eine Ullmann-Kupplung eingeführt werden (**S-7**).¹³³

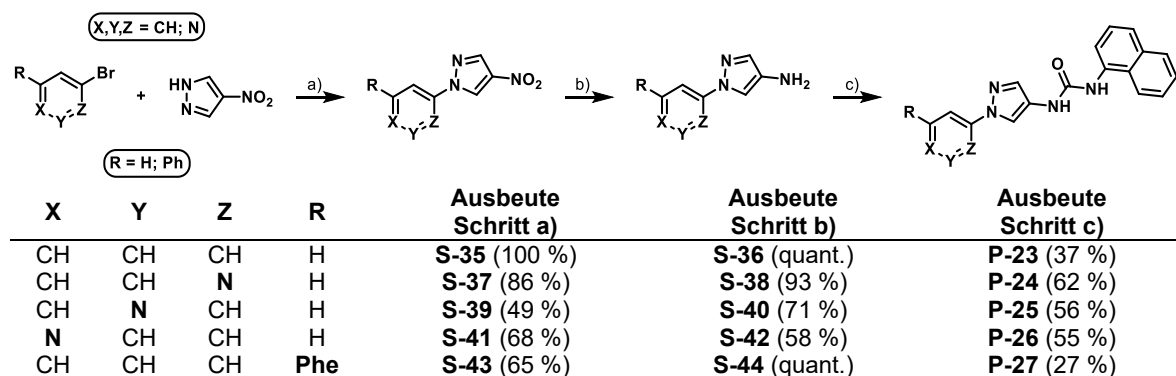
Andere Möglichkeiten diese C-N-Verknüpfung mit Pyrazol-Derivaten zu realisieren wären:

- 1) Säure-/ oder Basenkatalysierte S_{NAr} -Reaktionen von elektronenarmen Arenen (siehe **S-60** (säurekat.) + **S-83** (basenkat.)).¹⁵⁹
- 2) Palladiumkatalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplungen mit Aryltriflaten.¹⁶⁰
- 3) Kupferkatalysierte Chan-Lam-Kupplungen mit Arylboronsäuren.¹⁶¹
- 4) Fotokatalysierte direkte Kupplung von nicht substituierten Arenen mittels Acridin-Lewis-Säure Komplexen.¹⁶²

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den Ullmann-Kupplungen lediglich S_{NAr} -Reaktionen für diese Art der C-N-Verknüpfungen durchgeführt (siehe Schema **19** und **24**).

3.5.1 Einführung von Stickstoffen /Reduktionsansatz

Als nächster Ansatz sollte die komplette HR-II adressierende Gruppe entfernt werden. Die entsprechenden Verbindungen wurden in Anlehnung an die bereits in Schema **3** dargestellte Synthese hergestellt (siehe Schema **15**).

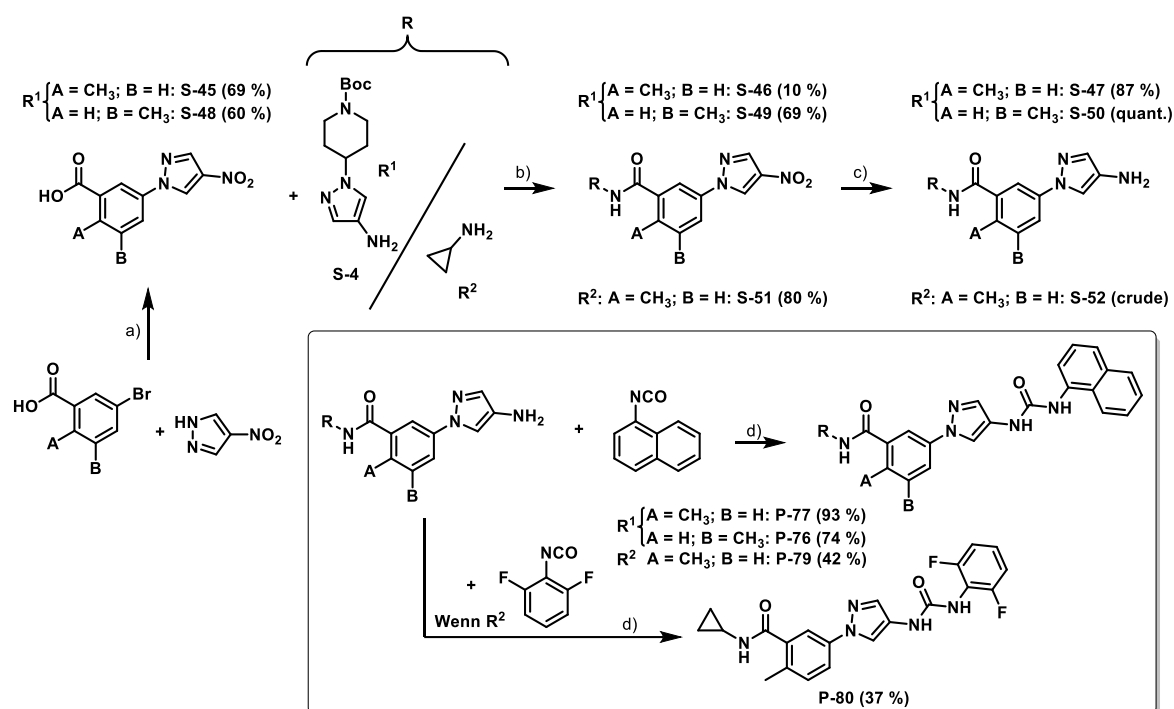


Schema 15: Synthese von Endverbindungen ohne HR-II oder lösemitteladressierende Gruppen. Reaktionsvorschriften hier exemplarisch für die Synthese von **P-24** beschrieben: **a)** 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 2-Bromopyridin (1 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF, 95 °C (86 %); **b)** **S-37** (1 eq.), Fe(0), (5 eq.), NH_4Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (93 %); **c)** **S-38** (1 eq.), 1 Naphthylisocyanat (1 eq.), THF, RT (62 %).

Hierbei wurden erneut über eine liganden-gestützte Ullmann-Kupplung (**a**), die jeweiligen zentralen aromatischen Gruppen mit 4-Nitropyrazol C-N verknüpft (siehe Tabelle **4-b**). Nach anschließender Béchamp-Reduktion mit Fe(0) und NH_4Cl (**b**), wurde die Naphthylharnstoff-Funktion über das entsprechende Isocyanat eingeführt (**c**).

3.5.2 Einführen vom Methylgruppen

Wie bereits in Tabelle 4-a dargestellt, ließen sich die methylierten Synthesebausteine **SX-1** + **SX-2** unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht herstellen. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Methylgruppen in *ortho*-Stellung zum Brom-Substituent zu einer sterischen Hinderung bei der oxidativen Addition an den Kupferkatalysator geführt haben könnten, wodurch schlussendlich keine C-N-Verknüpfung über eine Ullmann-Kupplung zustande kommen konnte. Wie in folgendem Schema 16 dargestellt, konnte jedoch die in Position A/ B methylierten Derivate **S-45** (A = CH₃) sowie **S-48** (B = CH₃) weiter umgesetzt werden.

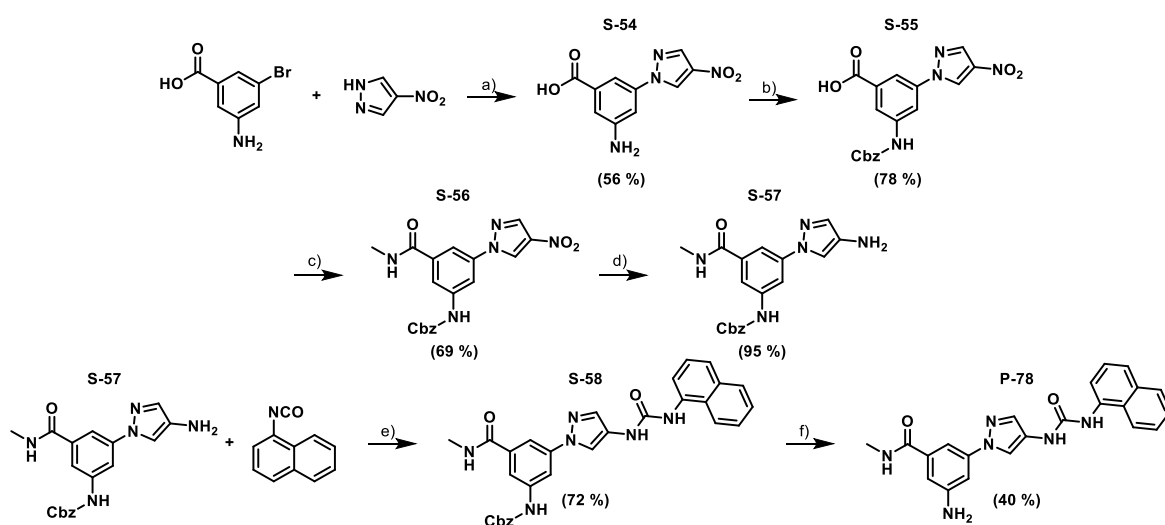


Schema 16: Synthese vom an Kernaromaten methylierten Endverbindungen. Reaktionsvorschriften hier exemplarisch für die Synthese von **P-79** beschrieben: **a)** 4-Nitro-1H-pyrazol (1 eq.), 5-Brom-2-methylbenzoesäure (1,28 eq.), Cs₂CO₃ (3 eq.), Cu(I)I (0,3 eq.), *trans*-N,N'-Dimethylcyclohexane-1,2-diamin (0,3 eq.), DMF (trocken), 100 °C (69 %); **b)** **S-45** (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (80 %); **c)** **S-51** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (*crude*). **d)** **S-52** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (42 %).

Auch hier wurde auf die grundlegende Route von Zheng et al. zurück gegriffen.¹³³ Neben dem *Building-Block* **S-4** wurde auch Cyclopropylamin an **S-45** gekuppelt, um den Effekt der Methylierung in Position A in Kombination mit einem optimierten HR-II adressierenden Rest zu untersuchen.

3.5.3 Einführen einer Anilin Funktion am zentralen Aromaten

Neben den Methylierungen wurden auch Versuche unternommen, eine anilinisches Funktionalität an den aromatischen Kern anzubringen. Hiermit sollte untersucht werden, ob hydrophilere Gruppen am aromatischen Kern toleriert werden. Gleichwohl bietet das freie Anilin die Möglichkeit weitere Substitutionen via z.B. Amid-Kupplungen *late-stage* einzuführen. Nachdem verschiedene Versuche, das gekuppelte Intermediat **S-54** mit Di-*tert*-butyldicarbonat Boc zu schützen scheiterten, wurde auf Chlorameisensäurebenzylester zurückgegriffen um das Anilin mit einer Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Cbz) zu schützen (**b**) und Nebenreaktionen in Schritt **c**) und **e**) zu vermeiden. Eventuelle sterische Probleme könnten als Grund aufgeführt werden, warum eine Boc-Schätzung nicht möglich war.



Schema 17: Synthese von Inhibitor **P-78**. **a**) 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 3-Amino-5-brombenzoesäure (1 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF, 100 °C (56 %); **b**) **S-54** (1 eq.), Chlorameisensäurebenzylester (1 eq.), $NaHCO_3$ (5 eq.), Dioxan:H₂O (1:1), 0 °C – RT (78 %); **c**) **S-55** (1 eq.), 40 % MeNH₂ (aq.) (2,5 eq.), CDI (1,5 eq.), THF, RT (69 %); **d**) **S-56** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (6:1), 60 °C (95 %); **e**) **S-57** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), THF (trocken), RT (72 %); **f**) **S-58** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave® Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,1 eq.), MeOH, RT (40 %).

Nach der Schätzung des zusätzlichen Anilins wurde die Benzoesäurefunktion mittels Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert und nach vollständiger Aktivierung mit 40 % MeNH₂ (aq.)-Lösung versetzt, wodurch **S-56** erhalten wurde (**c**). Nach einer Reduktion mit Fe(0) im schwach sauren Medium (NH₄Cl-Zusatz) (**d**) wurde der Naphthylharnstoff erneut über das entsprechende Isocyanat eingeführt (**e**). Als problematisch stellte sich die Entschätzung des Cbz-Anilins dar. Eine standardmäßige Hydrierung im Glasreaktor bei 7 Bar H₂ und Pd/C-Katalyse in MeOH führte zu guter Umsetzung. Allerdings wurde hierbei auch in geringen Mengen ein schwer abzutrennendes Nebenprodukt erzeugt. Erst nach Aufreinigung via Umkehrphase Flash-Chromatographie, konnte reines Produkt erhalten werden.

Als Nebenprodukt konnte methyliertes **P-78** (**Me-P-78**) identifiziert werden. Es wurde bereits beschrieben, dass Entschätzungen von Cbz oder anderen als Amino-Schutzgruppe

eingesetzten Carbamaten via Hydrierung in MeOH bzw. alkoholische Lösemittel-Gemischen allgemein, zu alkylierten Nebenprodukten führen können.^{163, 164} Dies liegt nach Benoiton et al. an der partiellen palladiumkatalysierten Oxidation der entsprechenden Alkohole (außer Propanol) zu den korrespondierenden Aldehyden, sofern nicht komplette Sauerstoff-freiheit des Lösemittels gewährleistet ist.^{165, 166} Der entsprechende Aldehyd reagiert mit dem freien Anilin zu einem Imin, welches durch den vorhandenen Wasserstoff und Pd/C reduziert wird. Entsprechend findet eine reduktive Aminierung statt welche zu den alkylierten Nebenprodukten führt. Die wohl einzige wirkungsvolle Vermeidungsstrategie in diesem Falle wäre gewesen, z.B. 5 % (v/v) Wasser als Zusatz ins Lösemittel zu geben, wodurch eine Oxidation des Methanols zum Formaldehyd hätte vermieden werden können.^{164, 165} Ein Lösemittelaustausch war nicht erfolgreich, da der Wechsel des Lösemittels zu EtOH oder EtOAc, wohl aufgrund von zu schlechter Löslichkeit des Edukts, zu einer ungenügenden Umsetzung führte. Es wurde sehr genau darauf geachtet, dass das Lösemittel sauber entgast wurde. Des Weiteren wurde der Reaktor erst mehrfach mit Argon begast, bevor der Wasserstoff aufgepresst wurde. Das Lösemittel gänzlich von Sauerstoff zu befreien, hätte sich als apparativ herausfordernd rausgestellt. Gleichzeitig wird von Filira et al. auch in Frage gestellt, ob der Luftsauerstoff überhaupt das Oxidationsmittel in dieser Reaktion darstellt.¹⁶⁴

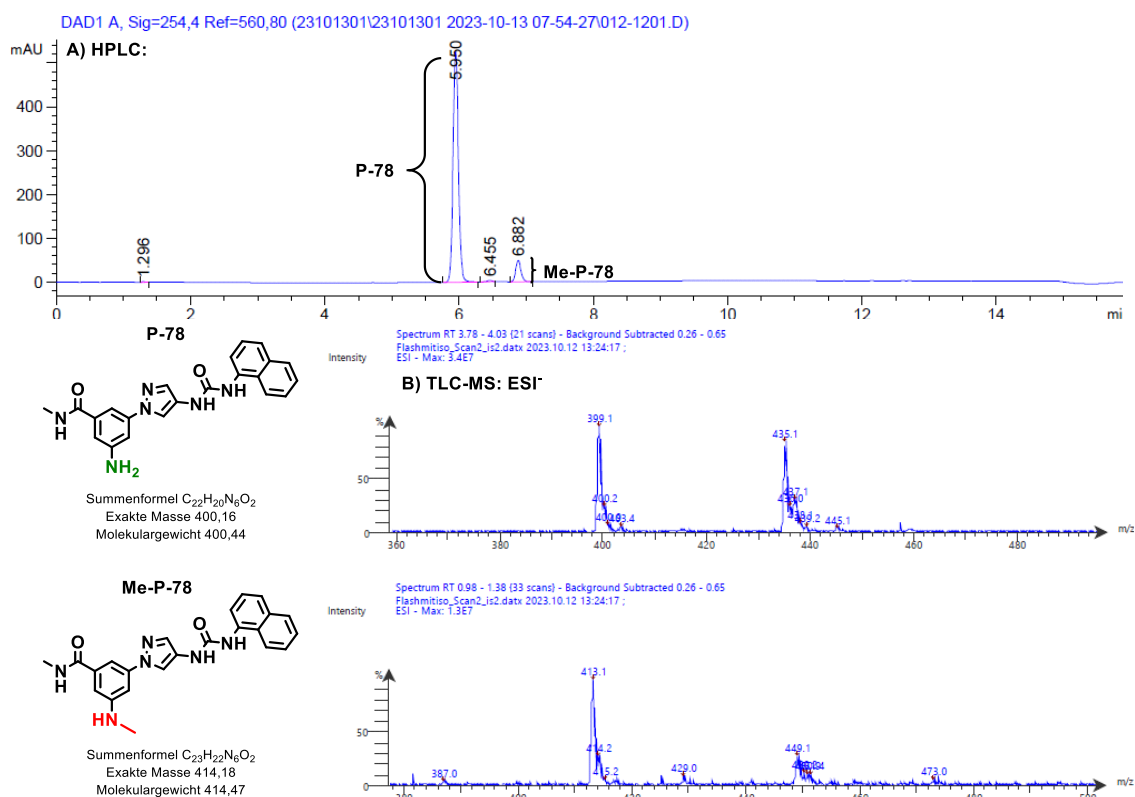
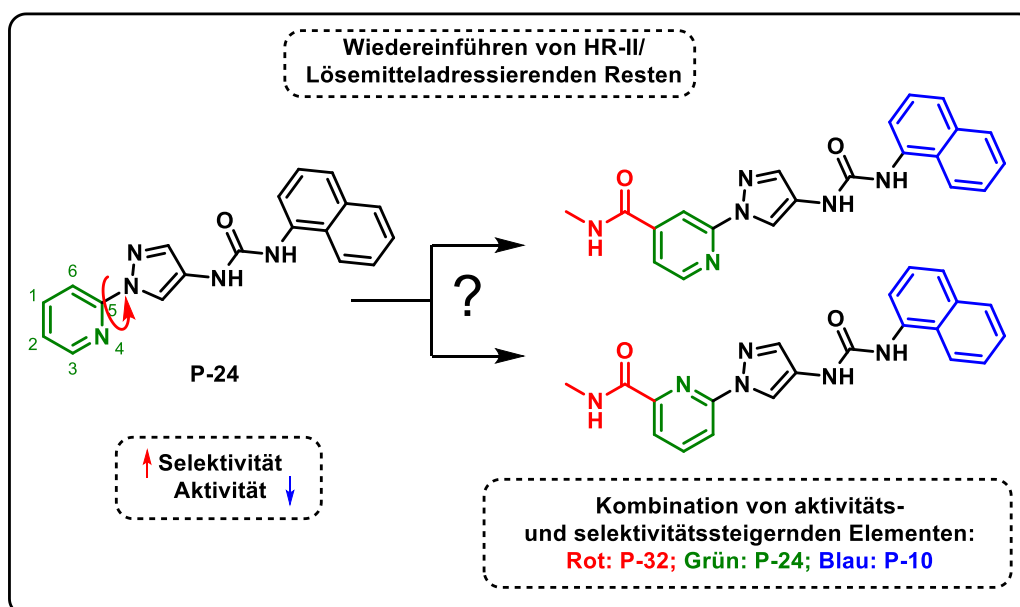


Abbildung 12: **A)** HPLC nach Normalphasen Flash-Chromatographie des folgenden Ansatzes: **S-58** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave® Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,1 eq.), MeOH, RT (40 %). **B)** Massennachweis des gewünschten Produktes **P-78** sowie des mono-methylierten Nebenproduktes **Me-P-78**.

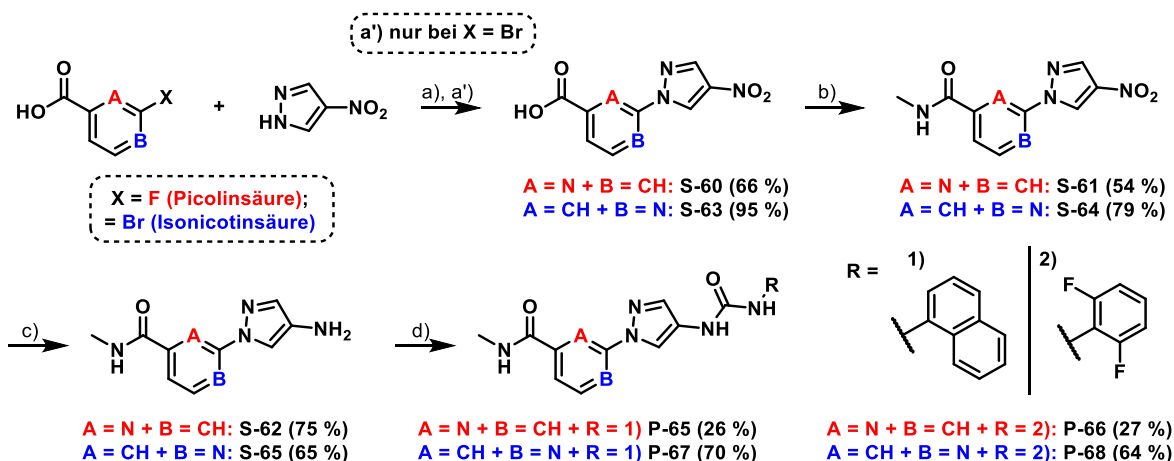
3.5.4 Picolinamid- und Isonicotinamid-Derivate

Da das Einführen eines Stickstoffs am zentralen Aromaten, *ortho*-ständig zur C-N-Verknüpfung zum Pyrazol, zu einer Verbesserung der JNK1/JNK2-Selektivität führte (siehe **P-24**), wurden in einem kombinatorischen Ansatz sowohl Picolinamid-, als auch Isonicotinamid-Derivate synthetisiert. Die Herstellung beider regioisomerer Grundstrukturen war notwendig, da unklar war durch welche Wechselwirkung des Pyridin-Stickstoffs zum Enzym dieser Selektivitäts-Effekt ausgelöst wurde und entsprechend in welcher Orientierung dieser Stickstoff gebunden vorliegt. Gleichzeitig wurde durch das Wiedereinführen des HR-II-/lösemittelvermittelnden Restes versucht die Aktivität von **P-24** wieder zu verbessern. Für diesen Kombinationsansatz wurden für die restlichen Motive bereits bestätigte affinitäts- und selektivitätsfördernde Strukturen gewählt (siehe Schema **18**).



Schema 18: Potentiell mögliche Orientierungen des Pyridin-Stickstoffs nach der Wiedereinführung der westlichen Amid-Komponente. Zur Bestätigung der SAR-Kombinationshypothese, ist die Synthese von beiden hier dargestellten Regioisomeren erforderlich. Dieses Schema ist abgewandelt von der Illustration über Tabelle 5 einer bereits publiziert Arbeit (Wydra et al.).¹¹⁶

Für die Synthese der beiden Strukturklassen wurden für den ersten Syntheseschritt zwei unterschiedliche Reaktionen verwendet. Bei den Isonicotinamid-Derivaten konnten wie bereits in Tabelle **4-a** gezeigt, über eine etablierte Ullmann-artige Kupplung *Building-Block S-63* hergestellt werden.

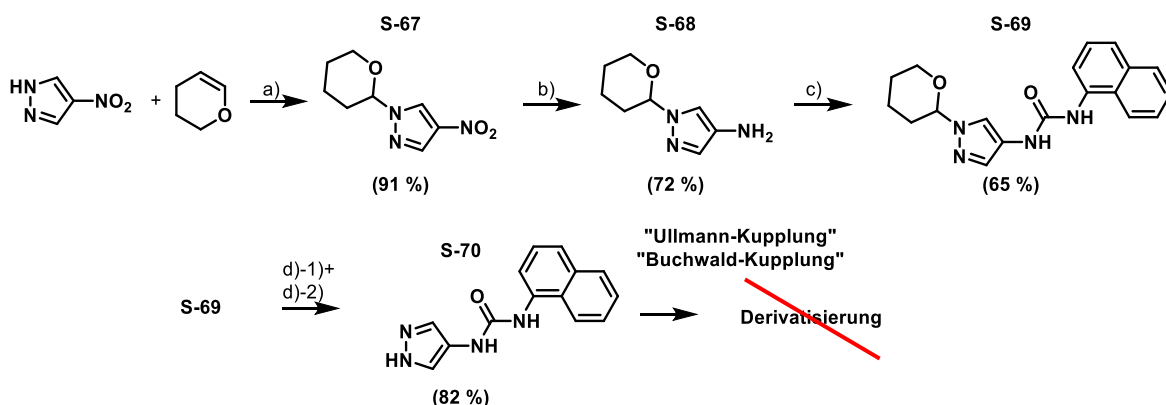


Schema 19: Synthese der Isonicotinamid-/ Picolinamid-Derivate. Reaktionsvorschriften hier exemplarisch für die Synthese von **P-65**, sowie a') für die Synthese für von BB **S-63** beschrieben: **a)** 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 6-Fluorpicolinsäure (1 eq.), Methansulfonsäure (5 eq.), Dioxan, Rückfluss (66 %); **a')** 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 2-Bromisonicotinsäure (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF, 95 °C (95 %); **b)** **S-60** (1 eq.), 40 % MeNH₂ (aq.) (3 eq.), CDI (1,25 eq.), THF, 50 °C-RT (54 %); **c)** **S-61** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (75 %); **d)** **S-62** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), THF (trocken), RT (26 %).

Die von Picolinsäure abgeleiteten Verbindung wurde nicht über eine Ullmann-Kupplung, sondern über eine säurekatalysierte S_NAr-Reaktion hergestellt (**S-60**; siehe Schema 19 Reaktion **a**)). Hierbei wurde Methansulfonsäure als starke Säure verwendet, um den Pyridinring partiell zu protonieren und die Picolinsäure damit elektronenarmer und S_NAr-reaktiver gegenüber dem nukleophil-angreifenden Pyrazol zu machen. Die restliche, in Schema 19 dargestellte Synthese, verlief bei beiden Strukturklassen analog zu den bisher gezeigten linearen Synthesen (siehe z.B. Schema 3).

3.5.5 Versuch einer orthogonalen Synthesestrategie

Da die meist lineare Syntheseroute mit einem gewissen Zeitaufwand verbunden war, wurden Versuche unternommen Derivatisierungen des aromatischen Zentrums und auch der HR-II-adressierenden Komponente orthogonal zu einem späteren Zeitpunkt („*late-stage*“) einzuführen. Hierbei wurde 4-Nitropyrazol initial unter saurer Katalyse von *p*-Toluolsulfonsäure mit einer Tetrahydropyranyl- (THP)-Schutzgruppe versehen (**a**)). Nach anschließender Hydrierung im Glasreaktor unter 7 bar H₂-Druck und Pd/C-Katalyse (**b**)), wurde über 1-Naphthylisocyanat der entsprechende Harnstoff eingeführt (**c**)). Die THP-Schutzgruppe wurde anschließend mit wässriger HCl entfernt (**d**)).

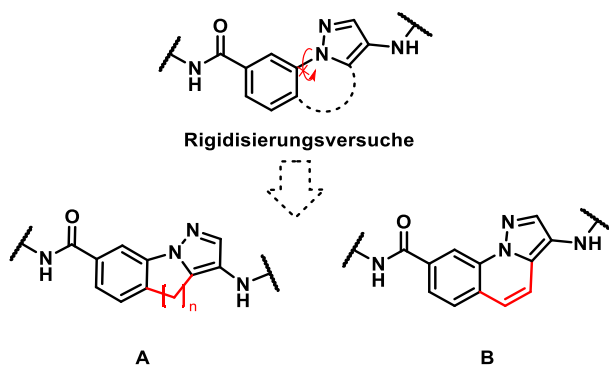


Schema 20: Gescheiterte Syntheseroute zur Derivatisierung des aromatischen Kerns/ HR-II-Motivs. Das Hingebindende Pyrazolmotiv konnte nach Aufbau der HR-I-adressierenden Komponente nicht mehr an eine Halogenbenzoesäure C-N-verknüpft werden. **a)** 4-Nitro-1H-pyrazol (1 eq.), 3,4-Dihydro-2H-pyran (3 eq.), *p*-Toluolsulfonsäure (Monohydrat) (0,05 eq.), THF (trocken), RT (91 %); **b)** **S-67** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave® Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,0015 eq.), EtOH, RT (72 %); **c)** **S-68** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM, RT (65 %); **d)-1)** **S-69** (1 eq.), konz. HCl (aq.), MeOH, RT (quant.); **d)-2)** 0,5 M NaOH (aq.), MeOH, RT (82 %).

Allerdings konnte das entstehende Produkt nicht weiter umgesetzt werden. Dies könnte daran gelegen haben, dass nicht **S-70** sondern initial das korrespondierende HCl-Salz isoliert wurde und mit diesem Produkt die ersten Versuche durchgeführt wurden. Doch auch die freie Base von **S-70** konnte weder über eine Ullmann-Kupplung, noch über eine Buchwald-Kupplung zum richtigen Produkt umgesetzt werden. Weitere Optimierung wäre nötig um **S-70** C-N zu verknüpfen.

3.6 Rigidisierung des 4-Aminopyrazol-Grundgerüsts

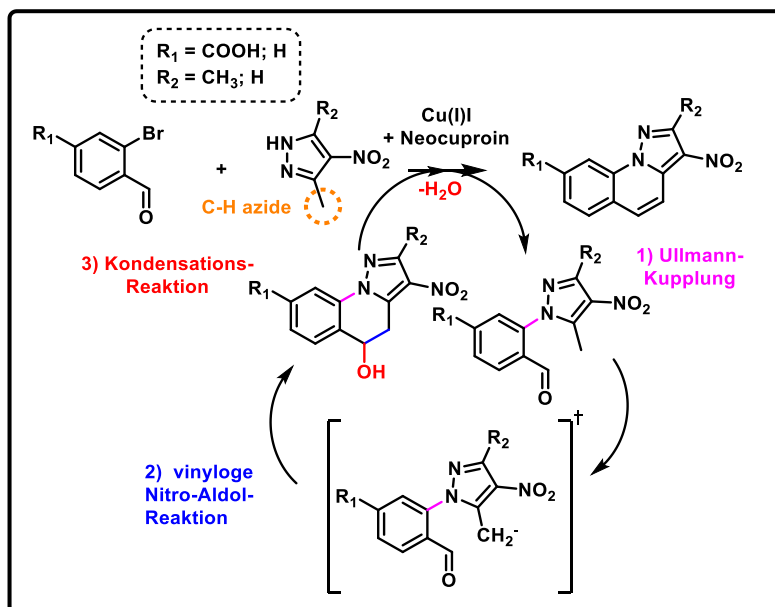
Als weiteren Ansatz wurde versucht, das *Hinge*-bindende Pyrazol zu fixieren und damit an seiner freien Drehbarkeit zu hindern. Um die Wasserstoffbrückenwechselwirkung des Pyrazolstickstoffes beibehalten zu können, ergaben sich zwei mögliche Ansätze die verfolgt werden konnten (siehe Schema 21; Ansatz A & B).



Schema 21: Rigidisierungsansätze für das Aminopyrazolgrundgerüst.

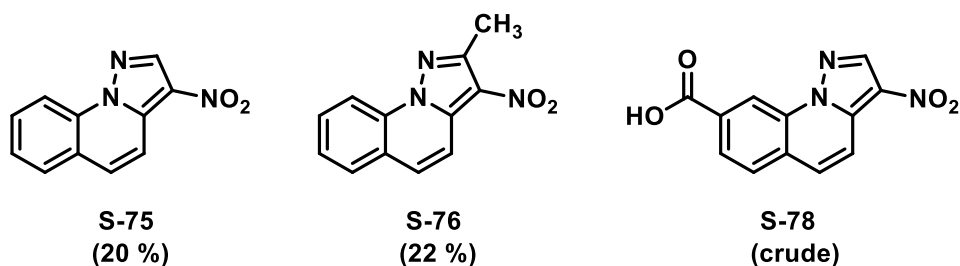
Die synthetische Zugänglichkeit beider Ansätze gestaltete sich jedoch als schwierig und aufgrund der veröffentlichten Studien von Obuleso et al., zur schnellen Zugänglichkeit und Synthese von Pyrazolo[1,5-*a*]chinolinen, wurde sich dazu entschlossen Ansatz B nachzugehen.¹⁶⁷ Die Synthese des rigidisierten Grundgerüsts verläuft wahrscheinlich

nach einer Kaskaden-, bzw. Tandemreaktion von einer initialen Ullmann-Kupplung ausgehend, über eine vinyloge Nitroaldolreaktion (Henry-Reaktion) zu einer schlussendlichen Kondensationsreaktion (siehe Schema 22) hin ab. Über diese Reaktionsabfolge können so folglich in einem Synthese-Schritt substituierte Pyrazolo[1,5-a]chinoline aus 2-Brombenzaldehyd-Derivaten und 3,5-alkylierten 4-Nitropyrazolen erhalten werden.



Schema 22: Möglicher Mechanismus für die Synthese von Pyrazolo[1,5-a]chinolinen nach Obuleso et al.¹⁶⁷

Diese Reaktion wurde nach bisheriger Kenntnis nur für di-alkylierte Pyrazole beschrieben. Versuche diese Reaktion mit mono-methyliertem Pyrazol durchzuführen waren ebenfalls erfolgreich. Es konnten wie in Schema 23 dargestellt, folgende *Building-Blocks* hergestellt werden:

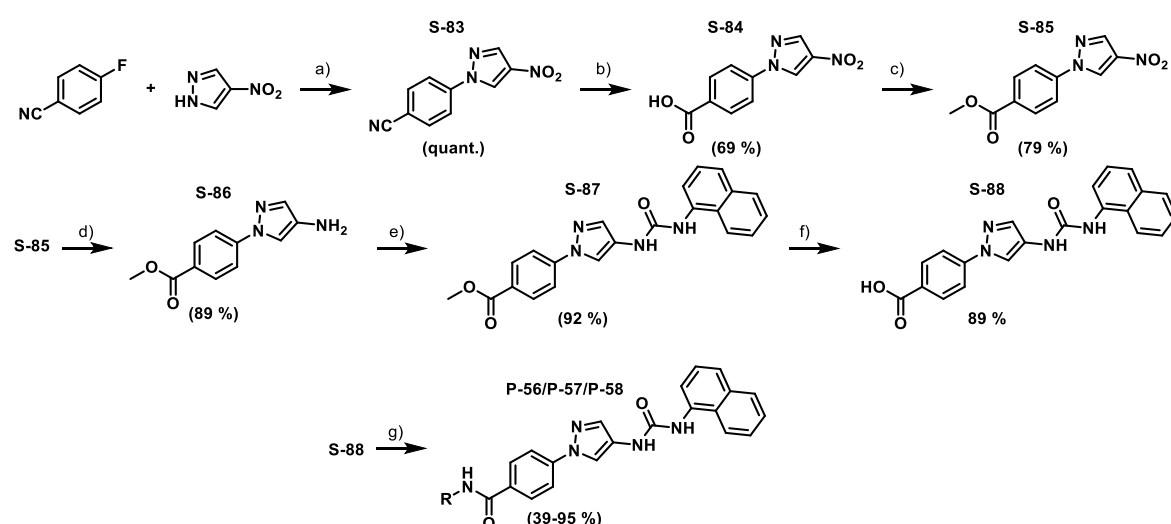


Schema 23: Produkte der in Schema 19 beschriebene Tandemreaktion zwischen *ortho*-Brombenzaldehyden und di-/ monomethylierten 4-Nitropyrazolen.¹⁶⁷ Allg. Reaktionsbedingungen: 3-Methyl-4-nitropyrazol (1 eq.), oder 3,5-Dimethyl-4-nitropyrazol (1 eq.), 2-Brombenzaldehyd (1 eq.), oder 3-Brom-4-formylbenzoesäure (1 eq.), K₂CO₃ (4 eq.), 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMSO, 120-125°C.

Die nachgeschalteten Syntheseschritte zur fertigen Testverbindung entsprechen denen der „Ester-Route“ (siehe Schema 43 + 44). Allerdings zeichnete sich diese Grundstruktur durch eine sehr schlechte Löslichkeit aus. Auch in DMSO konnte Endverbindung **P-22** nur in der Hitze gelöst werden. Ähnliche Probleme zeigten auch die Vorstufen.

3.7 Para-Substituierte Derivate

Ein Wechsel der westlichen Carbonyl-Komponenten von der *meta*- zur *para*-Stellung gegenüber dem *Hinge*-bindenden Pyrazol sollte untersucht werden. Auch wenn dieser Ansatz potentiell das Wegfallen einer *Hinge*-Interaktion zur Folge haben könnte, zeigte doch der Ansatz aus Kapitel 3.5.1, dass auch mit dem gänzlichen Entfernen der Carbonyl-Komponenten, selektive Inhibitoren generiert werden konnten.



Schema 24: Synthese der *para*-Derivate. Reaktionsvorschrift **g)** hier exemplarisch für die Synthese von **P-57** beschrieben: **a)** 4-Fluorbenzonitril (1 eq.), 4-Nitro-1H-pyrazol (1,1 eq.), K₂CO₃ (2,5 eq.), DMSO, 120 °C (quant.); **b)** **S-83** (1 eq.), konz. HCl (aq.), 85 °C -Reflux (69 %); **c)** **S-84** (1 eq.), H₂SO₄ (kat.), MeOH, Reflux (79 %); **d)** **S-85** (1 eq.), Fe(0) (10 eq.), NH₄Cl (10 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (89 %); **e)** **S-86** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM, RT (92 %); **f)** **S-87** (1 eq.), KOH (6 eq.), MeOH:THF:H₂O (10:10:1), 60 °C (89 %); **g)** **S-88** (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), HATU (1,5 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (95 %).

Wie in Tabelle 4-a dargestellt, konnte in einer Ullmann-artige Kupplungsreaktion von 4-Aminopyrazol mit *para*-Brombenzoesäure keine ausreichende Menge Produkt isoliert werden. Entsprechend wurde die Synthese des *Building-Blocks* **S-84** über einen Umweg realisiert. Über eine basenkatalysierte S_{NAr}-Reaktion zwischen *para*-Fluorbenzonitril und 4-Nitropyrazol in DMSO konnte **S-83** quantitativ isoliert werden (**a**). Mittels einer anschließenden wässrig-sauren Nitrilhydrolyse (**b**) konnte schlussendlich **S-84** isoliert werden. Ähnlich wie bei der „Ester“-Route der *meta*-Derivate wurde die generierte Benzoesäure zuerst in MeOH verestert (**c**). Die Nitropyrazol-Komponente wurde mittels Fe(0) als Elektronenquelle und NH₄Cl über eine Béchamp-Reduktion zum Pyrazolamin reduziert (**d**) und der Naphthylharnstoff wurde über das korrespondierende Isocyanat eingeführt (**e**). Nach Entschützung der Carbonsäure (**f**) konnten unterschiedliche Amide gebildet werden. Hierbei wurde *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) als Kupplungsreagenz eingesetzt, womit das schlecht lösliche Schlüsselintermediat **S-88** über 24 h voraktiviert wurde. Erst dann wurden die jeweiligen Amine zur Reaktion gegeben (**g**).

3.8 Einführung von bekannten Typ I ½ -Resten

Die Überlegungen Typ I ½-Reste einzuführen um isoform-selektive JNK2 Inhibitoren zu generieren, basierte sowohl auf einem alten Kinom-Screening eines Typ I ½ Inhibitors (**LN2258**), als auch auf einem weiteren, bisher noch nicht ausgenutzten Aminosäureunterschied zwischen JNK1/3 und JNK2 in der *Regulatory-Spine*.

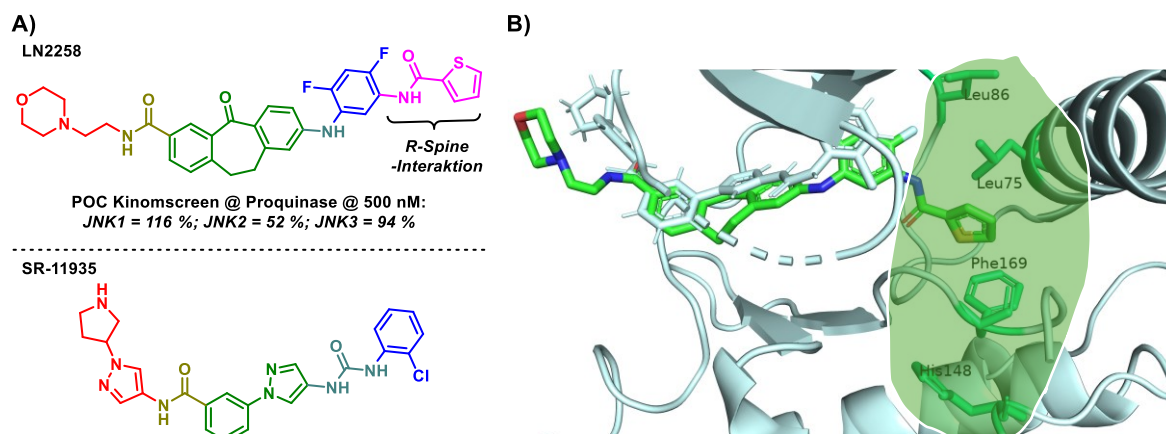


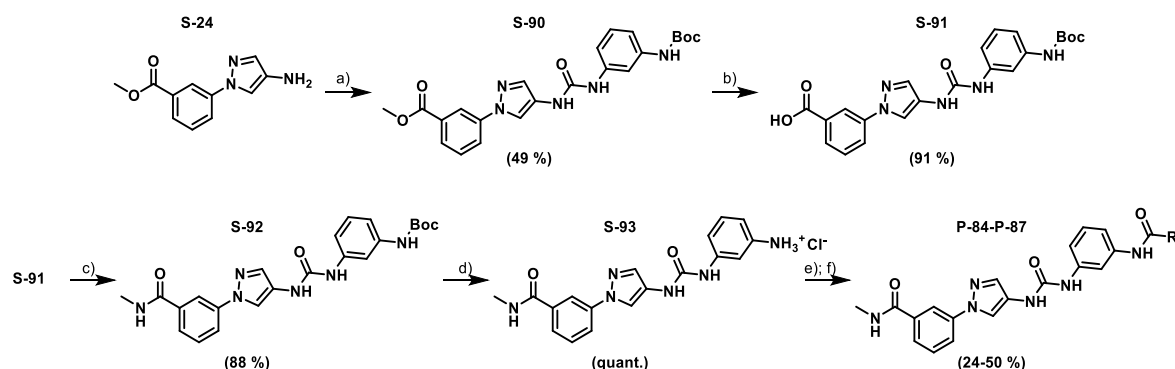
Abbildung 13: **A)** **LN2258** vom Inhibitor-Typ I ½ im Vergleich zum Referenzinhibitor **SR-11935**. **B)** *Overlay* von JNK3 und gebundenen Inhibitor **SR-11935** (PDB = 4WHZ) mit p38α kokristallisiert mit **LN2258** (PDB = 5TBE). Der *R-Spine*-interagierende Rest (Thiophen-2-amid) interagiert hierbei mit der *R-Spine* als Charakteristikum der Kinaseinhibitoren vom Typ I ½.¹⁶⁸

In einer publizierten Vorarbeit von Wentsch et al., welche ebenfalls aus dem Arbeitskreis von Prof. Laufer stammt, wurde ein Kinom-Screening von einem sog. Typ I ½ p38α-Kinaseinhibitor (**LN2258**) publiziert.¹⁶⁸ Der Bindungsmodus von Typ I ½ Kinaseinhibitoren befinden sich zwischen den Typ I und den Typ II Inhibitoren.⁵² Sie binden in die ATP-Bindetasche von phosphorylierten und damit aktiven Kinasen wie Inhibitoren vom Typ I. Hierbei zeigt der aus Asparagin-Phenylalanin-Glycin bestehende *DFG-Loop* nach innen (*DFG-in*-Konformation) in die Bindetasche, wodurch die *R-Spine* meist aufgebaut ist.^{32, 104} Welche *DFG*-Konformation vorliegt ist erkenntlich durch die Richtung in die der aromatische Rest des Phenylalanins zeigt.^{44, 45} Im Gegensatz zu Typ I Inhibitoren binden Typ II Inhibitoren an inaktive Kinasen und besetzten dort die *Deep-pocket*.^{43, 106} Inaktive Kinasen weisen eine *DFG-out* Konformation auf.⁴³ Die *Deep-pocket* ist nur bei inaktiven Kinasen zugänglich und befindet sich hinter der *R-Spine*.¹⁰⁶ Typ I ½ Inhibitoren binden zwar an aktive Kinasen, interagieren jedoch wie beispielsweise **LN2258** mit der *R-Spine*.^{52, 168}

Der publizierte Selektivitätsscreen von **LN2258** zeigte bei einer Konzentration von 500 nM nicht nur die gewünschte, selektive Inhibition von p38α/ p38β sondern bei den mitgetesteten JNK-Isoformen auch eine leichte Tendenz zu einer selektiven JNK2 Inhibition (JNK2 = 52 *Percentage of Control (POC)*, siehe Abbildung **13A**).¹⁶⁸ Auch wenn eine *POC* von ca. 50 % eine eher schwache Hemmung darstellt, wird dieser Effekt auch über einen strukturellen Unterschied zwischen JNK1/3 und JNK2 erklärbar. Anders als bei JNK1/3 enthält die JNK2,

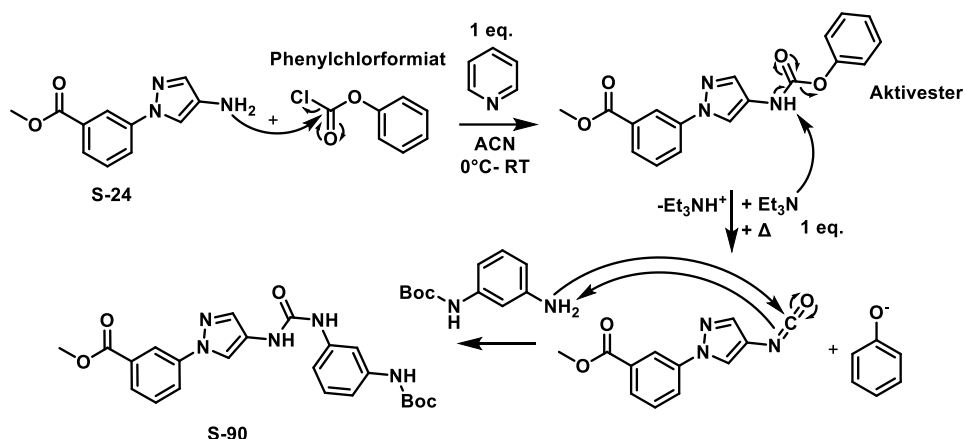
genauso wie die strukturell sehr ähnliche Schwesterkinase p38 α in der *R-Spine*-Region ein Leucin (Leu75 bei p38 α , Leu77 bei JNK2) anstatt einem Methionin (Met77 bei JNK1, Met115 bei JNK3). Hierdurch ist sterisch mehr Platz für einen *R-Spine* interagierenden Rest bei JNK2 als bei JNK1/3. Das Übereinanderlegen von **LN2258** gebunden an p38 α und **SR-11935** gebunden an JNK3 führte zudem zu Überlappungen (siehe Abbildung **13B**).

Entsprechend wurde versucht Typ I $\frac{1}{2}$ interagierende Reste, welche an dem Benzosuberon-Grundgerüst wie in Abbildung **13** dargestellt (**LN2258**) bereits etabliert wurden, auf das Aminopyrazol-Grundgerüst zu übertragen.^{168, 169} Hierzu wurde die Synthese wie in Schema **25** dargestellt etabliert.



Schema 25: Synthese von potentiellen Typ I $\frac{1}{2}$ -JNK-inhibitoren. Reaktionsvorschrift **e** hier exemplarisch für die Synthese von **P-85** und Reaktion **f** für **P-87** beschrieben: **a**) **S-24** (1 eq.), *tert*-Butyl(3-aminophenyl)carbamate (1 eq.), Phenylchlorformiat (1 eq.), Pyridin (1 eq.), DIPEA (2 eq.), ACN (trocken) 0 °C -50 °C (49 %); **b**) **S-90** (1 eq.), 1 M LiOH (10 eq.), MeOH:THF:H₂O (2:2:1), RT (91 %); **c**) **S-91** (1 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (88 %); **d**) **S-92** (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH), EtOH, 60 °C (quant.); **e**) **S-93** (1 eq.), Cyclopropanecarbonylchlorid (1 eq.), Pyridin (trocken), 0 °C – RT (50 %); **f**) **S-93** (1 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (5 eq.), 3-Thiophenecarbonsäure (2 eq.), DMF (trocken), RT (35 %).

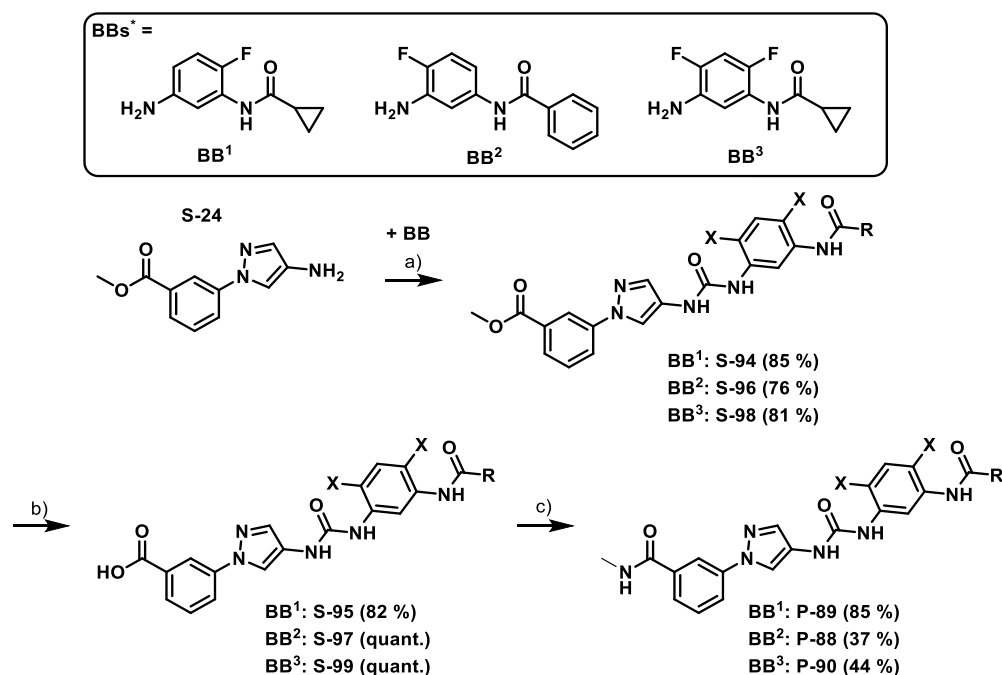
Der für die „Ester-Route“ (siehe Schema **12**) bereits synthetisierte *Building-Block* **S-24** wurde hierbei in einem ersten Schritt, mittels einer abgewandelten Methode von Kitteringham et al. mit *tert*-Butyl(3-aminophenyl)carbamate über eine Harnstoff-Funktion verknüpft (**a**).¹⁷⁰ Bei dieser Methode kommen keine toxischen Phosgen-Äquivalente zum Einsatz, die standardmäßig zum Herstellen von Harnstofffunktionen genutzt werden. Stattdessen wird intermediär, durch den Einsatz von Phenylchlorformiat und einem Äquivalent schwacher Base (Pyridin) bei niedrigen Temperaturen, das Phenylcarbamate gebildet. Nach vollständiger Umsetzung wird ein weiteres Äquivalent stärkerer Base (TEA), sowie das zu kuppelnde Anilin zugesetzt und die Temperatur erhöht. Durch Deprotonierung des Phenylcarbamats entsteht *in situ* das entsprechende Isocyanat, welches wiederum den Harnstoff mit dem zugesetzten Anilin ausbildet.¹⁷¹ Ein plausibler Mechanismus hierfür ist wie folgend dargestellt (Schema **26**):



Schema 26: Plausibler Mechanismus für die Synthese von unsymmetrischen Harnstoffen und Bildung des Phenylaktivesters mittels Phenylchlorformiat. Schema abgeleitet aus den Studien von Ramteke et al.¹⁷¹

Das genaue Reaktions-/ Temperaturmonitoring und die richtige Reihenfolge der Basen, ist für die Reinheit der Umsetzung dieser Reaktion unerlässlich. Wird wie von Kitteringham et al. beschrieben, im ersten Schritt bereits TEA verwendet, so kommt es zu einer unsaubereren Umsetzung.¹⁷⁰ Nach dem Einführen der Harnstofffunktion, wurde der Ester mittels LiOH bei Raumtemperatur gespalten (**b**). Die entstandenen Carbonsäure **S-91** wurde wiederum mit HATU aktiviert und mit wässriger Methylamin-Lösung versetzt um das entsprechende Methylamid-Derivat zu generieren (**c**). Die Boc-Schutzgruppe wurde mittels ethanolischer HCl entfernt (**d**) und das entstehende Anilin wurde entweder unter Zuhilfenahme der entsprechenden Säurechloride in Pyridin (**e**), oder mittels HATU-aktivierter Carbonsäure (**f**) zu den gewünschten Amidien umgesetzt.

Wie in Schema **27** dargestellt, wurden fluorierte *Linker*, welche mit den potentiell *R-Spine* interagierenden Motiven bereits verknüpft waren, direkt eingeführt.



Schema 27: Synthese von potentiellen Typ I $\frac{1}{2}$ -JNK-Inhibitoren mit fluorierten *Linkern*. Reaktionsvorschriften hier exemplarisch für die Synthese von **P-89** beschrieben: **a)** **S-24** (1 eq.), *N*-(5-Amino-2-fluorphenyl)cyclopropancarbamid (1 eq.), Phenylchlorformiat (1 eq.), Pyridin (1 eq.), DIPEA (2 eq.), ACN 0°C-55 °C (51 %); **b)** **S-94** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (6 eq.), MeOH:THF:H₂O (10:10:1), RT (82 %); **c)** **S-95** (1 eq.), 40 % MeNH₂ (aq.) (5 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (85 %).

Die Synthese hierfür ist analog der in Schema **25** beschriebenen Synthese durchführbar. Die einzelnen Building-Blocks stammen aus Restbeständen der Arbeitsgruppe Laufer (BB¹ stammte von Philipp Nahidino; BB² stammte von Larissa Pünnel; BB³ stammte von Raphael Ditzinger).

3.9 Adressieren von His120 über JNK-IN-8-Derivate

Auf der Suche nach weiteren Ansätzen, wie eine selektive Hemmung der JNK2-Isoform gelingen könnte, wurde untersucht, ob weitere Aminosäure-Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen adressierbar seien. Ein vielversprechender Ansatzpunkt war hierbei der Austausch von Glu158(JNK3) bzw. Glu120(JNK1) zu His120(JNK2), welcher sich jedoch außerhalb der orthosterische Bindetasche befindet. Da Histidin eine schwach basische Aminosäure darstellt, wurde versucht über das Ausbilden von Salzbrücken zwischen Inhibitor und His120, ein selektive JNK2-Bindung zu generieren. Als Ausgangspunkt diente hierbei ein weiteres *Scaffold*, welches initial als kovalente Inhibitor-Klasse publiziert wurde (siehe Abb. **14A**).¹¹⁸ Mit dem Austausch des kovalenten Motivs hin zu sauren Funktionalitäten und der Wechsel von *meta*- zu *para*- Derivaten, wurde ausgetestet, ob eine Erhöhung der Selektivität über die Adressierung des His120 via einer spezifischen Salzbrücke möglich ist.

Nach dem Übereinanderlegen der beiden Kristallstrukturen PDB = 3V6S (JNK3 kokristallisiert mit **JNK-IN-7**) und PDB = 7N8T (JNK2 kokristallisiert mit AMP) konnte abgeschätzt werden, dass ein Abstand von 7-8 Å überwunden werden müsste, um das Histidin adressieren zu können, wobei die Bindungslänge der eigentlichen Salzbrücke dazugezählt werden muss (siehe Abb. **14B**).

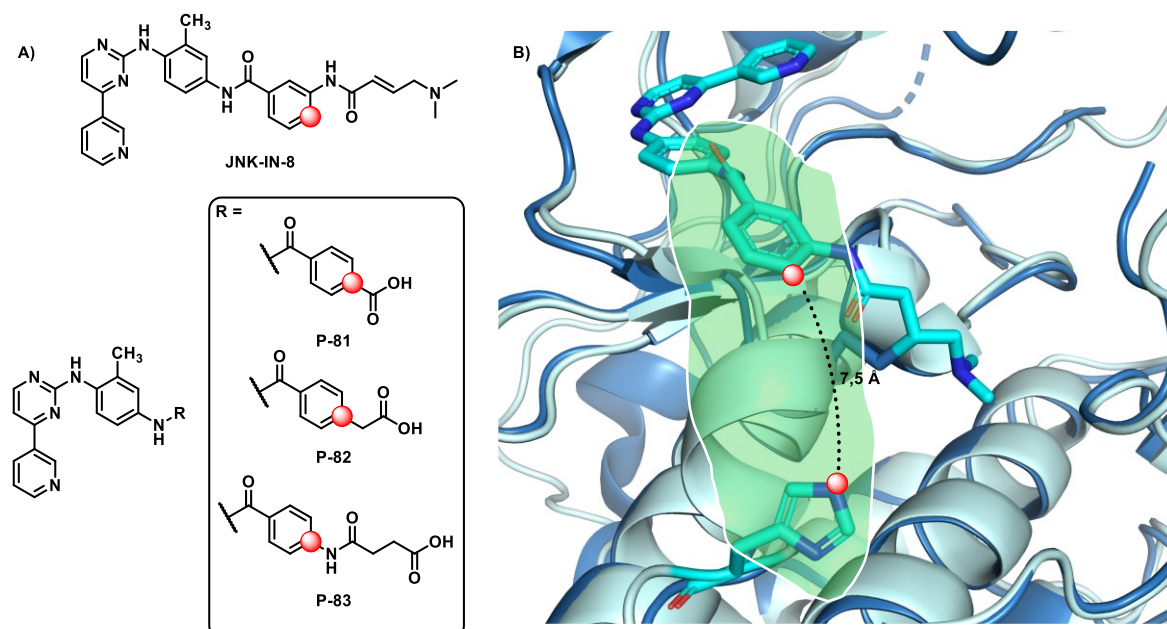
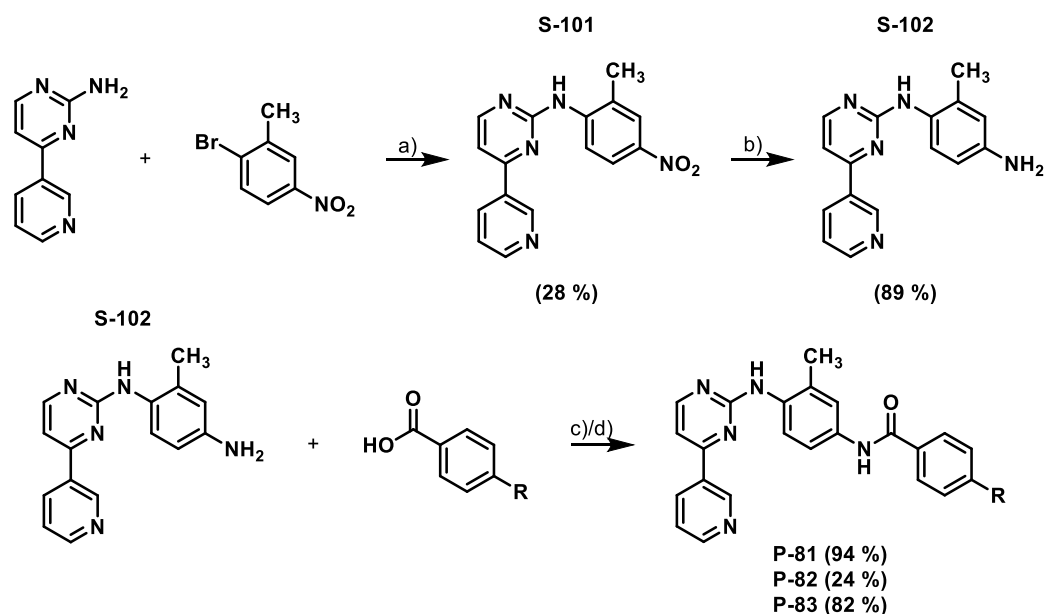


Abbildung 14: Adressierung von His120 durch eine Salzbrücke. **A)** Synthetisierte Derivate mit Imatinib-artigem Grundgerüst abgeleitet von **JNK-IN-8**. **B)** Derivat von **JNK-IN-8**, Inhibitor **JNK-IN-7** kokristallisiert in JNK3 (PDB = 3V6S). Das über einen roten Kreis markierte Schweratom besitzt in der aufgenommenen Kristallstruktur einen Abstand zu der zu adressierenden AS, His120, von ca. 7,5 Å.

Analog einer Imatinib-Synthese von Liu et al., wurde im ersten Schritt über eine Ullmann-artige Kupplungsreaktion mit *N,N'*-Dimethylethylendiamin als Ligand, 4-Phenylpyrimidin-2-amin an 1-Brom-2-methyl-4-nitrobenzen gekuppelt um Verbindung **S-101** zu erhalten (**a**).¹⁷² Direkt im darauffolgenden Schritt **b**), wurde angelehnt an Zimmermann et al. die Nitrofunktion nicht wie bei Liu mittels Hydrazin und FeCl₃ reduziert, sondern im Glasreaktor zur Anilinstufe (**S-102**) hydriert.¹⁷³ Folgende Amidkupplung der einfach Methylester-geschützten Disäuren erfolgte unter Standardbedingungen mittels EDC·HCl und HOBt (**c**). Die finalen Testverbindungen wurde durch die Entschützung mittels LiOH bei RT generiert (**d**).

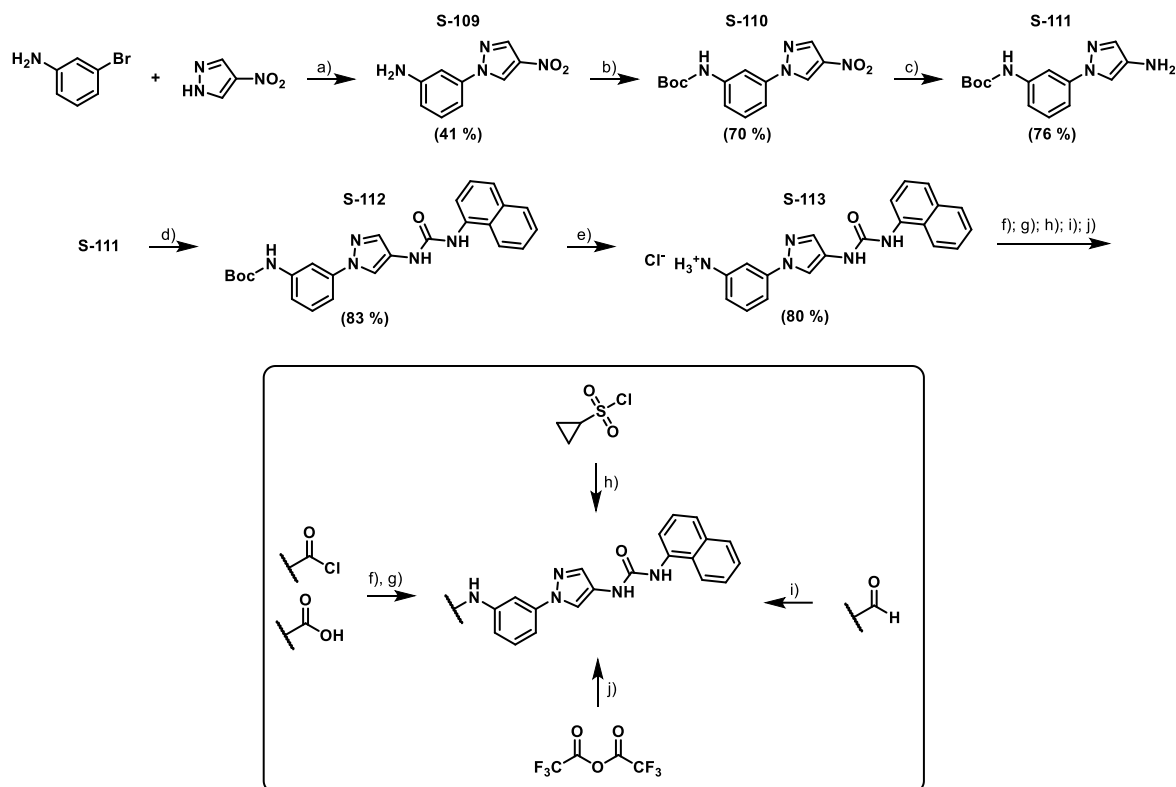


Schema 28: Modifizierte Synthese der Imatinib-artigen Derivate nach Liu und Zimmermann et al.^{172, 173} Rest R ist in Abb. 14 definiert. Reaktionsvorschriften **c** & **d**) hier exemplarisch für die Synthese von **P-81** beschrieben: **a**) 1-Brom-2-methyl-4-nitrobenzen (1 eq.), 4-(Pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (1,1 eq.), K₂CO₃ (2 eq.), Cu(I)I (0,25 eq.), (90 %) *N,N'*-Dimethylethylendiamin (0,25 eq.), Dioxan, 100 °C (28 %); **b**) **S-101** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave® Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,05 eq.), EtOAc, 50 °C (89 %); **c**) **S-102** (1 eq.), 4-(Methoxycarbonyl)benzoesäure (1 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken) (42 %); **d**) **S-105** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (5 eq.), MeOH:H₂O:THF (2:2:1), RT (94 %).

3.10 Invertieren der westlichen Amid-Einheit

Da in diversen Kristallstrukturen die Beteiligung des westlichen Amidmotivs an der *Hinge*-Bindung über eine Wasserstoffbrücken-Donatorfunktion des Amind-NHs zum Aminosäurerückgrad von Met149(JNK3)/ Met111(JNK1/2) ersichtlich war (siehe PDB = 4WHZ) wurde diese Funktion weiter untersucht und u.a. invertiert.

Hierzu musste eine neue Synthese nach Schema **29** etabliert werden.



Schema 29: Syntheschema für die Herstellung von invertierten Anilinen, Amiden etc. Reaktionsvorschrift **f** hier exemplarisch für die Synthese von **P-73**, **g**) für **P-75**, **h**) für **P-71**, **i**) für **P-69** und **j**) für **P-74** beschrieben: **a**) 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 3-Bromanilin (1,2 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), $Cu(I)I$ (0,1 eq.), DMF, 100 °C (41 %); **b**) **S-109** (1 eq.), Di-*tert*-butyldicarbonat (1 eq.), *t*-BuOH, 40-50 °C (70 %); **c**) **S-110** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH_4Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (3:1), 60 °C (76 %); **d**) **S-111** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (83 %); **e**) **S-112** (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (5 eq.), EtOH, 50-60 °C (80 %); **f**) **S-113** (1 eq.), Acetylchlorid (1 eq.), Pyridin (trocken), 0 °C-RT (60 %); **g**) **S-113** (1 eq.), Pyrrol-3-carbonsäure (1 eq.), HATU (1,25 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (6 %); **h**) **S-113** (1 eq.), Cyclopropansulfonylchlorid (1 eq.), THF:Pyridin (2:1), RT (20 %); **i**) **S-113** (1 eq.), Isonicotinaldehyd (1,05 eq.), $NaCNBH_3$ (1,5 eq.), MeOH (gepuffert auf pH 5 mit AcOH/AcONa) RT (74 %); **j**) **S-113** (1 eq.), Trifluoressigsäureanhydrid (1,2 eq.), TEA (2 eq.), THF (trocken), RT (37 %).

Analog zu den entsprechenden Benzoesäure-Derivaten konnte Intermediat **S-109** über eine Ullmann-artige Kupplungsreaktion (siehe Tabelle **4b**) hergestellt werden. Um eine orthogonale Synthese zu ermöglichen, wurde **S-109** in *t*-BuOH als Lösemittel einfach Boc-geschützt (**b**). Der Harnstoff wurde wiederum, nach Reduktion der Boc-geschützten Nitroverbindung (**S-110**, Reaktion **c**) via 1-Naphthylisocyanat eingeführt (**d**)), wonach das entstehende Produkt wieder mit ethanolischer HCl entschützt wurde (**e**). Dieses Schlüsselintermediat **S-113** konnte nun durch unterschiedlichste Reaktionen (Siehe Schema **29**) derivatisiert werden. Hierzu zählten:

- f**) Amidkupplungen mittels Carbonsäurechloriden in Pyridin.
- g**) Amidkupplungen mittels HATU und DIPEA.
- h**) Kupplung von Cyclopropylsulfonylchlorid in THF:Pyridin (2:1).
- i**) Reduktive Aminierungen mit Aldehyden und $NaCNBH_3$ zu sekundären Aminen.
- j**) Einführen einer 2,2,2-Trifluoroacetyl-Gruppe mittels 2,2,2-Trifluoroessigsäureanhydrid und TEA-Zusatz.

3.10.1 Einführen von kovalenten Warheads

Wie schon von Muth et al. mit Inhibitor **LN2332** gezeigt (siehe Abb. 15), konnten Pyridinylimidazol-basierte, reversible JNK3 Inhibitoren durch das Anbringen eines 3-Aminobenzamidlinkers und eines kovalent-bindenden, elektrophilen Acrylamid-Warheads in kovalente Inhibitoren umgewandelt werden.¹³⁵ Ursprünglich stammte dieses *Linker-Warhead*-Kombi-Motiv und dieser Ansatz von der bereits erwähnten pan-JNK-selektiven, *high-quality chemical probe* **JNK-IN-8** bzw. dessen in JNK3 kokristallisierten Derivats **JNK-IN-7** (siehe Abb. 15; PDB = 3V6S).¹¹⁸ Dieses Motiv sollte nun auch auf das Aminopyrazol-basierte, invertierte Amid-Grundgerüst des JNK2/3-selektiven Inhibitors **P-73** übertragen werden.

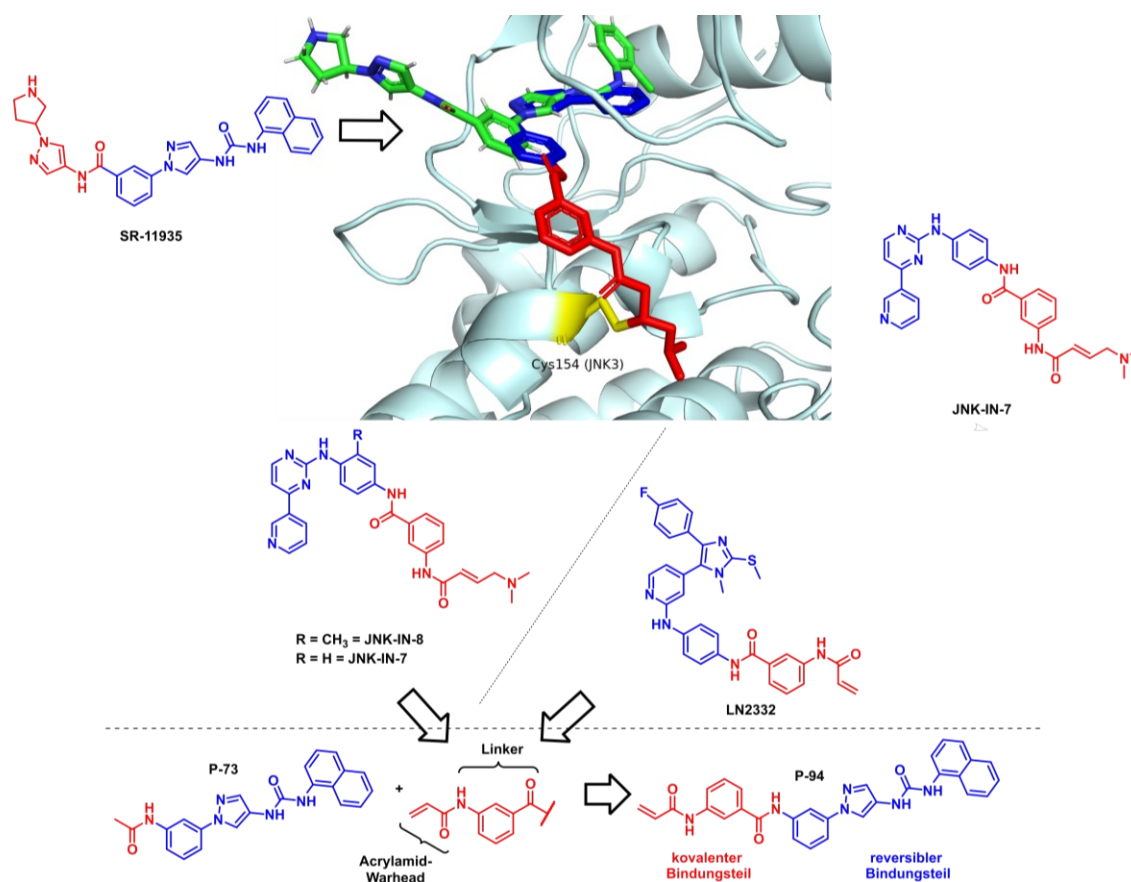
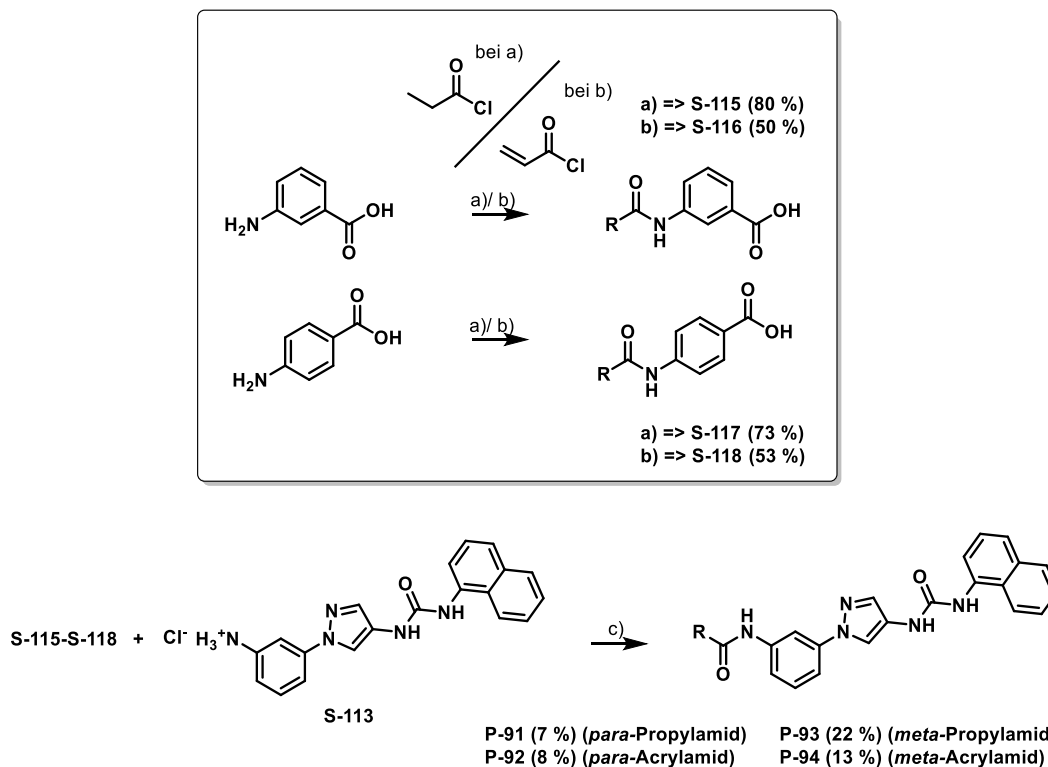


Abbildung 15: Einführen eines potentiell kovalent bindenden Strukturelements. *Overlay* zweier Kristallstrukturen von JNK3, einmal kokristallisiert mit **JNK-IN-7** (PDB = 3V6S) und einmal kokristallisiert mit **SR-11935** (PDB = 4WHZ). Diese Abbildung ist abgewandelt von Abbildung 4 einer bereits publiziert Arbeit (Wydra et al.).¹¹⁶

Es wurden hierzu vier Derivate nach Synthese-Schema **30** synthetisiert. Die benötigten *meta*- und *para*- Acrylamid-, sowie Propylamid-verknüpften *Linker*-Synthesebausteine **S-115-118** wurden über Amidkupplungen mit Propionsäurechlorid in Pyridin (**a**)), bzw. Acrylsäurechlorid in DMF mit Pyridin-Zusatz (**b**) und den jeweiligen Aminobenzoesäure-Derivaten generiert (**a/ b**). Die fertigen *Linker* wurden wiederum via HATU an **S-113** kondensiert (**c**).



Schema 30: Synthese von potentiell kovalent-bindenden JNK2/3 Inhibitoren, basierend auf dem Aminopyrazol-Grundgerüst und ihrer Propylamid-Äquivalenten. Reaktionsvorschriften **a**) & **c**) sind hier exemplarisch für die Synthese von **P-92** beschrieben, sowie Reaktionsvorschrift **b**) für die Synthese von **S-117**: **a**) 4-Aminobenzoesäure (1 eq.), Acryloylchlorid (1 eq.), Pyridin (0,85 eq.), DMF (trocken), -10 °C- RT (57 %); **b**) 4-Aminobenzoesäure (1 eq.), Propionylchlorid (1 eq.), Pyridin, -10 °C.- RT (73 %); **c**) **S-118** (1 eq.), **S-113** (1 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (5 eq.), DMF (trocken), RT (8 %).

4 Biologische Testverfahren

Im Zuge dieser Arbeit wurden die entwickelten JNK-Inhibitoren durch unterschiedliche Assay-Systeme analysiert und evaluiert. Standardmäßig wurde die Testung kommerziell bei verschiedenen Dienstleistern bzw. *Contact Research Organizations* (CROs) im Auftrag durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

Im Folgenden sollen die einzelnen Testsysteme näher beschrieben werden.

4.1 ^{33}P PanQinaseTM – Assay (Reaction Biology)

Wie in der Aufgabenstellung in Abb. 6 schematisch dargestellt, wurden alle synthetisierten Endverbindungen (außer **P-22** aufgrund zu schlechter Löslichkeit in DMSO) initial über den kommerziellen ^{33}P PanQinaseTM – Assay (Reaction Biology Europe GmbH, Freiburg i Br., DE) auf Ihre Aktivität hin gegenüber allen drei JNK-Isoformen überprüft. Die Ergebnisse dieser Testung stellten die Grundlage für die Auswahl der jeweiligen Inhibitoren für weitere Evaluation und Testung dar.

Es handelt sich bei der ^{33}P PanQinase-Plattform um einen radiometrischen Assay.¹⁷⁴ Auf einer 96-well-ScintiPlate (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) wird hierbei Puffer vorgelegt. Folgend wird pro Napf 10 % DMSO-Lösung mit zu testender Substanz sowie das Substrat (ATF2), dann die rekombinante Kinase und schlussendlich ATP (Endkonzentration entspricht dem scheinbaren (apparenten) K_m -Wert der jeweiligen Kinase) zugegeben, sowie das radiogelabelte ^{33}P - γ -ATP. Die Proteine (Kinase sowie ATF2) binden hierbei an die Plattenoberfläche. Die durchmischten Konditionen werden nun 60 min bei 30 °C inkubiert. Nach den 60 min. wird die Reaktion mit 2 % H_3PO_4 gestoppt und die Nüpfen werden erschöpfend ausgewaschen.¹⁷⁵ Ohne Inhibitorzugabe kommt es zu folgender enzymatisch katalysierten Reaktion:

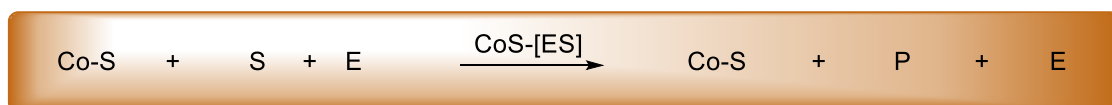
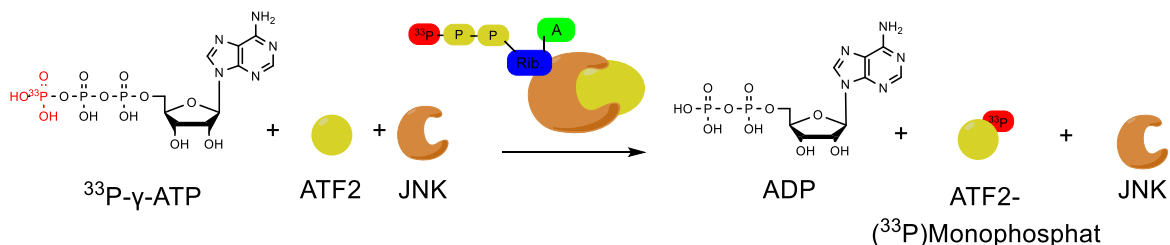


Abbildung 16: Enzym-Substrat-Reaktion des ^{33}P PanQinase-Assays. Illustration abgeleitet aus dem Durchführungsprotokoll des PanQinase-Assay, sowie den allgemeinen Beschreibungen von Adams et al.^{19, 175}

Die auf der Platte fixierten ^{33}P -ATF2 -Moleküle geben nun ionisierende Strahlung ab. Hierdurch wird ein Szintillator, mit dem die *well*-Platten beschichtet sind, angeregt und das ausgehende Signal kann über einen Scintillationszähler quantitativ detektiert werden.¹⁷⁴ Inhibitoren verhindern diese enzymatisch katalysierte Umsetzung und verringern dadurch das detektierte Signal.

Für die einzelnen Isoformen wurden leicht unterschiedliche Konzentrationen an Kinase, Substrat und ATP verwendet. Die jeweilige ATP-Konzentration entspricht der apparenten ATP-K_m-Konzentration der entsprechenden Kinase. Dies führt zu einer besseren Vergleichbarkeit der Inhibition zwischen unterschiedlichen Kinasen, welche unterschiedliche Affinitäten zu ATP und zum Substrat aufweisen bzw. unterschiedlich effektiv ATP umsetzen. Die Inhibition einer effektiveren Kinase wird dadurch bei einer geringeren ATP-Konzentration vermessen und wird so vergleichbar mit den Inhibitionswerten einer weniger stark ATP-umsetzenden Kinase.¹⁷⁶

Tabelle 5: Jeweilige End-Konzentrationen von Kinase/ ATP und Substrat im ^{33}P anQinase-Assay der einzelnen Isoformen

Kinase	Kinase-Konz. [nM]	ATP-Konz. [μM]	Substrat-Konz. [μg/50μL]
JNK1	2,3	0,3	0,25
JNK2	2,0	1,0	1,0
JNK3	2,1	0,3	2,0

4.2 PhosphoSens – Assay (AssayQuant)

Die hergestellten, kovalenten Inhibitoren wurden über die PhosphoSens CSox-Sensor Plattform von AssayQuant Technologies Inc. (Marlborough, MA, USA) evaluiert. Hierbei wurde zum einen die Zeitabhängigkeit der potentiell kovalenten Inhibition untersucht, die sogenannte *time-dependent inhibition* (TDI), als auch die Enzyminaktivierungsrate ($k_{\text{inact}}/K_{\text{i}}$) bestimmt. Dieser Assay nutzt im Gegensatz zur Testung von Reaction Biology kein natives Substrat der jeweiligen JNKs sondern ein eigens dafür designtes Sensor-Substrat welches Erkennungs-/ Phosphorylierungsstellen für die JNKs enthält, als auch ein Sulfonamido-oxin (Sox) Fluorophor. Kommt es zu einer Phosphorylierung des Substrates durch die entsprechende Kinase an der Erkennungsstelle, bildet die Sulfonamido-oxin-Gruppe mit im Assay-Puffer enthaltenen Mg^{2+} -Ionen und dem nun installierten Phosphat, einen Komplex, welcher durch UV-Strahlung (360 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden kann (485-505 nm, siehe Abbildung 17).¹⁷⁷

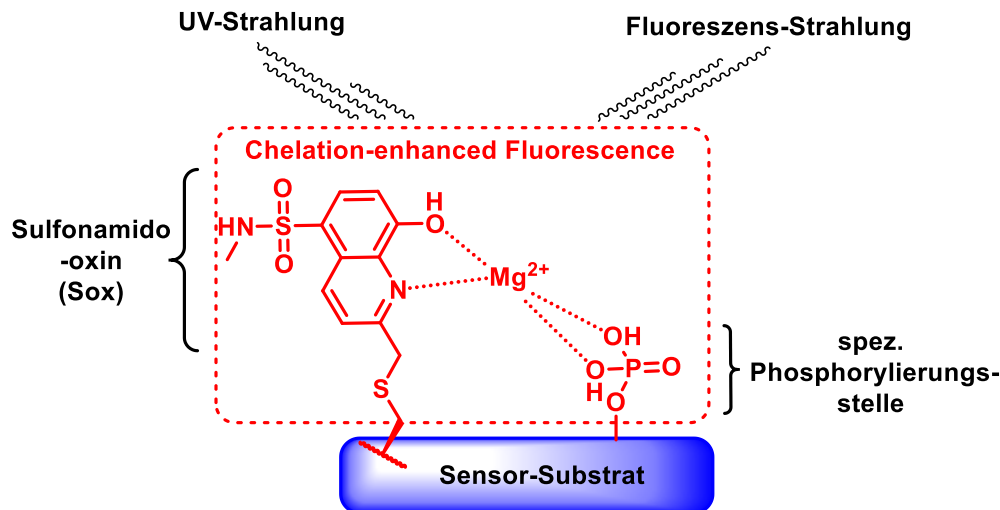


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines phosphorylierten CSox-Peptids, welches über UV-Strahlung angeregt werden kann. Abbildung abgewandelt von Lucović et al.¹⁷⁸

Als weiteren Unterschied zum ³³PanQinase-Assay handelt es sich hierbei um einen kontinuierlichen Assay. Bei kontinuierlichen Assays werden Datenpunkte über einen gewissen Zeitraum erhoben. Sie stehen im Gegensatz zu Endpunktbestimmungen, bei denen ab einem gewissen Endpunkt erst Daten erhoben werden.¹⁷⁹

4.2.1 TDI-Bestimmung

Die Zeitabhängigkeit der Inhibition ist ein zentrales Charakteristikum von kovalent bindenden Inhibitoren und muss nachgewiesen werden um eine kovalente Hemmwirkung sicher bestätigen zu können. Um die TDI nachzuweisen, wurden von den jeweiligen kovalenten Inhibitoren, für jede Isoform, jeweils zwei IC₅₀, bzw. K_i-Werte bestimmt, einmal mit und einmal ohne 60 min. Präinkubation. Eine TDI ist bewiesen, wenn es zu einem signifikanten Unterschied zwischen den erhaltenen Aktivitäten mit und ohne Präinkubation kommt.

4.2.2 Bestimmung der Enzyminaktivierungseffizienz (k_{inact}/K_i)

Die Enzyminaktivierungseffizienz (k_{inact}/K_i) ist ein Parameter der bei echten, irreversibel-kovalent bindenden Inhibitoren als Maß für die Aktivität besser geeignet ist als die Charakterisierung über IC₅₀- oder K_i-Werte.¹⁸⁰ Die Bindung von reversiblen Inhibitoren lässt sich alleine mit den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} beschreiben. Der entsprechende Quotient ergibt die Inhibitionskonstanten K_i.¹⁸¹

$$K_i = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[E] * [I]}{[EI]}$$

Bei kovalent-irreversiblen Inhibitoren kommt es jedoch nach einer anfänglich reversiblen Bindung zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der Zielstruktur und einer an dem Inhibitor befindlichen reaktiven Gruppe, im Normalfall eines Elektrophils wie einem

α,β -ungesättigten Carbonyls oder Acrylamids (sog. *Warhead*, siehe Abbildung 18). Entsprechend muss, um die Aktivität zu beschreiben, noch die Geschwindigkeitskonstante des kovalenten Bindungsanteils (k_{inact}) in die Gleichung miteinfließen. Entsprechend ergibt sich:¹⁸¹

$$K_I = \frac{k_{off} + k_{inact}}{k_{on}}$$

Allerdings ist K_I genauso wie K_i lediglich eine Konstante (K_I = Inaktivierungskonstante vs K_i = Inhibitionskonstante). Sie beschreibt die Inhibitor-Konzentration $[I]$ bei $\frac{1}{2} k_{inact}$. Die Abhängigkeit der kovalenten Bindungsknüpfung von der Zeit lässt sich entsprechend wie folgt ausdrücken:¹⁸¹

$$\frac{k_{inact}}{K_I} = \frac{k_{on} * k_{inact}}{k_{off} + k_{inact}}$$

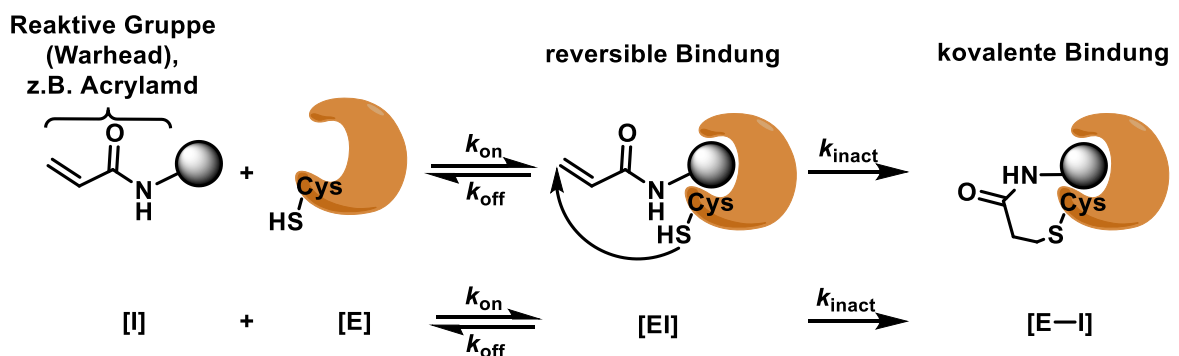


Abbildung 18: Kinetik eines kovalent-irreversiblen Inhibitors. Abbildung abgewandelt nach Heppner et al.¹⁸¹

Um die Enzyminaktivierungseffizienz nun zu bestimmen, wurden 24 Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren kontinuierlich über 3 h im PhosphoSens-Assay vermessen. Aus den entsprechenden Dosis-Wirkungs-Verlaufskurven wurden über ein zweistufiges Global-Fit-Rechenmodell die Einzelparameter k_{inact} und K_I unabhängig voneinander bestimmt. Mit den so bestimmten Parametern kann über folgende Gleichung der k_{obs} zurückgerechnet werden:

$$k_{obs} = \frac{k_{inact}}{1 + \frac{K_I}{[I]}} \text{ (vereinfacht)} = \frac{k_{inact} * 60 * [I]}{[I] + K_I * 10^9 * \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)} \text{ (mit Korrekturen)}$$

[S] = Konzentration des Sensor-Substrats. (μM)

[I] = Konzentration des Inhibitors. (nM)

K_m = Michaelis-Menten Konstante des Sensor-Substrats. (μM)

die zu beobachtende Geschwindigkeitskonstante der Umsetzung,

k_{obs} = welche jedoch in der hier beschriebenen Methodik von AssayQuant nur (1/s) aus dem Fitting erhaltenen k_{inact} und K_I zurückgerechnet werden kann.

4.3 KINOMEscan® – KdELECT (Eurofins)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der CRO Eurofins DiscoverX LLC (San Diego, CA, USA) zusammen gearbeitet, um die Kinomselektivität für unsere Leitstrukturen bestimmen zu lassen. Um jedoch hiermit die Anforderungen für den Status einer chemischen Sonde nachweisen zu können (30-fache Selektivität innerhalb der Proteinfamilie, siehe Tabelle 3), sollte initial eine K_d -Wert Bestimmung im gleichen Testsystem erfolgen wie das des Kinom-Screenings. Der so erhaltene Wert x30 bzw. > 30-fach diene dann als Startkonzentration für das eigentliche Selektivitäts-Screening. Die Definition der Bindungskonstante bzw. Dissoziationskonstante K_d entspricht weitestgehend der Definition der Inhibitionskonstante K_i . Der K_i -Wert ist jedoch auf die Beschreibung der Bindungsaffinität von Inhibitoren beschränkt, wohingegen der K_d -Wert die Bindungsaffinität von allgemeinen Liganden beschreibt. ^{176, 181, 182}

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[E] * [L]}{[EL]}$$

Der grobe schematische Verlauf dieser Testung ist in Abbildung 19 dargestellt:

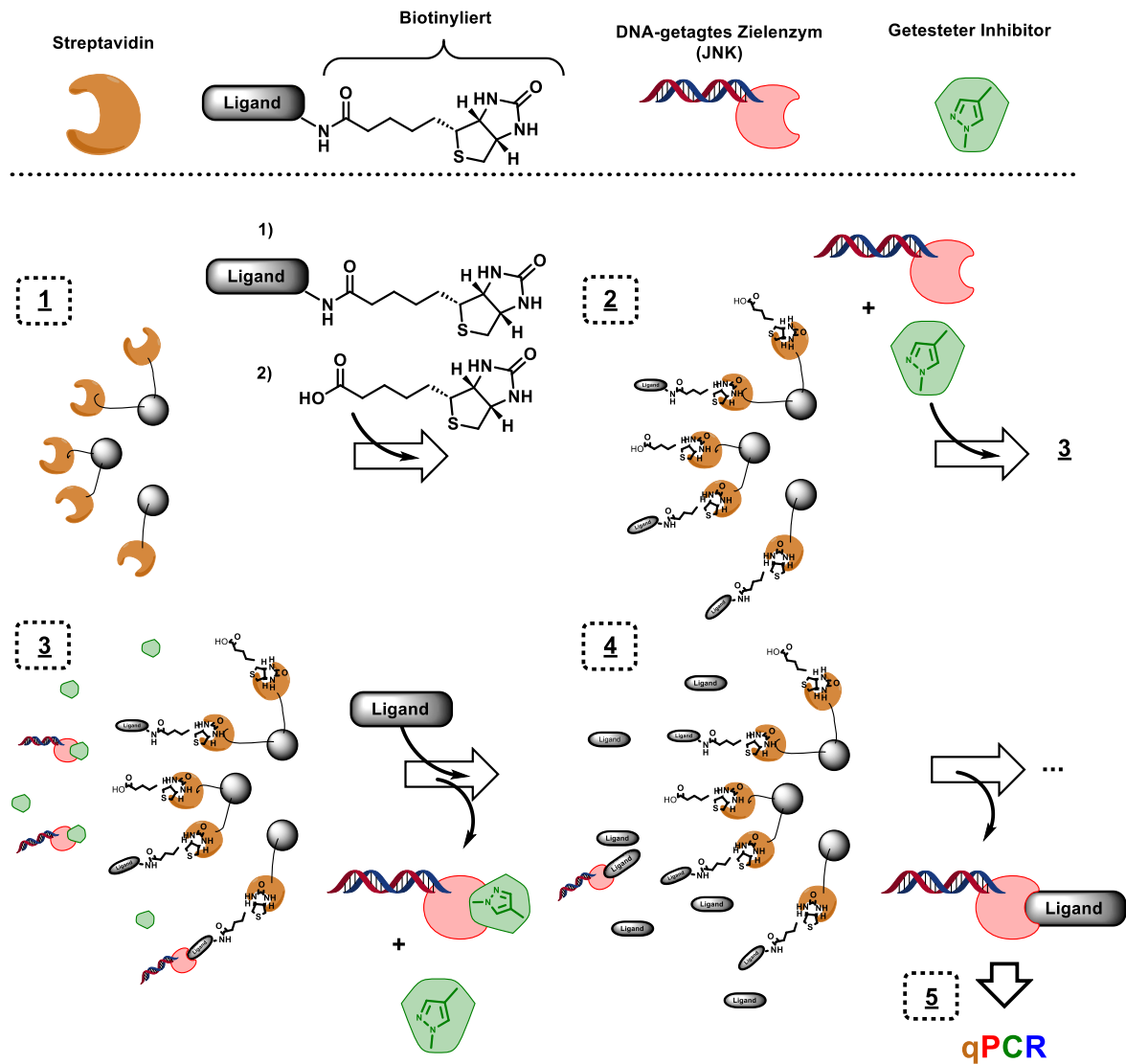


Abbildung 19: Schematischer Ablauf des KINOMEScan Assays von Eurofins. Schritt 1: An *beads* gebundenes Streptavidin wird vorgelegt. Schritt 2: Herstellung der *Affinity-beads* durch Zugabe von biotinyliertem Ligand sowie dem anschließenden Absättigen des restlichen Streptavidins mit Biotin. Schritt 3: Verdrängen des an die *beads* gebundenen Liganden von der Zielstruktur, durch den zu untersuchenden Modulator, mit anschließendem Auswaschen von übrigem Inhibitor sowie Inhibitor-Enzym-Komplexen. Schritt 4: Verdrängen der Zielstruktur von den *Affinity-beads* durch einen Überschuss an löslichem Ligand. Schritt 5: Quantifizierung der nicht in Schritt 3 verdrängten Kinase mittels qPCR. Verbildlichung abgewandelt nach Fabian et al.¹⁸³

An die Oberfläche einer magnetischen Matrix (*beads*) gebundenes Streptavidin wird in einem ersten Schritt 30 min. mit einem biotinylierten Liganden der jeweiligen Zielstruktur versetzt. Biotin bildet mit Streptavidin eine der stabilsten bekannten, nicht-kovalenten Bindungen aus ($K_d \approx 10^{-15} \text{ M}$) und fixiert den Liganden an der Oberfläche der *beads*, welcher dadurch nach außen hin präsentiert wird.^{184, 185} Übriges Streptavidin wird mit einem Überschuss an Biotin geblockt. Das Produkt wird gewaschen und zusammen mit dem zu untersuchenden Inhibitor in der entsprechenden Konzentration, sowie mit DNA-getagtem Zielenzym (JNK1/2/3) vermischt und 1 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, werden die *beads* gewaschen, mit einem Überschuss an freiem Ligand versetzt und abermals für 30 min. bei RT inkubiert. Die noch an den biotinylierten Liganden gebundenen

Zielstrukturen werden dadurch von der festen Matrix abgetrennt und können ausgewaschen werden. Über eine quantitative Polymerase Chain Reaktion (qPCR) kann auf die Kinasekonzentration im Eluat rückgeschlossen werden.¹⁸³

In diesem Format wird entsprechend das Enzym nicht in seiner Funktion inhibiert, sondern ein an das Enzym gebundener Ligand verdrängt. Es wird folglich ein K_d -Wert und kein K_i -Wert ermittelt. Zu beachten ist ebenfalls, dass in diesem Verdrängungssystem der untersuchte orthosterische Modulator nicht gegen die Affinität von ATP sondern die eines anderen Liganden verglichen wird. Die Bindungskonstanten werden hierbei über folgende Formel aus dem erhaltenen qPCR-Signal errechnet:

$$Response = Background + \frac{Signal - Background}{1 + (K_d^{Hill\ Slope} / Dose^{Hill\ Slope})}$$

4.4 KINOMEScan® – scanEDGE (Eurofins)

Auf derselben Plattform der Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde der eigentliche Selektivitätsscann durchgeführt. Man entschied sich hierbei für das scanEDGE-Panel, welches insgesamt 97 Kinasen umfasst. Auch wenn dieses Produkt nicht alle testbaren Kinasen berücksichtigt, stehen die diversen enthaltenen Kinasen repräsentativ für das gesamte Kinom. Als Unterschied zum KdELECT wurden hierbei keine Bindungskonstanten gemessen, sondern % der Kontrolle (*percentage of control*, POC). Die POC ergibt sich aus folgender Formel, wobei die Positivprobe einen POC von 0 besitzt und die Negativprobe (DMSO) einen POC von 100:

$$POC = 100 * \left(\frac{Signal\ der\ Testverbindung - Signal\ der\ Positivprobe}{Signal\ der\ Negativprobe - Signal\ der\ Positivprobe} \right)$$

4.5 Vergleich der drei Potenz-Bestimmenden Plattformen

Neben der Standardtestung von Reaction Biology ($^{33}\text{PanQinase}$ -Assay) wurde auf zusätzliche CROs immer dann zurückgegriffen, wenn der Standard die zu untersuchenden Verbindungen nicht vollständig charakterisieren konnte.

Der PhosphoSens-Assay musste bei Verbindungen mit potentiell irreversibel-kovalentem Bindemodus herangezogen werden, da deren Potenz durch eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, der Enzyminaktivierungseffizienz (k_{inact}/K_i) besser abgebildet wird, als durch eine an einem zeitlichen Endpunkt generierte Inhibitionskonstante (K_i) oder Aktivität (IC_{50}).^{180, 181} Dies liegt, wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, an der zeitlichen Abhängigkeit der Inhibition (TDI) bzw. an der Geschwindigkeit der Ausbildung einer kovalente Bindung von entsprechenden Inhibitoren. Die hierbei vorweg für die kovalenten Kandidaten bestimmten Affinitäts- (K_i)/ Aktivitätswerte (IC_{50}) wurden wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben generiert, um vor der Bestimmung von k_{inact}/K_i die zeitliche Abhängigkeit der Inhibition als Bedingung für eine echte kovalente Hemmung nachzuweisen.

Tabelle 6: Vergleich der einzelnen Testsysteme für die Testung der Inhibitoren auf JNK2

Parameter	$^{33}\text{PanQinase}$	PhosphoSense	KINOMEscan
Bestimmung	IC_{50}	K_i ; IC_{50} ; k_{inact}/K_i	K_d
Detektion	Radiometrisch	Fluorometrisch	qPCR
Datenerhebung	Endpunktbestimmung	Kontinuierlich	Endpunktbestimmung
Konz. Kinase	2,0 nM	4,0 nM	Nicht angegeben
Konz. ATP	Apparent K_m (1 μM)	Apparent K_m (19,4 μM)	Kein ATP vorhanden
Substrat	ATF2	Modelliertes Sensor Substrat	Kein Substrat vorhanden
Inkubationszeit	30°C für 60 min.	30 °C für 240 min	RT für 60 min
Prä-Inkubation	-	(\pm 60 min)	-
Start-/Endkonz.	100 μM – 3 nM (10 Punkte) Halblogarithmische Verdünnung	10 μM – 0 μM (12 Punkte) 3-fach-Verdünnung	10 μM (11 Punkte) Logarithmische Verdünnung

Da final ein kovalent-irreversibler Inhibitor auf seine Selektivität innerhalb des Kinoms hin untersucht werden sollte, lag es nahe das Selektivitätsscreening ebenfalls auf der PhosphoSense-Plattform durchzuführen. Da jedoch zu wenig Erfahrung mit diesem Produkt dieser CRO vorhanden war, wurde sich für die KINOMEscan-Plattform entschieden um die Selektivität zu bestimmen.

4.6 Metabolische Stabilität in Mauslebermikrosomen (MLM)

Von ausgewählten Verbindungen wurde die metabolische Stabilität evaluiert. Diese Testungen wurden von Alexander Rasch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Laufer an der Universität Tübingen durchgeführt. Hierbei wurden die Verbindungen in einer Konzentration von jeweils 0,1 mM bis zu zwei Stunden lang mit murinen Lebermikrosomen verdaut. Die in den Mikrosomen enthaltenen Enzyme sollen näherungsweise die metabolische Transformation der Verbindungen in einem Organismus simulieren. Die behandelten Proben wurden direkt einer quantitativen Massenanalytik zugeführt. Als Positivkontrolle wurde Verapamil genutzt. Das genaue Vorgehen, speziell zu den hier untersuchten Verbindungen, wurde bereits veröffentlicht (Wydra et al.).¹¹⁶

4.7 Pharmakokinetik Studien

Ebenfalls durchgeführt wurden Pharmakokinetik Studien bei der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE). Hierbei muss angeführt werden, dass alle Tierversuche durch die zuständige Stelle (Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes) bewertet, genehmigt und in Übereinstimmung mit dieser durchgeführt wurden .

⇒ *Ethics Approval Number: 2.4.2.2.-06-2023*

Die sechs untersuchten Verbindungen wurden intravenös (Dosis = 10 mg/kg) als Kassetten à drei Verbindungen verabreicht. Nach definierten Zeitpunkten (5 min., 15 min., 30 min., 1 h, 3 h, 8 h, 24 h) ab der Dosisgabe wurden von den Tieren Blutproben an der lateralen Schwanzvene genommen, die via Massenspektrometrie analysiert und auf den Anteil der enthaltenen Inhibitoren hin quantifiziert wurden.

Das Vehikel, indem jeweils drei Verbindungen auf einmal mit einer Konzentration von 2 mg/mL gelöst werden mussten, wurde optimiert und hatte schlussendlich folgende Zusammensetzung:

Bestandteil	Dimethylacetamid	PEG400	Sulfobutylether-β- Cyclodextrin in Wasser (20 % w/v)
<i>Anteil:</i>	<i>10 [% w/w]</i>	<i>60 [% w/w]</i>	<i>30 [% w/w]</i>

Pro Kasette wurden drei C57BL/6J Mäuse behandelt. (Triplikat).

4.8 Western Blotting (WB)

Mit ausgewählten Leitstrukturen wurden WB-Experimente durchgeführt um die Auswirkungen von JNK2/3-selektiver Hemmung auf die *downstream* von JNK gelegenen Substrate zu untersuchen. Die WB-Experimente wurden von Stefan Zwirner aus der Arbeitsgruppe Zender am Universitätsklinikum Tübingen etabliert und unter dessen Supervision sowie in Zusammenarbeit durchgeführt. Das angewandte Protokoll ist in Kapitel 7.2 beschrieben und die Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer/Gele und Medien sind in Kapitel 7.2.1 aufgelistet. Hierfür wurden adhärenente murine Nras^{G12V}; CDKn2a^{ARF-/-} *hepatocellular carcinoma* (HCC) Zellen verwendet. Diese wurden nach dem Anwachsen für 2 h mit Inhibitor (vorgelöst in DMSO) in Anzuchtmedium inkubiert und direkt darauf mit einer konzentrierten Sorbitol-Lösung (Endkonzentration = 250 µM oder 133 µM; siehe Protokoll) versetzt und für eine weitere Stunde inkubiert. Dieser so zugeführte osmotische Stress/ Stimulus dient der Aktivierung der JNK-Signalkaskade.¹⁸⁶ Entsprechend kommt es zu einer vermehrte Phosphorylierung der *downstream* JNK liegenden Substrate in den Zellen. Auf ihre Proteinmenge normalisierte Ganzzellysate dieser so behandelten Zellen können nun via WB analysiert werden. Als Positivprobe wurde der bereits über WBs charakterisierte pan-JNK-Inhibitor **SP600125** mit getestet.¹²⁷ Als Negativprobe wurde Zellen mit einer äquivalenten Menge DMSO inkubiert. Nun kann untersucht werden, ab welchen Konzentrationen die einzelnen JNK-Inhibitoren die induzierte Phosphorylierung der *downstream* Substrate unterdrücken. Ein Teil der hier durchgeführte Methodik wurde bereits veröffentlicht (Wydra et al.).¹¹⁶

4.8.1 Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Wie im WB-Protokoll (Kapitel 7.2) beschrieben, wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt, um die einzelnen Proben entsprechend verdünnen zu können und damit auf eine feste Proteinkonzentration zu normalisieren. Dies ist für die Vergleichbarkeit der später angefertigten WB-Ladungen unverzichtbar. Die Proteinkonzentration wurden kolorimetrisch mit einem DC (*detergent compatible*) Protein-Assay Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA) und entsprechenden Arbeitsanweisungen des Herstellers bestimmt und basiert auf der Grundlage des Lowry-Tests.¹⁸⁷ Hierbei wird eine Probe mit Protein zuerst mit einer Mischung aus alkalischer Kupfertartrat-Lösung (Lösung A) und wässriger Dodecylsulfatlösung (Lösung S) versetzt. Hierdurch kommt es zur Biuretreaktion und damit zur Ausbildung eines farbigen Kupferkomplexes zwischen den zweiwertigen Kupferkationen und dem Aminosäurerückgrat der Peptide.^{188, 189} Nun wird das sogenannte Folin-Ciocalteu-Reagenz (Lösung B) zugesetzt. Dieses gelbliche Reagenz enthält sowohl Wolframsäure als auch Molybdänsäure und wird durch den vorweg gebildeten Kupferkomplex zu Molybdänblau reduziert.^{187, 189, 190} Nach einer sehr geringen Inkubationszeit (15 min) kann so, durch den konsekutiven Ablauf von zwei Farbreaktionen, über ein Photometer die gesamt-Proteinkonzentration kolorimetrische bestimmt werden.¹⁹¹

4.9 GSH – Stabilitätsassay

Die intrinsische Reaktivität bzw. Promiskuität von potentiell kovalent-bindenden Verbindungen gegenüber Schwefel-Nukleophilen wurde mittels Glutathion-(GSH) Stabilitäts-Assay bestimmt. Dieser Assay basiert auf einem Protokoll von Keeley et al. und wurde in einer Publikation von Schwarz et al. bereits veröffentlicht.^{116, 192, 193}

Hierbei wurden die Verbindungen zusammen mit GSH und dem internen Standard Indoprofen in einer Mischung aus ACN und 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure- (HEPES) Puffer (1:1) gelöst. Die Zusammensetzung der HEPES-Puffers orientierte sich am Reaktionspuffer, welcher im HotSpot™-Assay von Reaction Biology Anwendung findet und wurde bereits Publiziert.^{116, 194}

Dadurch ergaben sich folgende finale Konzentrationen: Testverbindung = 100 μ M; Interner Standard = 100 μ M; Glutathion = 5 mM. Die Proben wurden via HPLC zu 10 Zeitpunkten vermessen (separate HPLC-Methode siehe Kapitel 7.1.1), wobei die Proben permanent auf 40 °C temperiert wurden. Jede Kondition wurde im Triplikat vermessen. Die *area under the curve* (AUC) des kovalenten Inhibitors wurde hierdurch gemonitort und bestimmt. Als Positiv-/ Vergleichsprobe wurde die Halbwertszeit des zugelassenen kovalenten Tyrosinkinase-Inhibitors Afatinib im selben Versuchsaufbau mitbestimmt. Über die hierdurch ermittelte Geschwindigkeitskonstante k kann schließlich die Halbwertszeit der

kovalenten Inhibitoren extrapoliert werden. Aufgrund des großen Überschusses an GSH (5 mM = 50x Inhibitorkonzentration) kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit eines bimolekularen Mechanismus alleine von der Konzentration des Inhibitors bestimmt wird und die Gleichungen für eine Kinetik (Pseudo-) Erster-Ordnung angewandt werden können.¹⁹⁵

Zeitgesetz Kinetik erster Ordnung für die Konzentration der Inhibitoren [I] zum Zeitpunkt t:

$$[I]_t = [I]_0 * e^{-k*t}$$

Durch Zuhilfenahme des Logarithmus naturalis (ln) lässt sich das Zeitgesetz linearisieren und in folgende Form bringen:

$$y = a * x + b$$

a = Steigung; b = Achsenabschnitt

$$\ln([I]_t) = -k * t + \ln([I]_0)$$

Da die gemessenen AUC des HPLC-Chromatogramms die Konzentrationen wiedergespiegelt ergibt sich nach Umformen der linearisierten Gleichung:

$$\ln\left(\frac{[I]_t}{[I]_0}\right) = -k * t \Rightarrow \ln\left(\frac{AUC_t}{AUC_0}\right) = -k * t$$

Entsprechend ist die negative Steigung = Geschwindigkeitskonstante k , aus welcher die Halbwertszeit $t_{1/2}$ nach folgender Gleichung bestimmt werden kann (gilt bei Reaktionen (pseudo-)erster Ordnung):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

4.10 IPMS

Für die *intact protein mass spectrometry* (IPMS) musste das Zielprotein vorweg mit dem Inhibitor inkubiert werden. Danach wurde das Gemisch per MS vermessen um nachzuweisen, dass die Inhibitoren die Zielstruktur kovalent *labeln* können. Die Vermessung der Proben via LC-MS wurde von Benedikt Masberg an der Universität Tübingen im Arbeitskreis Lämmerhofer durchgeführt. Die genaue, hier durchgeführte Methodik wurde bereits veröffentlicht (Wydra et al.).¹¹⁶

Hierbei wurde aktives, nicht mit einem *tag* versehenes JNK2-Protein verwendet, welches in dieser Form auch im ³³Panqinase-Assay angewendet wird (Produkt-Nr. 0459-0000-1, Reaction Biology Europe GmbH, Freiburg i. Br., DE). Dies hat den Vorteil, dass davon ausgegangen werden kann, dass die orthosterische ATP-Bindetasche unverändert vorliegt und der Inhibitor die gleiche Affinität zum Zielprotein aufweist, die in dem Potenz-Assay bestimmt wurde. Dies steht im Gegensatz dazu, eine inaktive Kinase zu verwenden, welche un-phosphoryliert vorliegt und damit potentiell eine Konformation annehmen könnte, in der die reversible Bindungskomponente des kovalenten Inhibitors nicht derart binden kann und es damit zu einer quantitativ deutlich geringeren Ausbildung von inhibitor-*gelabelten* Protein kommt.

Allerdings ist zu beachten, dass eine aktive Kinase meist ein Gemisch aus unterschiedlich oft und an unterschiedlichen Stellen phosphorylierten Zielstrukturen (Kinasen) darstellt. Entsprechend enthält man in der Massenspektrometrie mehrere Protein- bzw. Protein-Inhibitor-Addukte und nicht wie bei der Verwendung von inaktiven Kinasen meist ein deutlicheres Signal. Des Weiteren kann es während der Inkubation zu einer Zahl an Oxidations- und Abbaureaktionen kommen, die nun wiederum zu noch mehr zusätzlichen Proteinmassesignalen führen.

Der Inhibitor wurde mit einem Verhältnis von 5:1 Überschuss zum Enzym eingesetzt (finale Konzentration der Verbindung = 10 µM). Die Mischung wurde für 4 h und 15 min. bei 20 °C im Schüttler inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde Enzym nur mit DMSO inkubiert. Ein kovalentes *labeling* wird durch das Erhöhen der *m/z* des Enzyms durch die jeweilige Molekülmasse des kovalenten Inhibitors bestätigt.

4.11 NanoBRET – Assay

Der zelluläre NanoBRET-Assay und die Auswaschexperimente, welche auf der NanoBRET-Plattform basieren, wurden von Dr. Nicole Plank (Arbeitskreis Koch, Universität Regensburg) durchgeführt.

Die Konzentration des *Tracer*-Moleküls K10, welcher kommerziell von Promega erworben wurde, betrug 250 nM bei den jeweiligen Testungen aller drei Isoformen.

Der NanoBRET-Assay beruht auf dem Effekt des *Bioluminescence Resonance Energy Transfers* (BRET).¹⁹⁶ Hierzu werden in einem ersten Schritt HEK293T-Zellen mit einem Plasmidvektor eines modifizierten Zielproteins transfiziert. Entsprechend produzieren diese Zellen nun ein Zielfusionsprotein, aus funktionaler Zielstruktur *getaggt* mit der sogenannten NanoLuciferase (NLuc).¹⁹⁷ Diese spezielle Luciferase katalysiert die Umwandlung des zellgängigen Substrats Furimazin zu Furimamid und emittiert dabei energetische, blaue Strahlung ($\lambda = \text{ca. } 460 \text{ nm}$).¹⁹⁷ In einem nächsten Schritt wird den Zellen ein zellgängiges *Tracer*-Molekül in einer festen Konzentration (hier 250 nM) sowie die zu testende Verbindung (unterschiedliche Konzentrationen) zugesetzt.

Das *Tracer*-Molekül besteht sowohl aus einem Liganden der Zielstruktur, als auch einem Fluorophor. Bindet dieses *Tracer*-Molekül an die Zielstruktur, kommt es zu einer starken Annäherung des Fluorophors an die NLuc. Ist jetzt noch NLuc Substrat innerhalb der Zelle vorhanden, emittiert die NLuc Photonen als kurzwellige Donor-Emmission. Diese Energie wird bei einer Annäherung auf ca. 10 nm zum *Tracer*-Molekül allerdings strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Kupplung (Förster-Resonanzenergietransfer) auf das Fluorophor übertragen, wodurch es wiederum zu einer langwelligen Akzeptor-Emmission ($> 600 \text{ nm}$) durch das Fluorophor kommt.^{196, 198, 199} Der Quotient dieser Signale ergibt das BRET-Signal:

$$\frac{\text{Akzeptor – Emmission (Strahlung des Tracer Fluorophors)}}{\text{Donor – Emmission (Strahlung der NLuc – Katalysereak.)}} \\ = \text{BRET – Signal (Verhältnis)}$$

Die Zellen wurden für insgesamt 120 min inkubiert (105 min bei 37 °C + 15 min bei RT). Im Anschluss wurde das Luciferasesubstrat sowie ein rein extrazellulär wirkender Inhibitor der NLuc zugegeben und das entstehende BRET-Signal gemessen. Der extrazelluläre Inhibitor dient dazu, aus toten/ kompromitierten Zellen austretende NLuc zu hemmen, was das BRET-Signal verbessert. Das Protokoll hierzu wurde bereits von Hoffelner et al. bzw. Andreev et al. beschrieben.^{200, 201}

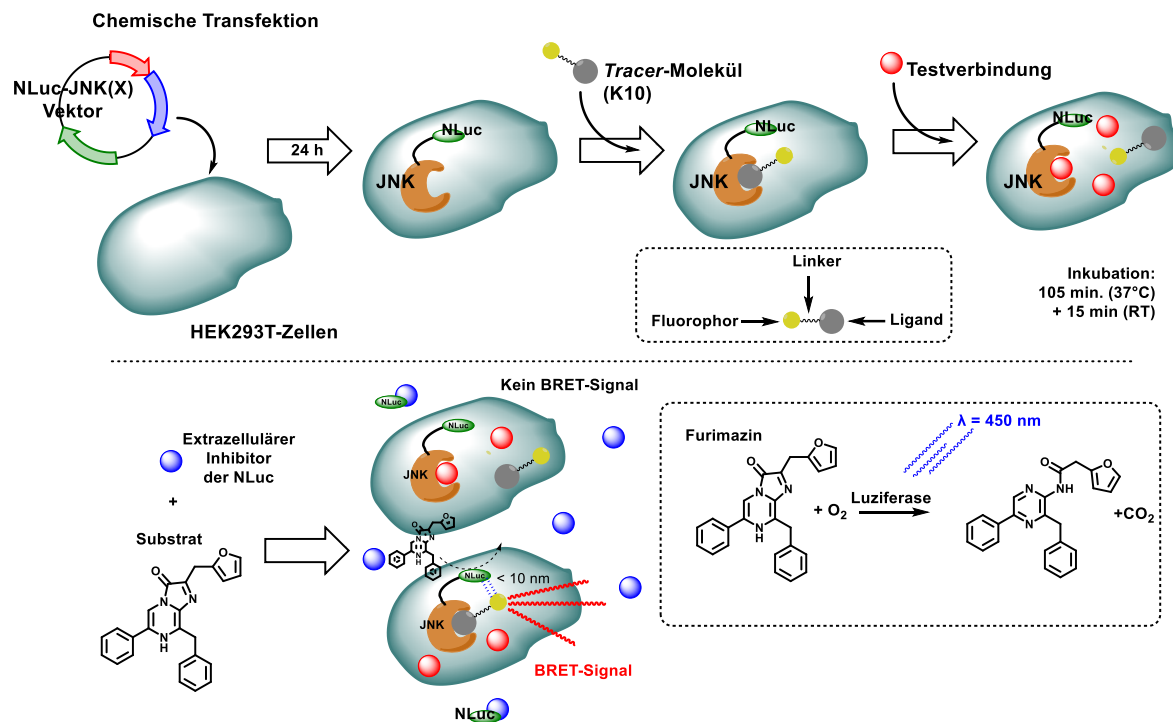


Abbildung 20: Schematische Darstellung des NanoBRET-Assays. HEK293T-Zellen werden mit NLuc-JNK-Fusionsproteinvektor transfiziert. Die Zellen stellen nun NLuc getaggte JNK Zielstruktur her. Tracer- und Testverbindungen werden zugegeben und die Zellen werden für insgesamt 2 h inkubiert. Folgend wird extrazellulärer Inhibitor von NLuc sowie Furimazin-Substrat zugegeben. Es entsteht bei Bindung des Tracers und Annäherung des gebundenen Fluorophors an die Luciferase < 10 nm eine Akzeptor-Emission.¹⁹⁸ Bild abgeleitet von Veröffentlichungen der Firma Promega GmbH.^{202, 203}

4.11.1 Verdrängungsexperiment NanoBRET basiert

Die NanoBRET-Plattform wurde auch für Verdrängungs-/ Auswaschexperimente verwendet. Diese Testung diente dazu, die Irreversibilität von kovalenten Inhibitoren nachzuweisen, bzw. die *target-residence-time* (TRT) von reversiblen Molekülen zu veranschaulichen.^{200, 204} Eine Quantifizierung oder Parameterisierung des Effekts wurde nicht durchgeführt.

Als Unterscheidung zur *jump-dilution* wird hierbei der Inhibitor nicht nur nach der Sättigung der Zielstruktur schlagartig stark verdünnt, wodurch dieser von der Zielstruktur über die Zeit wieder ab-diffundiert, sofern er keine kovalente Bindung ausgebildet hat, sondern aktiv von dem Tracer-Molekül verdrängt.^{204, 205} Die Tracerkonzentration ist in diesem Fall auch 4x höher wie bei dem NanoBRET-TE Assay (1 μ M).

Hierbei werden die HEK293T Zellen wie beim NanoBRET-Assay mit dem entsprechenden Plasmid-Vektor transfiziert und für 24 h bebrütet. Folgend werden die Zellen direkt mit dem zu testenden Inhibitor in einer Konzentration von 10x des jeweiligen IC₅₀ versetzt (Sättigung) und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden nun für eine Stunde alle 15 min gewaschen um nicht in die Zellen aufgenommenen Inhibitor zu entfernen (Auswaschphase). Es wird nun wiederum zellgängiges Substrat (Furimazin) und extrazellulärer NLuc-Inhibitor zu den Proben gegeben.

Erst jetzt wird das *Tracer*-Molekül zugegeben. Das sich nun aufbauende BRET-Signal wird kontinuierlich für 2 h vermessen. Das *Tracer*-Molekül verdrängt so über die Zeit die zu testende Verbindung. Bei der Ausbildung einer kovalenten Bindungen zwischen Testverbindung und aktivem Zentrum des Zielfusionsproteins, kann sich entsprechend kein BRET-Signal aufbauen bzw. der Aufbau des BRET-Signals kommt bei unvollständigem kovalenten *labeling* ab einer gewissen Intensität zum Erliegen. Ein Protokoll hierzu wurde bereits veröffentlicht.^{116, 200, 206}

4.11.2 Verdrängungsexperimente mit JNK2 bzw. JNK3-Mutante

Neben Auswaschexperimenten mit HEK293T-Zellen welche NLuc-modifizierte JNK-Isoformen exprimierten, wurden auch zwei weitere Vektoren von Dr. N. Plank hergestellt und transfiziert wodurch die HEK293T-Zelllinien das NLuc *getaggte* Zielprotein mit Mutation an der potentiell von Inhibitoren kovalent adressierbaren Stelle exprimierten. Die Proteine NLuc-JNK3(C154A) bzw. bei NLuc-JNK2(C116A) wurden so von den Zellen hergestellt.²⁰⁰ Die entsprechenden Verdrängungsexperimente wurden analog zu dem in **4.11.1** beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Für die Isoform JNK1 war dieser Versuch nicht notwendig, da der charakterisierte kovalenten Inhibitor in unterschiedlichen biochemischen Assay-Systemen keinerlei Aktivität gegenüber JNK1 zeigte.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Biochemische Evaluation

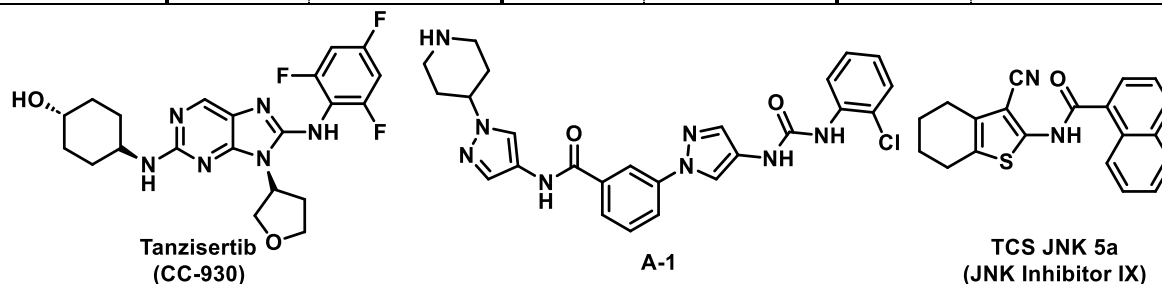
Alle Inhibitoren wurden wie bereits im Biologischen Teil (Kapitel 4) beschrieben, initial einer kommerziell erwerbbaeren biochemischen Testung (³³PanQinase, Reaction Biology Europe GmbH, Freiburg i. Br., DE) unterzogen. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden vielversprechende Kandidaten weiter charakterisiert. Falls nicht anders beschrieben, wurden die generierten IC₅₀-Werte auf 1 nM genau gerundet und jeweils als Singulate (Einzelmessung; n = 1) gemessen.

5.1.1 Biochemische Testung der Ausgangsverbindungen

Um die Aussagekraft des gewählten Standard-Testungssystems einschätzen zu können und damit die Vergleichbarkeit der generierten Daten mit bereits publizierten Daten zu beurteilen, wurden drei Referenzverbindungen getestet (**Tanzisertib**; **A-1**; **TCS JNK 5a**). Wie die Werte aus Tabelle 7 erkennen lassen, ließen sich die publizierten Aktivitätswerte der Ausgangsverbindungen durch den gewählten ³³PanQinase-Assay gut reproduzieren. Dies spricht für die Anwendbarkeit und Robustheit dieses Standard-Testungssystems, da sich die publizierten, jeweils zur einzelnen Evaluation der Referenzen eingesetzten Assay-Systeme, welche in Tabelle 7 genauer erläutert werden, von der Prozedur und Funktionsweise her stark unterschieden. Lediglich die Aktivitäts-Hemmung der JNK1 durch Referenz-inhibitor **A-1** wich um den Faktor 4 vom Literaturwert ab. Diese doch recht hohe Reproduzierbarkeit lässt die Werte der generierten Derivate gut mit diesen Referenzinhibitoren und den dafür publizierten Werten vergleichen.

Tabelle 7: Vergleich der Aktivitäten der Referenzinhibitoren und der jeweiligen publizierten Assay-Systeme

Inhibitoren	Lit. IC ₅₀ (JNK1) [nM]	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase** [nM]	Lit. IC ₅₀ (JNK2) [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase** [nM]	Lit. IC ₅₀ (JNK3) [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase** [nM]
A-1 ¹³³	679	170	25	38	23	16
Tanzisertib ¹²⁴	61(± 24)	136	7(± 2)	3	6(± 2)	< 3
TCS JNK 5a ^{***129}	< 10000	10130	316	88	200	71



Lit. Assay:	Tanzisertib ¹²⁴	A-1 ¹³³	TCS JNK 5a ¹²⁹
	<ul style="list-style-type: none"> - Radiometrischer Assay - Substrat = cJun - Inkubationszeit = 60 min. - ATP = 6,6 μM (JNK1-3) - 15 min. Prä-Inkubation ohne ATP 	<ul style="list-style-type: none"> - Zeit-aufgelöster Fluoreszenz-Assay (HTRF) - Substrat = ATF2 - Inkubationszeit = 22 min - ATP = 1,25 μM (JNK1-3) 	<ul style="list-style-type: none"> - Fluoreszenz Anisotropie (FA) Bindungs-Assay (JNK1+3) ohne ATP und Inkubation bis Äquilibrium (30-300 min.) - Radiometrischer Bindungs-Assay (JNK2) mit ATF2 und 45 μM ³³γ-P-ATP

* Nach Literatur-Angaben wurde das TFA-Salz vermessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die freie Base, als auch das HCl-Salz synthetisiert. Via ³³PanQinase-Assay wurde die freie Base von **A-1** vermessen.
 ** n = 1. Letzte gemessene Konzentration = 3 nM. *** Umrechnung aus publizierten p(IC₅₀) (auf 1 nM gerundet).

5.1.2 Derivatisierung des HR-I Motivs

Als Startpunkt dieses Projektes stand die Derivatisierung des von Zheng et al. publizierten Aminopyrazol-basierten Inhibitors **A-1**. Dieser Inhibitor eignete sich besonders als Ausgangspunkt für Untersuchung von isoform-selektivitätsbedingenden Struktur-Wirk-Beziehungen, da er bereits eine moderate JNK1/JNK2-Selektivität aufwies (27-fach) und gleichzeitig gute Aktivitäten gegenüber JNK2 (25 nM) und JNK3 (23 nM) veröffentlicht waren.¹³³ Dazu wurde in einer nachfolgenden Veröffentlichung von Park et al. nicht nur eine überzeugende, allgemeine Begründung für die Entstehung von Isoform-Selektivität gegenüber JNK1 aufgeführt, sondern auch diese Erörterung für eben dieses Aminopyrazol-Grundgerüst bestätigt.¹²⁰ Eine potentiell intrinsische Isoform-Selektivität gegenüber JNK1 wurde dementsprechend auch bei weiteren Derivaten von **A-1** erwartet. Ziel war es diese Selektivität zu erhöhen. Zu Beginn wurde die Adressierung der bspw. von Kamecka et al. so bezeichneten „*selectivity pocket*“ modifiziert.²⁰⁷ Entsprechende Derivate sind in Tabelle 8 abgebildet.

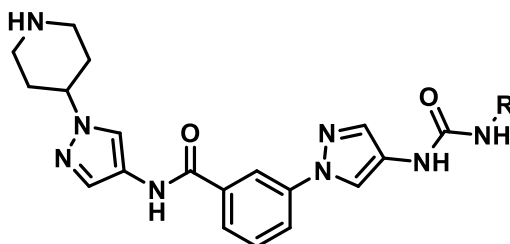


Tabelle 8: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit in Richtung HR-I dirigierenden Modifikationen.

Nr.	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
A-1*		170	38	16	4,5x
P-1		405	16	16	25,0x
P-2**		132	13	7	10,3x
P-3**		136	11	9	12,7x
P-4**		488	38	38	12,7x
P-5**		4967	555	267	9,0x
P-6**		7409	606	128	12,2x
P-7**		24920	10660	> 100000	2,3
P-8***		85420	> 100000	> 100000	0,9x
P-9**		43520	26590	12930	1,6x
P10**		111	7	6	16,3x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben. * Freie Base und HCl-Salz isoliert. Daten beruhen auf der Testung der freien Base. ** HCl-Salz Isoliert. *** TFA-Salz isoliert. Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

Der Austausch des *ortho*-ständigen Chlorsubstituenten (**A-1**) gegen ein Fluor (**P-1**) führte zu ähnlich guten Hemmwerten gegenüber JNK2/3 und zu einer leichten Verbesserung der entsprechenden Selektivität gegenüber JNK1 (25x). Der Austausch gegen eine Methylgruppe wiederum (**P-2**), sowie das Einführen einer zweiten *meta*-ständigen CH₃-Gruppe (**P-3**) führte zu leicht niedrigeren IC₅₀-Werten gegenüber JNK2/3 aber auch zu geringeren JNK1/JNK2 -Selektivitäten. Das reine Phenyl-Derivat (**P-4**) zeigte leicht geringere Aktivitätswerte für JNK1-3 als die Derivate mit methylierten HR-I-Motiv. Der Austausch des *ortho*-Substituenten zu einem CF₃-Rest (**P-5**) führte zu einem starken Aktivitätsabfall auf allen drei getesteten Isoformen. Ein Wechsel des CF₃-Substituenten von der *ortho*- zur *meta*-Position führte zu einem ähnlich potenten Inhibitor (**P-6**), wohingegen der Wechsel in die *para*-Position einen starken Aktivitätsabfall mit sich brachte (**P-7**). Es ist allerdings festzuhalten, dass dieser Inhibitor neben seiner geringen Potenz im 5-stelligen-nanomolaren Bereich eine leichte JNK2-Selektivität gegenüber JNK3 aufweist ($\geq 9,4x$; nicht in Tabelle abgebildet). Wie die Hemmwerte der beiden Derivate **P-8** & **P-9** eindrücklich aufzeigen, wurden den dreidimensionalen Raum ausfüllende, alicyclische Gruppen nicht toleriert. Den wohl besten Kandidaten dieser Reihe stellt Inhibitor **P-10** dar. Dieser Kandidat zeigte die niedrigsten IC₅₀-Werte gegenüber JNK2 (7 nM), genauso wie eine innerhalb dieser Reihe vergleichsweise gute Selektivität gegenüber JNK1 (16,3x). Die hier eingesetzte Naphthylgruppe wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen für unterschiedliche Grundstrukturen von JNK-hemmenden Inhibitoren verwendet um die HR-I zu adressieren (PDB = 2O0U; 4KKH).^{129, 208} Diese große, planare Struktur scheint sehr gut den zugänglichen Raum in der HR-I-Tasche auszufüllen und gleichzeitig die für die Selektivität gegenüber JNK1 nach Park et al. notwendigen Interaktionen mit Leu106 (JNK2) bzw. Leu144 (JNK3) ausbilden zu können.¹²⁰ Diesen positiven Interaktionen steht eine mögliche sterische Hinderung durch Ile106 in der JNK1 gegenüber. Entsprechend wurde dieses Naphthyl-Motiv für kommende Endverbindungen mit Aminopyrazolstruktur beibehalten.

5.1.3 N-(3-cyanothiophen-2-yl)amid-Derivate und Abkömmlinge

In den Anfangs- & Orientierungsphasen dieser Arbeit wurden weitere, strukturell sehr unterschiedliche Grundstrukturen untersucht und hiervon Derivate generiert. Unter anderem wurden auch von der 2-Aminothiophen-Grundstruktur des JNK2/3-selektiven Inhibitors **TCS JNK 5a** Derivate synthetisiert und diese evaluiert. Im Gegensatz zur Aminopyrazol-Struktur, wurden hier die HR-II- lösemitteladressieren Motive zuerst derivatisiert.

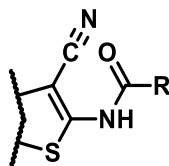


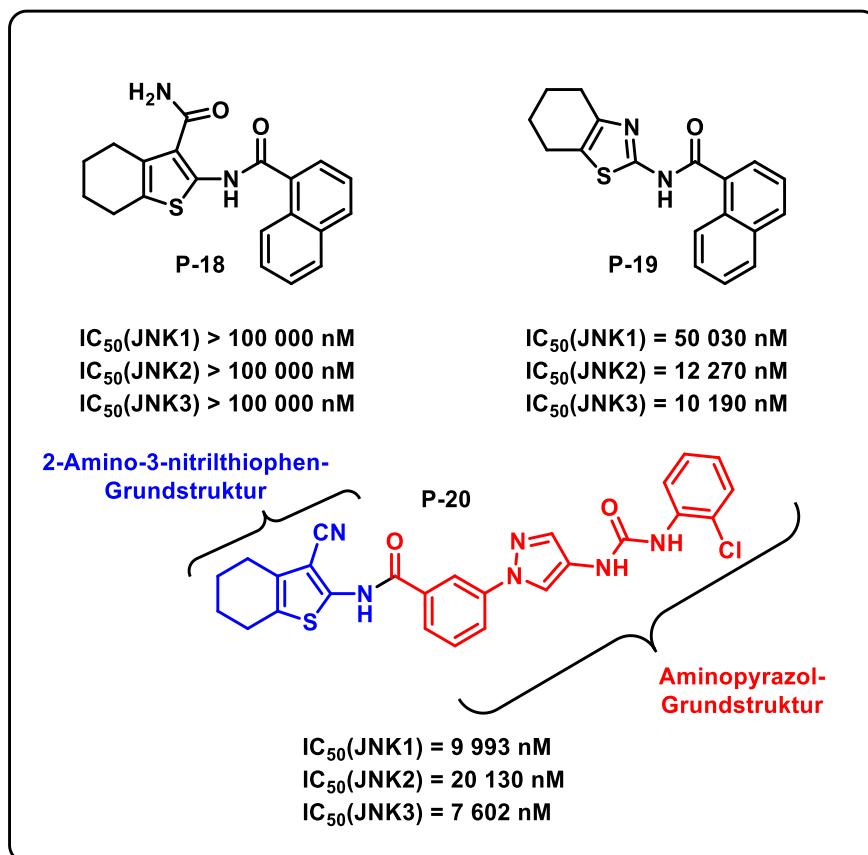
Tabelle 9: Biochemische Testwerte für 2-Amino-3-cyanthiophen-Derivate mit in Richtung HR-II dirigierenden Modifikationen

Nr.	HR-II-/ LM- Adressierender Rest	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
TCS JNK 5a			10130	88	71	115,3x
P- 11			> 100000	> 100000	> 100000	1,0x
P- 12			> 100000	> 100000	> 100000	1,0x
P- 13			> 100000	> 100000	> 100000	1,0x
P- 14*			> 100000	452	591	221,5x
P- 15			> 100000	> 100000	> 100000	1x
P- 16 * **			> 100000	6805	8816	14,7x
P- 17			37850	1413	1839	26,8x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben. * Dieser Inhibitor wurde 2024 in einer Publikation von Iqbal et al. veröffentlicht und in einem korrespondierenden Patent aufgeführt.^{209, 210} ** HCl-Salz isoliert.

Dieser Ansatz stellte sich jedoch trotz der sehr praktikablen Synthese als nicht-zielführend heraus. Neben der auffallend schlechten Löslichkeit der Produkte, konnten scharfe SARs beobachtet werden. Eine Verkleinerung des westlichen, aliphatischen Rings führte zu einer kompletten Inaktivität auf allen drei Isoformen (**P-11-P-13**). Das Vergrößern des alicyclischen Rings um eine Methyleneinheit wiederum, verringerte zwar ebenfalls auf allen Isoformen die Aktivität im Vergleich zum Ausgangsinhibitor **TCS JNK 5a**, allerdings wurde durch das komplette Wegfallen der Aktivität auf der JNK1-Isoform eine fast doppelt so hohe Selektivität gegenüber JNK1 erzielt (**P-14**; 222x). Versuche die Löslichkeit dieser Stoffklasse über das Einführen polarer, sowie protonierbarer Gruppen zu verbessern, führten zu einem deutlichen Abfall der gemessenen IC₅₀-Werte dieser so modifizierten Strukturen (**P16 + P17**). Die schlechte Löslichkeit der Verbindungen dieser Reihen wurde auch insbesondere bei den Pharmakokinetik-Studien deutlich. Hierbei war es nicht möglich gewesen, die Verbindungen **TCS JNK 5a** und **P-14** in geeigneten wässrigen Vehikelsystemen (wie z.B. siehe Kapitel **4.7**), in der benötigten Konzentration in Lösung zu halten. Entsprechend mussten die beiden Verbindungen aus der PK-Studie ausgeschlossen werden.

Weitere in Schema **31** dargestellte Verbindungen, welche im Gegensatz zu **TCS JNK 5a** ein abgeändertes, potentiell *Hinge*-bindendes Motiv aufzeigen (**P-18 + P-19**), stellten sich als weitestgehend inaktiv heraus. Der Versuch, die beiden Grundstrukturen des Aminopyrazol-Grundgerüsts und des 2-Aminthiophen-Grundgerüsts zu kombinieren, führte zu der Verbindung **P-20**, welche geringe Aktivitätswerte, sowie eine nicht gewünschte Selektivität gegenüber JNK2 zeigte (ca. 2x).

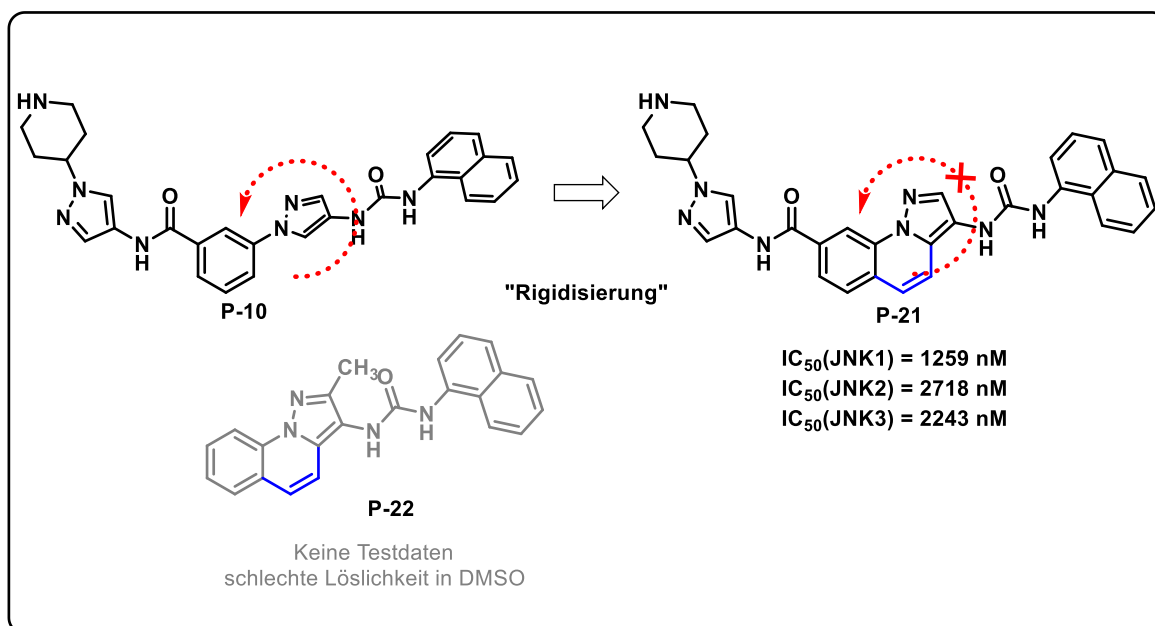


Schema 31: Biochemische Testwerte für 2-Aminothiophen-Derivate mit veränderten *Hinge*-bindendem Motiv (**P-18** + **P-19**), sowie Fusionsinhibitor aus Aminopyrazol- und 2-Amino-3-cyanothiophen-Grundstruktur (**P-20**).

5.1.4 Rigidisierung der Aminopyrazolstruktur

Ebenfalls aufgrund der entsprechenden Löslichkeit der Testverbindungen problematisch waren Rigidisierungsansätze der Aminopyrazolstruktur. Hierbei wurde versucht die freie Drehbarkeit des *Hinge*-bindenden Pyrazols einzuschränken und damit die C-N verknüpfte Phenylstruktur zum Pyrazol-Motiv hin zu planarisieren. Dies würde nur eine *Hinge*-gerichtete Orientierung des Pyrazols zulassen.

Da für Verbindung **P-22** aufgrund der geringen Löslichkeit keine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt werden konnte, wurde sich dafür entschieden diese Verbindung nicht im wässrigen Assaysystem zu testen. Verbindung **P-21** wiederum, welche die direkte, rigidisierte Version des Inhibitors **P-10** darstellt, konnte wohl aufgrund des höheren sp^3 -Anteils ausreichend in DMSO gelöst und folglich standardmäßig evaluiert werden.



Schema 32: Rigidisierte Derivate mit Pyrazol[1,5-a]chinolin-3-amin-Grundstruktur. **P-21** wurde als HCl-Salz isoliert.

Neben der allgemeinen Löslichkeitsproblematik dieses Ansatzes wies Verbindung **P-21** sowohl einer verringerte Selektivität gegenüber JNK1, als auch deutlich niedrigere Aktivitäten gegenüber den JNK2/3- Isoformen im Vergleich zur Ausgangsverbindung **P-10** auf. Entsprechend wurde auch dieser Ansatz nicht mehr weiter verfolgt.

5.1.5 Derivatisierung des HR-II Motivs

Wie von Park et al. postuliert und experimentell bestätigt, ist für die augenscheinlich, intrinsische Isoform-Selektivität des Aminopyrazol-Grundgerüsts hauptsächlich ein Aminosäureaustausch von Ile (JNK1) zu Leu (JNK2/3) innerhalb der HR-I verantwortlich.¹²⁰ Entsprechend müssten alleine die Interaktionen, welche zwischen Inhibitor und HR-I ausgebildet werden können, einen Großteil der Isoform-Selektivität bedingen.

Um diese Prämisse erneut zu bestätigen, wurden Modulatoren auf Basis des Aminopyrazol-Grundgerüsts entwickelt, welche kein wechselwirkendes Motiv westlich des zentralen Aromaten besaßen. Diese Reihe sollte hypothetisch nur in der Lage sein, Interaktionen mit der Hinge bzw. der HR-I auszubilden. Der Anteil des HR-II- und lösemitteladressierenden Restes an der Selektivität fällt bei diesen Kandidaten entsprechend weg, sofern sie den gleichen Bindemodus wie bspw. **SR-11935** aufweisen. Die entsprechenden Derivate sind in Tabelle **10** abgebildet.

5.1.5.1 Reduktion der HR-II adressierende Komponente

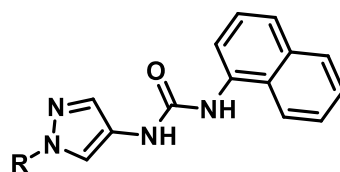


Tabelle 10: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate ohne HR-II- oder LM-dirigierenden Modifikationen.

Nr.	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-23		34680	305	234	113,7x
P-24		> 100000	334	219	299,7x
P-25		26470	2758	1430	9,6x
P-26		27050	435	333	62,2x
P-27		94020	69380	58540	1,4x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

Die in Tabelle 10 dargestellte Verbindung **P-23**, welche als Rest den un-substituierten Phenylring trägt, zeigte einen sehr hohen JNK1/JNK2-Selektivitätswert auf ($\approx 114x$). Gleichzeitig wurden für **P-23** nur geringe Aktivitäten auf JNK2 (305 nM) und JNK3 (234 nM) beobachtet. Wurde jetzt das zentrale Phenylmotiv gegen unterschiedlich substituierte Pyridine getauscht, konnte ein Regioisomeren-Effekt zwischen den Derivaten **P-24-P-26** festgestellt werden. Das entsprechende 2-Pyridinyl-Derivat (**P-24**) zeigte exzellente Isoform-Selektivität gegenüber JNK1 (≈ 300 -fach). Das 4-Pyridinyl-Derivat (**P-26**) zeigte noch eine Selektivität von 62-fach, wohingegen das 3-Pyridinyl-Derivat (**P-25**) abgefallene Potenzen gegenüber JNK2 (2758 nM) und JNK3 (1430 nM), sowie eine geringe JNK1/JNK2-Selektivität aufzeigte (≈ 10 -fach). Das Biphenyl-Derivat (**P-27**), zeigte kaum Aktivität auf allen Isoformen. Fraglich bleibt hierbei, ob der beobachtete Regioisomeren-Effekt aufgrund von Interaktionen des Pyridinstickstoffs mit seiner chemischen Umgebung innerhalb der Tasche zu Stande kam. Möglich wäre auch, dass dieser Effekt durch die unterschiedliche elektrische Beeinflussung des *Hinge*-bindenden Pyrazols durch das entsprechend *o*-,*m*-,*p*-ständige Pyridin-Derivat generiert wurde. Dafür sprechen würde, wie

in Abbildung 21 verdeutlicht, dass der Elektronenzug auf das Pyrazol von *meta*- zu *para*- nach *ortho*- hin steigen sollte, geht man nach den Hammett-Konstanten für die jeweiligen Pyridinyl-Gruppen.²¹¹

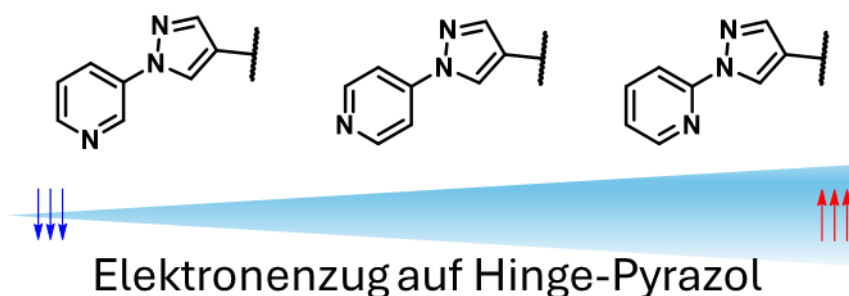


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Elektronenzugs auf das *Hinge*-bindende Pyrazol-Motiv.

Diese Testung konnte bestätigen, dass um hohe Selektivitätswerte gegenüber JNK1 zu erhalten keine zweite *Hinge*-Bindung über das westlich gelegene Amid-Motiv der Aminopyrazol-basierten Verbindungen notwendig war. Des Weiteren scheinen die HR-II-/solventgerichteten Reste potentiell nur wenig zur eigentlichen Selektivität beigetragen zu haben. Die erhaltenen IC₅₀-Werte deuteten darauf hin, dass die von Park et al. beschriebenen, selektivitätsbedingenden Wechselwirkungen innerhalb der HR-I auch von dem eingesetzten HR-I gerichteten Naphthylrest vermittelt werden.¹²⁰ Allerdings zeigten alle Vertreter der in Tabelle 10 dargestellten Reihe einen signifikanten Abfall der Aktivität gegenüber den Zielisofomen JNK2 und JNK3 im Vergleich zur Ausgangsverbindung **P-10**.

5.1.5.2 Derivatisierung des HR-II bzw. lösemitteladressierenden Motivs

Da vollständige Reduktion der westlichen HR-II- bzw. solventadressierenden Motive zwar zu einer deutlichen Selektivitätsverbesserung, aber auch zu einer Verschlechterung der Aktivitäten auf den Zielisofomen führte, wurde versucht die westliche, *Hinge*-bindende Amidstruktur beizubehalten, die daran gebundenen Reste jedoch drastisch zu verkleinern. Die entsprechend evaluierten Derivate sind in Tabelle 11 dargestellt. Dieser Ansatz wurde bereits von Feng et al. bei der Entwicklung von JNK3-selektiven Thiophen-Pyrazolharnstoff- und Aza-Indazol-basierten Testverbindungen verfolgt, die von der hier beschriebenen Aminopyrazol-Grundstruktur abstammen. In den entsprechenden Publikationen führte die einfache Verkleinerung des Amid-Restes meist zu besseren Selektivitäten gegenüber JNK1.^{132, 134}

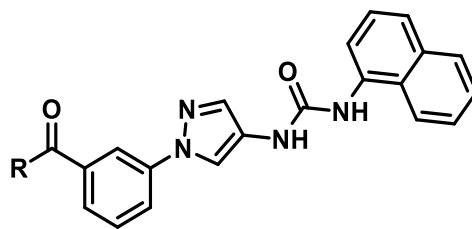


Tabelle 11: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit aliphatischen und alicyclischen Modifikationen die nach HR-II und LM dirigieren.

Nr.	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-28		6232	1130	615	5,5x
P-29		62620	4048	2536	15,5x
P-30		6981	289	359	24,2x
P-31		11630	138	187	84,2x
P-32		15030	102	54	147,8x
P-33		13580	157	223	86,6x
P-34		47500	5455	3353	8,7x
P-35		6299	874	396	7,2x
P-36		3718	963	417	3,9x
P-37		13450	637	334	21,1x
P-38		6076	73	45	83,5x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

Unter den in Tabelle 11 dargestellten, aliphatischen Amid-Derivaten ist ein eindeutiger Trend erkennbar. Je kleiner die aliphatische Seitenkette, desto besser sind sowohl Aktivitäten gegenüber JNK2 und JNK3 als auch die Selektivität gegenüber JNK1, wobei das entsprechende Methyl-Derivat (**P-32**) mit seiner 148-fachen Selektivität das Optimum darstellt. Das Ethyl- (**P-31**) sowie das un-substituierte Amid-Derivat (**P-33**) stellen nur leicht schlechtere Alternativen zu dem Methyl-Derivat dar. Das sterisch anspruchsvolle *tert*-butyl-

Derivat (**P-29**) zeigt niedrigere Aktivitäten als das 3-Pentyl-Derivat (**P-28**). Dies könnte daran liegen, dass eine *tert*-butyl-Gruppe, obwohl diese um eine Methyleinheit kürzer ist, sterisch weniger flexibel ist als eine 3-Pentyleinheit. Wie Verbindung **P-34** eindrücklich zeigt, kommt es zu einem drastischen Aktivitätsabfall wenn das Amid mit einem sekundären Amin, wie dem *N,N*-Dimethylamin gebildet wird. Diese SAR ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass bei dieser Verbindung die zweite Wasserstoffbrückeninteraktion mit dem Methionin-Rückgrat der *Hinge* nicht mehr ausgebildet werden kann, da die entsprechende Wasserstoffbrückendonatorfunktion wegfällt. Die Ausbildung dieser zweiten *Hinge*-Interaktion scheint sich entsprechend positiv auf die Aktivität auszuwirken. Der Austausch der Benzamid-Funktion gegen eine Benzoessäurefunktion (**P-35**) scheint ebenfalls die eben beschriebene Interaktion zur *Hinge* zu verschlechtern oder aufzulösen, was sich in den Aktivitätswerten widerspiegelt.

Betrachtet man die Selektivitäten sowie Aktivitäten der in Tabelle **11** dargestellten Verbindungen welche Alicyclen (**P-36-P-38**) beinhalten, so wird ersichtlich, dass mit einer Verkleinerung des 6-Rings zu einem 3-Ring, ein Trend zur Aktivitäts- & Selektivitätsverbesserung einhergeht. Vergleicht man das Isopropyl-Derivat **P-30** und das cyclische Analogon **P-38** so verbessert die Zyklisierung die Aktivität sowie Selektivität gegenüber JNK2/3. Aus dieser Reihe stellt Verbindungen **P-38** und **P-32** mit ihren ausreichend guten Aktivitäten auf JNK2 und JNK3, sowie den hohen Selektivitäten von 84-fach bzw. 148-fach gegen JNK1, Leitstrukturen dar. Diese wurden weiter charakterisiert.

Neben rein aliphatischen Resten wurden auch heteroaliphatische Gruppen, unter Anderem auch mit basischer Funktionalität, eingeführt. Die getesteten Verbindung sind in Tabelle **12** abgebildet.

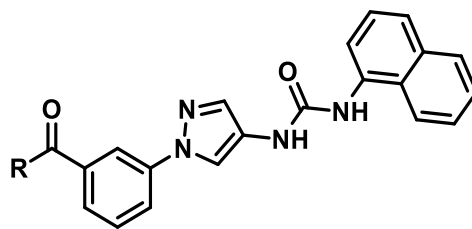


Tabelle 12: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit hetero-alicyclischen und pegylierten Modifikationen die nach HR-II und LM dirigieren.

Nr.	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-39 *		902	87	61	10,4x
P-40 *:**		502	38	32	13,4x
P-41 *:**		1022	88	65	11,6x
P-42 **		3827	156	118	24,5x
P-43 **		10830	319	244	33,9x
P-44		35050	4545	6069	7,7x
P-45		1379	115	126	12,0x
P-46		659	49	66	13,5x
P-47		5333	229	235	23,3x
P-48		8967	533	418	16,8x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben. * Als HCl-Salz isoliert. ** Als Racemat isoliert.

Den gleichen Trend wie bei den alicyclischen Derivaten folgend, ist beim Vergleich von Piperidin-Derivat **P-39** zu Pyrrolidin-Derivat **P-40** zu erkennen, dass kleinere Ringsysteme eher zu den gewünschten Effekten führten. Interessanterweise führte das Einführen von Methylene-*spacern* wie bei Verbindung **P-41** zu Testergebnissen, welche vergleichbar waren mit denen von Verbindungen, welche ein um eine Methylengruppe vergrößertes Ringsystem besaßen (**P-39**). Das entsprechende Tetrahydrofuran-Derivat (**P-42**) zeigte leicht verbesserte Selektivität (25x) im Vergleich zum Pyrrolidin-Analogon (**P-41**), die sich

durch die Substitution durch das entsprechenden Regioisomer (**P-43**), auf Kosten der JNK2/3-Aktivität noch weiter verbessern ließ (34x). Morpholin-Derivate (**P-44-P-46**) zeigten eine verbesserte Aktivität bzw., Selektivität bei einer Verlängerung der Kettenlänge des aliphatischen *spacers*, wobei Ethylenglycolamin-Derivate (**P-47 + P-48**) bei Verlängerung der Kettenlänge um ein Ethylenglycolmonomer einen inversen Effekt aufzeigten. Nichtsdestotrotz zeigen die beiden Verbindungen **P-47 & P-48** ausreichende Aktivität bzw. Selektivität, wodurch an die dort installierten PEG-Linker potentiell weitere Moleküle gebunden werden könnten um *Dual-targeting*- oder *Degrader*-Ansätze zu verwirklichen.^{212,}

213

Es wurden auch allylische, propargylische und fluoraliphatische Gruppen eingeführt. Die entsprechenden Derivate sind in Tabelle 13 dargestellt.

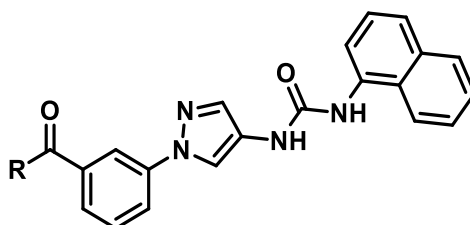


Tabelle 13: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit kurzen allylischen, propargylischen und fluorierten Modifikationen die nach HR-II und LM dirigieren.

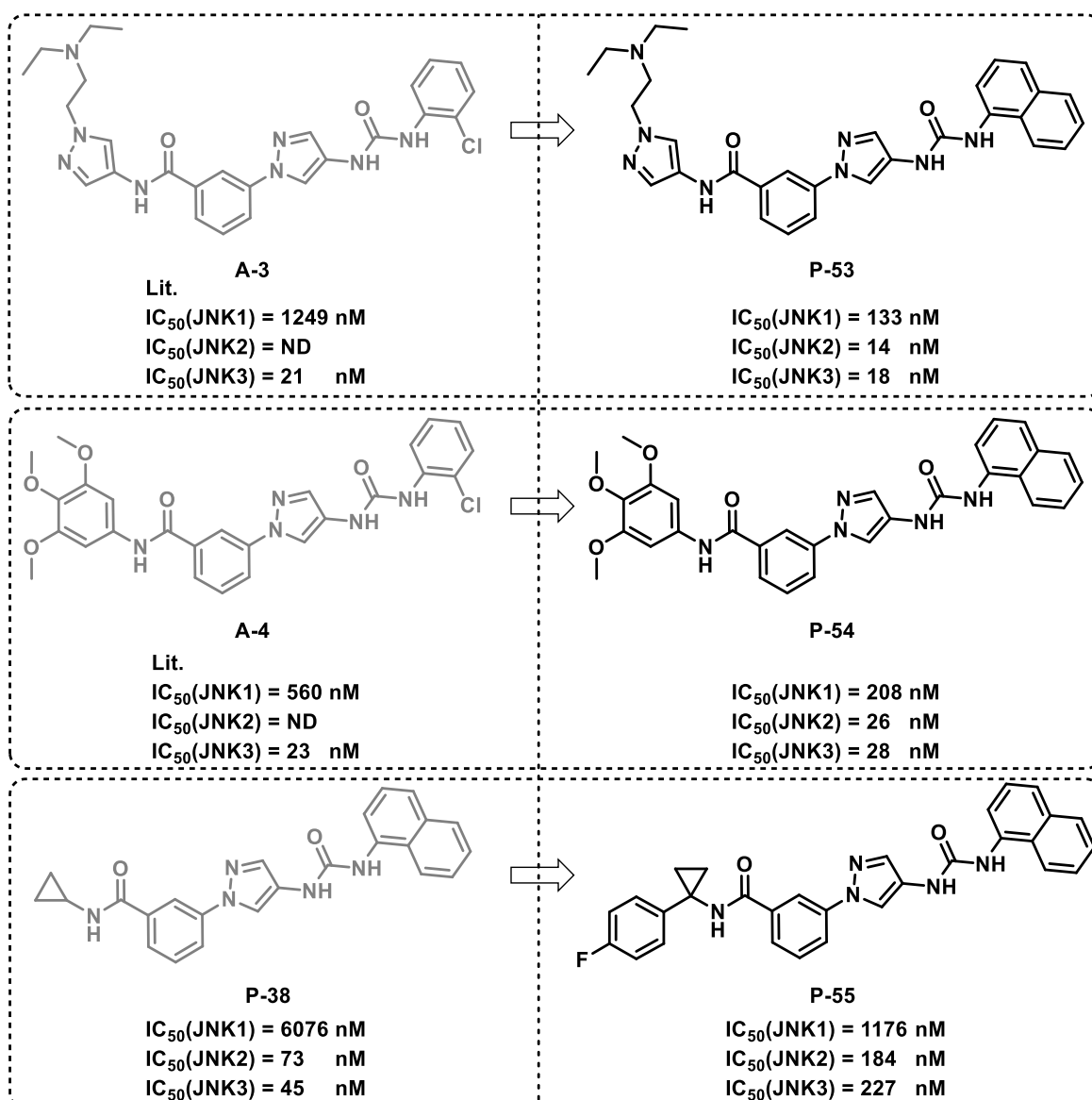
Nr.	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-49		19930	126	158	158,7x
P-50		18270	638	737	28,6x
P-51		1397	59	64	23,9x
P-52		13390	9598	9948	1,4x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

Auch hier schneiden kleinere, sterisch weniger anspruchsvolle Verbindungen (**P-49**) besser ab im Vergleich zu Verbindungen mit größeren Substituenten (**P-50**). Die fluorierte Verbindung **P-52** verlor sowohl an Aktivität als auch an Selektivität, wobei der Wechsel von einer Zweifachbindung zu einer Dreifachbindung die Aktivität bei Verbindung **P-51** auf Kosten der Selektivität verbessern konnte. Herauszustellen ist wiederum die exzellente Selektivität von Verbindung **P-49** mit Allylrest, was auch diese Verbindung zu eine der Leitstrukturen macht.

Wie in Schema 33 dargestellt, wurden auch komplexere HR-II-/ solventadressierende Reste als Amine eingeführt. Der Rest von Verbindung **P-53** stammte ursprünglich aus der gleichen

Reihe wie die Ausgangsverbindung **A-1**, aus der Ursprungspublikation von Zheng et al (**A-3**).¹³³ In besagter Publikation zeigte der abgebildete Inhibitor mit diesem Rest gleiche Aktivitätswerte wie die Ausgangsverbindung, bei besserer JNK1/JNK3-Selektivität (Werte für JNK2 nicht publiziert).¹³³ Da davon auszugehen war, dass die JNK3/JNK2-Selektivität für diese neue Referenzverbindung **A-3** $\approx 1x$ betragen sollte, erhoffte man sich durch das Übertragen des Restes eine Erhöhung der JNK1/JNK2-Selektivität. Eine entsprechende Verbesserung konnte für das neue Grundgerüst mit Naphthyl-Motiv nicht beobachtet werden. Gleiches wurde für Verbindung **P-54** erhofft, welche sich von **A-4** ableitete, einer Verbindung welche von Kamenecka et al publiziert wurde.²⁰⁷



Schema 33: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit literaturbekannten und komplexeren Modifikationen in HR-II-/ solventinteragierenden Region. Literatur-Werte wurden aus den entsprechenden Publikationen übernommen.^{133, 207}

Ergebnisse und Diskussion

Die Verbindung **P-55** wurde wiederum von der eigene Leitstruktur **P-38** abgeleitet. Das (Wieder-)Einführen einer aromatischen Struktur als HR-II Motiv wurde mit einer Erhöhung der Aktivität assoziiert (siehe bspw. **A-1**, **P-10** etc.). Bei diesem Ansatz wurden die Aktivitäten/ Selektivitäten im Vergleich zur Ausgangsverbindung **P-38** jedoch nur verschlechtert.

Bei allen hier diskutierten Modifikationen der HR-II-/ lösemitteladressierenden Komponente dieser Aminopyrazol-basierten Grundstruktur, wurden folgende SARs ersichtlich:

- Es ist keine Adressierung über ein Amidmotiv am zentralen Aromaten notwendig, um Inhibitoren mit hoher JNK1/JNK2-Selektivitäten zu erhalten (**P-23** & **P-24**). Die Selektivität liegt wohl in der Interaktion mit der HR-I begründet.
- Der Verlust einer zweiten Hinge-Interaktion über das westliche Amid-Motiv führt jedoch zu einem Aktivitätsabfall (**P-23** & **P-34**).
- Kleinere aliphatische und cycloaliphatische oder allylische westliche Amid-Motive führen zu Inhibitoren mit guten JNK1/JNK2-Selektivitäten, mit niedrig dreistelligen nanomolaren Aktivitätswerten gegenüber JNK2/3. Diese Inhibitoren (**P-32**, **P-38**, **P-49**) bilden einen Kompromiss aus gewünschter Selektivität und Aktivität.
- Der Verlust des zweiten, HR-II gerichteten Pyrazol-/ aromatischen Motivs führt zu einem signifikanten Aktivitätsabfall (siehe **P-10** vs **P-39**).

5.1.5.3 Linearisierung der Inhibitoren

Auch linearisierte Inhibitoren wurden über den $^{33}\text{PanQinase}$ -Assay evaluiert. Die entsprechenden Werte und Verbindungen sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Reste für die beiden Derivate **P-56** und **P-57** wurden hierbei von bis dato vorhandenen Leitstrukturen übernommen.

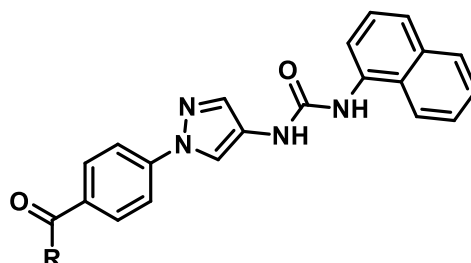


Tabelle 14: Biochemische Testwerte für linearisierte Aminopyrazol-Derivate.

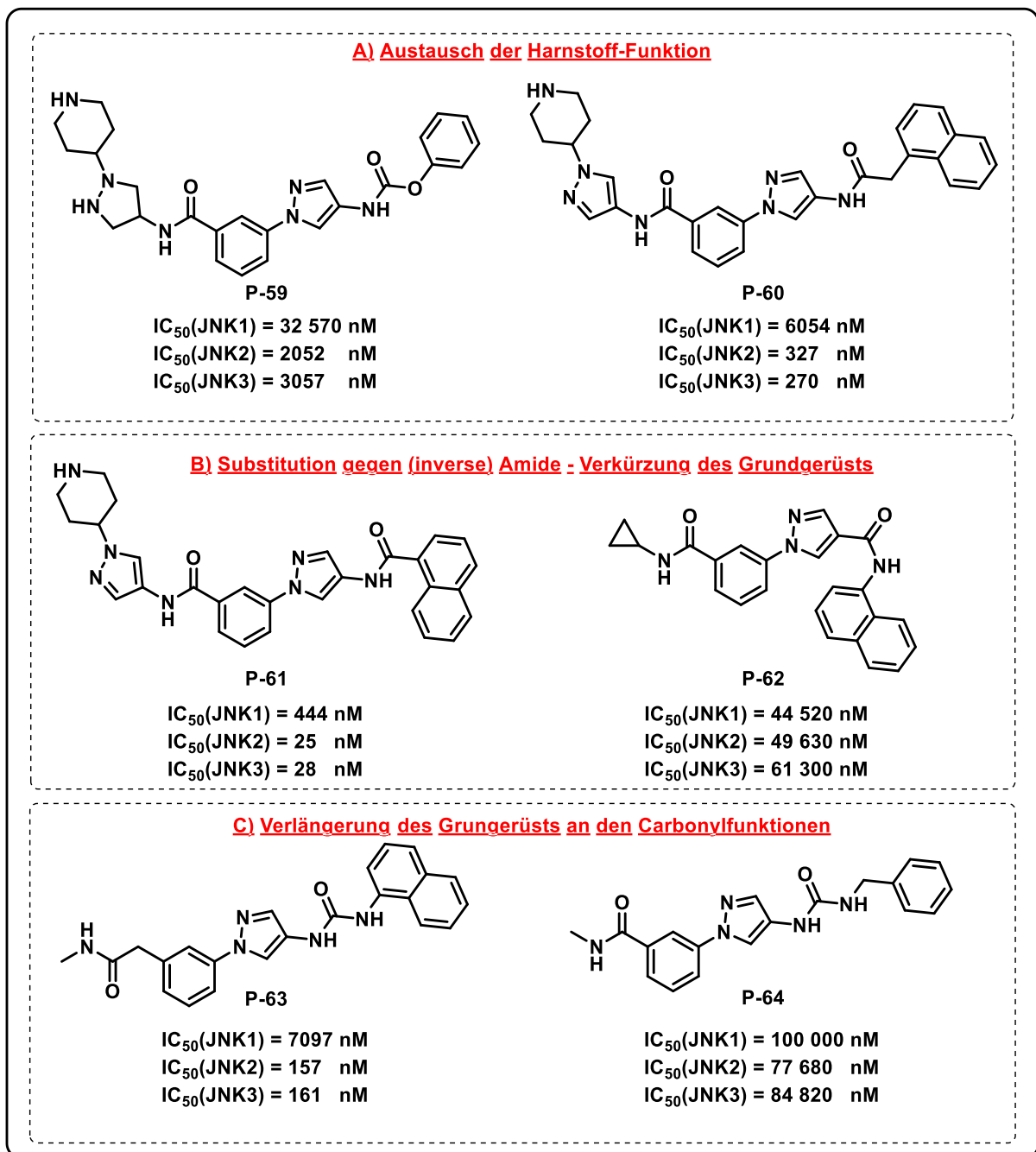
Nr.	R	$\text{IC}_{50}(\text{JNK1})$ $^{33}\text{PanQinase}$ [nM]	$\text{IC}_{50}(\text{JNK2})$ $^{33}\text{PanQinase}$ [nM]	$\text{IC}_{50}(\text{JNK3})$ $^{33}\text{PanQinase}$ [nM]	Selektivität: $\text{IC}_{50}(\text{JNK1})/$ $\text{IC}_{50}(\text{JNK2})$
P-56		20150	1510	834	13,3x
P-57		6549	2728	2947	2,4x
P-58		18500	1830	2146	10,1x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

Die Ergebnisse waren jedoch verhältnismäßig ernüchternd. Bei dieser Verbindungsklasse ist eine zweite *Hinge*-Interaktion über das Amid ebenfalls nicht möglich. Dazu kommen noch starke Löslichkeitsproblematiken aller drei Vertreter, welche die jeweilige Aufreinigung herausfordernd machten und sich potentiell auf die Aktivitätswerte auswirken könnten.

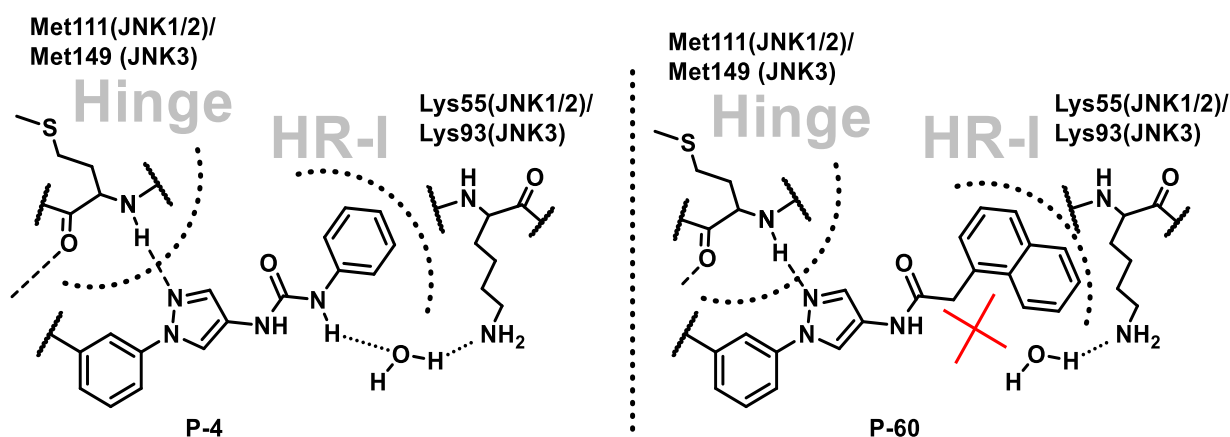
5.1.6 Modifikation an der HR-I-gerichteten Harnstofffunktion sowie Verlängerungen/ Verkürzungen der Grundstrukturen

Es wurden ebenfalls verschiedene Modifikationen an der Harnstofffunktion untersucht und in diesem Zuge auch, welche Auswirkungen eine Verlängerung, bzw. Verkürzung des Aminopyrazol-Grundgerüsts auf die JNK-Aktivität hat. Die entsprechenden Verbindungspärchen sind in Schema 34 mit ihren jeweiligen Testwerten abgebildet.



Schema 34: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit substituierter Harnstofffunktion sowie verlängerten oder verkürzten Carbonyl-Motiven.

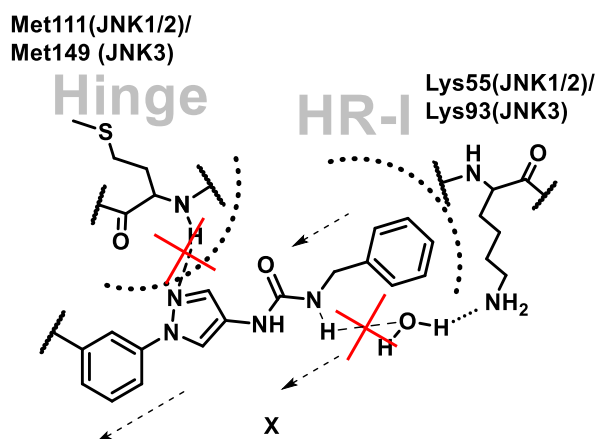
Die Substitution der Harnstoff-Funktion mit einer Carbamat-Funktion führte im Vergleich zur Ausgangsverbindung (**P-4**) zu einem starken Aktivitätsabfall, bei ähnlichen JNK1/JNK2-Selektivitäten. Der Austausch gegen eine Benzylamid-Funktion führte ebenfalls zu einem Aktivitätsabfall (**P-60**). Der hier substituierte Stickstoff scheint mit dem katalytischen Lysin über ein komplexiertes Wassermolekül, via Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung zu stehen. Dies ist aus diversen publizierten Kristallstrukturen, welche kokristallisierte Inhibitoren mit Aminopyrazol-Grundgerüst oder davon abgeleitete Grundstrukturen beinhalten, ersichtlich (PDB = 4WHZ; 8VNX; 7KSI etc.). Das Wegfallen der hierfür benötigten Wasserstoffbrückendonatorfunktion wird entsprechend nicht gut toleriert.



Schema 35: Postulierter Mechanismus für den Aktivitätsverlust der Verbindungen **P-59** & **P-60** durch die jeweiligen Substitutionen des Harnstoffs.

Gegen manche Funktionalitäten scheint die Harnstoff-Funktion allerdings austauschbar. Die Substitution mit einem Naphthylamid wurde mit Inhibitor **P-61** verwirklicht, welcher niedrige zweistellig-nanomolare Aktivitätswerte gegenüber JNK2/3 zeigte. Wird diese Amidfunktion invertiert, verlieren die Inhibitoren ihre komplette Aktivität auf den JNK-Isoformen (siehe Inhibitor **P-62**). Denkbar wäre, dass die Wasserstoffbrücke zu dem zwischengelagerten Wasser auch über die Carbonylfunktion als Wasserstoffbrückenakzeptor aufgebaut werden kann, sofern die Orientierung des Carbonyls hierfür geeignet ist.

Wird nun die Harnstoff-Funktionalität beibehalten, aber eine weitere Methyleinheit zwischen Aromat und Harnstoff eingefügt, wie bei Inhibitor **P-64** der Fall, so ist der Inhibitor inaktiv. Postulieren ließe sich, dass der Inhibitor aufgrund der Verlängerung keine *Hinge*-Interaktion mehr aufbauen kann siehe Schema **36**.



Schema 36: Postulierter Mechanismus für vollständigen Aktivitätsverlust von Inhibitor **P-64**.

Wird jedoch wie bei Inhibitor **P-63** das HR-II gerichtete Amid-Motiv um eine Methylenheit verlängert, so wird diese Änderung sehr gut toleriert, auch wenn die Aktivität gegenüber JNK1 besser und damit die JNK1/JNK2-Selektivität schlechter wird im Vergleich zur Leitstruktur **P-38**.

5.1.7 Kombination bekannter SARs aus den bisher beschriebene Studien

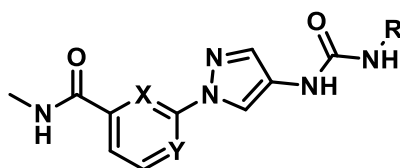


Tabelle 15: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit kombinierten Motiven.

Nr.	R	X	Y	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-65		N	CH	20550	400	686	51,3x
P-66		N	CH	22610	2873	2551	7,9x
P-67		CH	N	44840	533	630	84,1x
P-68		CH	N	83850	3935	2501	21,3x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

In Tabelle **15** sind die kombinatorisch designten Moleküle dargestellt, welche alle bis dahin gesammelten positiven SARs in sich vereinen sollten:

In sich vereinigte SARs:				Inhibitor
1)	Naphthylgruppe Referenz)	Richtung	HR-I (2,6-Difluorphenyl als	P-10
2)	2-Pyridinyl-Gruppe anstatt zentralem Phenyl			P-24
3)	Methylamid	Richtung	HR-II/ Solvent	P-32

Da nicht genau vorhergesagt werden konnte, ob der 2-Pyridinyl-Stickstoff durch die Kombination mit einem *meta*-ständigen Amid-Motiv für den idealen Effekt, Richtung *Hinge* oder entgegen der *Hinge* orientiert werden sollte, mussten sowohl Picolinsäure-Derivate (**P-65 + P-66**) als auch Isonicotinsäure-Derivate (**P-67 + P-68**) synthetisiert und evaluiert werden. Aufgrund von einer aktuell erscheinenden Publikation, kamen auch di-halogenierte Aromaten als HR-I besetzendes Motiv in Frage.¹³⁴ Entsprechend wurden auch die jeweiligen 2,6-Difluorphenyl-Derivate (**P-66 + P-68**) hergestellt.

Wie in Tabelle **15** dargestellt, konnten jedoch die einzelnen SARs nicht ohne Weiteres miteinander kombiniert werden um die gewünschten Aktivitätswerte zu erzielen. Auch wenn Verbindung **P-67** mit einer JNK1/JNK2-Selektivität von 84-fach ausreichende Selektivität zeigt, so sind jedoch die Aktivitäten auf den Zielstrukturen lediglich im mittleren dreistelligen-nanomolaren Bereich. Die beiden Moleküle mit 2,6-Difluorphenyl-Struktur (**P-66 + P-68**) zeigten deutlich schlechtere IC₅₀-Werte wie die entsprechenden Naphthylanaloge.

5.1.8 Invertierung der Amidkomponenten

Neben den bereits beschriebenen Substitutionsuntersuchungen der HR-I orientierten Carbonyl-Funktion, wurde auch die westlich gewandte Amidgruppe des zentralen Aromaten substituiert und invertiert um die in Tabelle **16** dargestellten Inhibitoren zu erhalten.

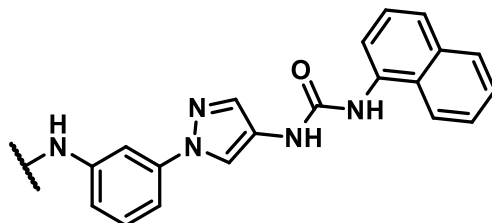


Tabelle 16: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit invertierten und substituierten westlichen Amid-Motiv.

Nr.	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)	Selektivität: IC ₅₀ (JNK3)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-69		76130	456	353	167,0x	0,8x
P-70		14680	720	749	20,4x	1,0x
P-71		3101	319	339	9,7x	1,1x
P-72		35370	2568	3206	13,8x	1,3x
P-73		> 100000	294	270	≥ 340,1x	0,9x
P-74		33530	226	1389	148,1x	6,1x
P-75		684	31	52	22,1x	1,7x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

Über reduktive Aminierungen wurde die Derivate **P-69** und **P-70** realisiert. Die entstanden Aniline zeigten moderat gute (**P-70**) bis sehr gute JNK1/JNK2-Selektivitätswerte mit einem Faktor von 167-fach für Inhibitor **P-69**.

Das Einführen eines (inversen) Cyclopropyl-Sulfonamids (**P-71**) führte zu um ca. den Faktor 10 besseren Aktivitäten auf JNK1/2/3 wie das korrespondierende inverse Amid (**P-72**). Das weitere Verkleinern des inversen Amidrestes zum Acetamid jedoch, führte zu einem kompletten Verlust der JNK1 Aktivität, bei gleichzeitig niedrig dreistellig nanomolaren

Aktivitäten für JNK2 und JNK3. Das entsprechende Derivat **P-73** stellt aufgrund seiner exzellenten JNK1/JNK2-Selektivität von ≥ 340 -fach eine weitere Leitstruktur dar.

Interessante Ergebnisse zeigte das abgeleitete Trifluoracetamid-Derivat **P-74**. Dieses besitzt nicht nur gute JNK1/JNK2-Selektivität (148-fach), sondern auch eine leichte Selektivität gegenüber JNK3 (6-fach). Wie in Abbildung **11** (chemischer Teil) dargestellt, gehen jedoch nur begrenzt Interaktionen von diesen solvent-gerichteten Motiven aus. Es ist weiterhin zu beachten, dass die generierten Werte Einzelmessungen darstellen. Um hieraus eine SAR zur schwierig zu realisierenden Selektivität zwischen JNK2 und JNK3 ableiten zu können, müssten zumindest Triplikate bei dieser Verbindung nachgemessen werden. Es verbleibt unklar, an welcher Interaktion dieser Effekt liegen könnte.

Der Logik der ursprünglichen Amid-Derivate folgend, führte das „Wiedereinführen“ von aromatischen Resten, auch bei den inversen Amid-Derivaten, zu einer deutlichen Verbesserung der Aktivitäten auf JNK2/3, was durch Verbindung **P-75** gezeigt werden konnte.

5.1.9 Derivatisierung am Kernaromaten

Es wurde weiterhin eine kurze Studie zu dem Einfluss von Substituenten am zentralen aromatischen Kern durchgeführt. Da ähnliche Derivate mit Fluor-Substitutionen am entsprechenden Phenyl-Rest von Zheng et al. bereits synthetisiert und evaluiert wurden, wurde sich dazu entschieden Methylsubstitutionen genauer zu untersuchen.¹³³ Wie im chemischen Teil bereits beschrieben, konnten, wohl aufgrund von sterischen Problemen, allerdings nur Derivate mit Methylgruppen in den Positionen 2 und 3 hergestellt werden. Synthetisch aufwendig installiert werden konnte auch eine NH₂-Gruppe in Position 3.

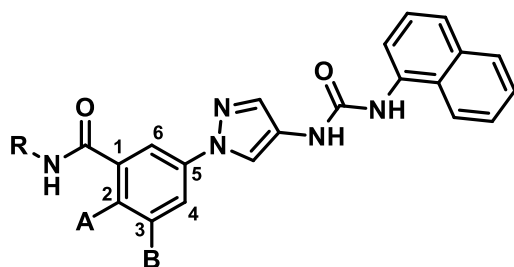


Tabelle 17: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit modifiziertem zentralen Aromaten.

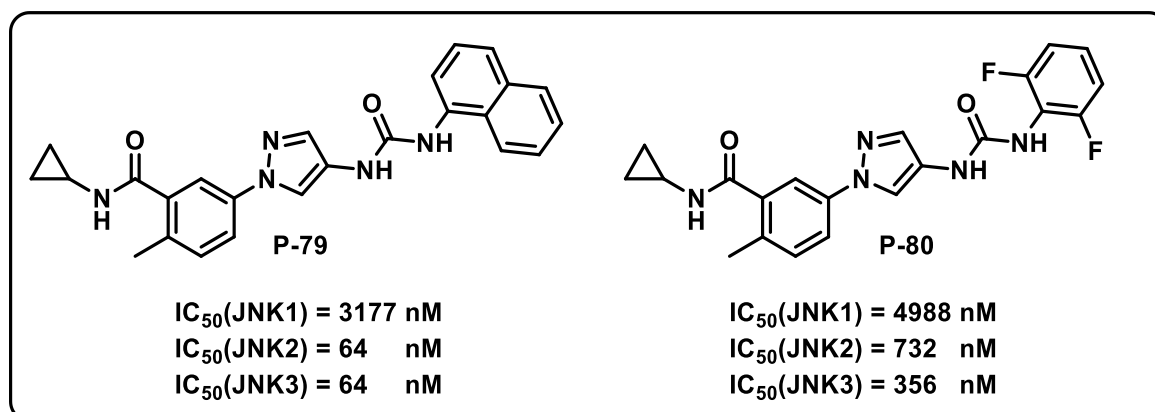
Nr.	R	A	B	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-76*		H	CH ₃	356	26	29	13,8x
P-77*		CH ₃	H	49	4	6	11,3x
P-78		H	NH ₂	29070	161	224	180,7x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben. * Als HCl-Salz isoliert.

Grundsätzlich wurden eingeführte Gruppen am zentralen Aromaten sehr gut toleriert. Das Einführen einer Methylgruppe in Position 3 (**P-76**) führte im Vergleich zur Ausgangsverbindung ohne Substitution (**P-10**) zu einem leichten Aktivitätsabfall auf allen drei Isoformen. Eine Methylierung in Position 2 wiederum führte zu einer leichten Aktivitätssteigerung auf alle drei getesteten Isoformen (**P-77**). Eine anilinische Funktion in Position 3 (**P-78**) führte im Vergleich zur Ausgangsverbindung **P-32** zu einer leichten Erhöhung der JNK1/JNK2-Selektivität, sowie zu einer leichten Verschlechterung der

Aktivitäten auf alle drei Isoformen. Die nominellen Unterschiede zwischen der kernsubstituierten Hemmstoffen und den jeweiligen Ausgangsverbindungen sind jedoch relativ gering und die Größe dieses Sets an Inhibitoren ist verhältnismäßig klein. Multiplikats-Messung sind zwangsläufig notwendig, um die beschriebenen Effekte gesichert zu belegen.

Trotzdem, wurde aufgrund von diesen Erkenntnissen die beiden in Position 2 methylierten Derivate **P-79** & **P-80** generiert und getestet, welche in Schema 37 dargestellt sind.

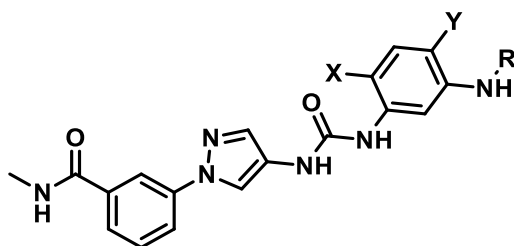


Schema 37: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit kombinierten Motiven.

Interessanterweise zeigte die Verbindung **P-79**, ähnlich wie die ebenfalls in Position 2 methylierte Verbindung **P-77** die eben beschriebene, wenn auch geringe, Aktivitätssteigerung im Vergleich zur nicht methylierten Ausgangsverbindung (**P-38**). Das Derivat **P-80** war dem entsprechenden Naphthyl-Derivat **P-79** unterlegen, was auch aus den in Tabelle 15 gezeigten Daten ersichtlich war.

5.1.10 SAR von Inhibitoren vom potentiellen Typ I $\frac{1}{2}$

Angestoßen von publizierten KinomScreen-Daten für den Inhibitor **LN2258** (siehe Abbildung 13, Kapitel 3.8), einem p38 α -Inhibitor vom Typ I $\frac{1}{2}$, wurde die in Tabelle 18 dargestellte Verbindungs-Reihe entwickelt.¹⁶⁸ Ziel war es, einen weiteren Unterschied in der Aminosäuresequenz zwischen JNK1/3 (Met77/ Met115) und JNK2 (Leu77; p38 α = Leu75) aus zu nutzen. Der hierdurch entstehende größere, räumliche Platz im Fall der JNK2 und die damit bessere Zugänglichkeit der *R-Spine* sollte das Einbringen von bekannten, bereits bei p38 α -Inhibitoren etablierten Typ I $\frac{1}{2}$ -Resten besser zulassen als bei den Isoformen JNK1 & JNK3.¹⁶⁹

Tabelle 18: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit bekannten Motiven von Typ I $\frac{1}{2}$.

Nr.	R	X	Y	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)	Selektivität: IC ₅₀ (JNK3)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-84		H	H	31510	12120	23750	2,6x	2,0x
P-85		H	H	25560	13200	40390	1,9x	3,1x
P-86		H	H	17750	23650	33660	0,8x	1,4x
P-87		H	H	6964	19520	30710	0,4x	1,6x
P-88		F	H	97850	44640	> 100000	2,2x	2,2x
P-89		H	F	> 100000	17890	53170	5,6x	3,0x
P-90		F	F	26550	3301	13050	8,0x	4,0x

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

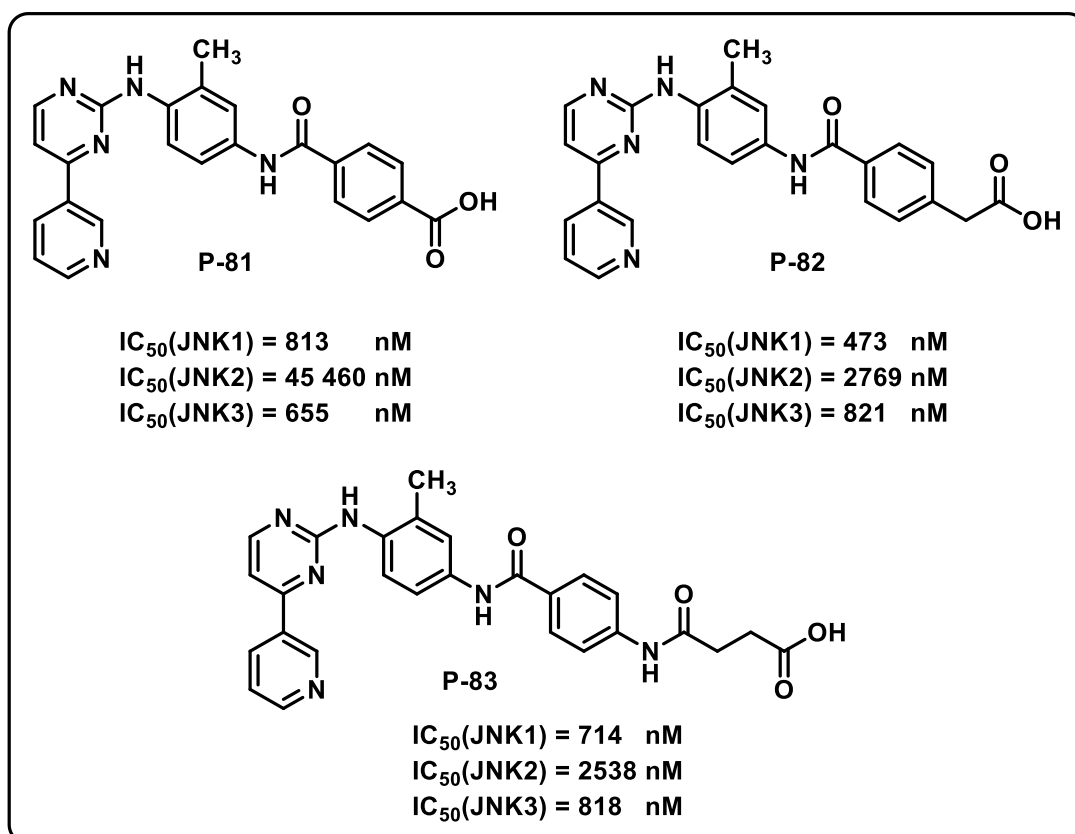
Die Testung der generierten Verbindungen zeigte eine Reihe von Tendenzen, jedoch nur bedingt scharfe SARs auf. Eine gewünschte, wenn auch leichte Selektivität gegenüber JNK3 konnte teilweise realisiert werden, wobei die ebenfalls benötigte Selektivität gegenüber JNK1 nur geringfügig erreicht wurde. Von den in Tabelle 18 dargestellten Verbindungen mit bekannten *R-Spine* interagierenden Resten, kombiniert mit einem unfluorierten aromatischen *Linker*, zeigten alle entsprechenden Derivate jeweils fünfstelligen nanomolare Aktivitätswerte auf allen Isoformen auf (**P-84-P-87**). Darunter zeigte das Cyclopropyl-Derivat (**P-85**) eine leichte JNK3/JNK2-Selektivität (3-fach). Wurde eine *Linker*, welcher in Position 2 fluoriert wurde verwendet, führte dies in Kombination mit einem Bezoensäureamid-Motiv zu einem praktisch kompletten Aktivitätsverlust auf allen drei Isoformen (**P-88**). Die Fluorierung an Position 4 des aromatischen Linkers wurde besser toleriert (**P-89**). Im Vergleich zu dem unfluorierten Derivat (**P-85**) zeigte Inhibitor **P-89** eine verbesserte JNK1/JNK2- (5,6-fach) als auch eine geringe JNK3/JNK2-Selektivität (3,0-fach). Ähnlich wie bei den etablierten p38 α -Inhibitoren bei p38 α , führte eine Bis-Fluorierung an sowohl der 2-, als auch der 4-Position den *Linkers* zu einer verbesserten Aktivität auf JNK2.¹⁶⁹ Obwohl sich die Aktivität von Inhibitor **P-90** gegenüber JNK2 noch im vierstelligen nanomolaren Bereich befand, konnte jedoch eine Verbesserung der Selektivität gegenüber JNK1 (8x) und JNK3 (4x) verzeichnet werden.

Dieser Ansatz, bekannte Typ I $\frac{1}{2}$ -Reste der p38 α -selektiven Benzosuberone-Grundstruktur auf das Aminopyrazol-Grundgerüst zu übertragen, war entsprechend teilweise erfolgreich. Es scheint eine gewisse Selektivität über das Adressieren der *R-Spine*, bzw. des darin befindlichen Leu77 erreichbar. Allerdings ist davon auszugehen, dass sich der in HR-I befindliche Linker sowie der Amid-Rest nicht in der genau gleichen Ausrichtung die HR-I bzw. die *R-Spine* adressieren wie bei dem Benzosuberone-Grundgerüst. Gleichzeitig ist es nicht auszuschließen, dass durch das Einbringen dieser auf p38 optimierten Reste eine unerwünschte Aktivität auf p38 entstehen könnte. Das Evaluieren weiterer Derivate ist nötig um die hier gesehenen Selektivitätseffekte genauer zu ergründen. Unter den zu untersuchenden Modifikationen würden fallen:

- Wechsel der Harnstoff-Funktion in eine anilinische oder Amid-Funktion bei der Verknüpfung mit „Verlinkten“ Typ I $\frac{1}{2}$ - Resten.
 - ⇒ Weiteres Angleichen an die Verbindung **LN2258**.
- Screenen von weiteren *R-Spine* interagierenden Resten, sowie Substitution der verknüpfenden Amid-Funktionalität.
 - ⇒ Hierbei Beibehalten des aktivitätsverbessernden 2,4-Difluor-*Linker*-Substitutionsmusters.
- Screenen von anders substituierten und allgemein anderer *Linker*-Gruppen.
 - ⇒ Einführen des etablierten Naphthylmotifs.

5.1.11 Adressierung von His120 über ionische Wechselwirkungen

Wie im Kapitel **3.9** des chemischen Teils bereits erörtert, wurde mit der Imatinib-ähnlichen **JNK-IN-8** Grundstruktur eine weitere Strukturklasse untersucht und modifizierte Derivate davon generiert bzw. getestet, welche in Schema **38** dargestellt sind. Hierbei wurde versucht, wie in Abbildung **14** (chemischer Teil) dargestellt, den leicht basischen Imidazol-Rest der His120-Aminosäure über eine Salzbrücke zu adressieren. Nur die JNK2-Isoform besitzt in dieser Position eine basische Aminosäure (JNK1/3 = Gln120/158). Entsprechend wurde sich von diesem Ansatz reine JNK2-hemmende Wirkung versprochen.



Schema 38: Biochemische Testwerte für von **JNK-IN-8** abgeleiteten Testverbindungen mit potentiell His120 adressierenden, sauren Motiven.

Wie in Schema **38** ersichtlich, wurde jedoch ein inverser Effekt beobachtet. Die drei synthetisierten Derivate, welche saure Gruppen beinhalten, zeigten eine Selektivität gegen die JNK2-Isoform auf. Entsprechend wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Es ist nicht auszuschließen, dass das entsprechend anvisierte Histidin sich zu weit weg von der Bindetasche befindet und es so nicht zu einer Interaktion mit der Carbonsäuren kommen konnte.

5.1.12 Biochemische Evaluation von kovalenten Inhibitoren

Mit einer letzten Verbindungsreihe wurde ein kovalenter Ansatz am Aminopyrazol-Grundgerüst ausgetestet. Wie im chemischen Teil unter Kapitel **3.10.1** beschrieben, entsprechen die in Tabelle **19** evaluierten Moleküle einer Kombination aus dem bereits etablierten, kovalenten pan-JNK-Inhibitor **JNK-IN-8** bzw. dem Imidazol-basierten Inhibitor **LN2332** und dem hier entwickelten Aminopyrazol-Grundgerüsts mit inverser westlicher Amidfunktion (**P-73**).^{116, 118, 135}

Um neben den Derivaten mit reaktivem, elektrophilen Acrylamid-Rest auch eine unreaktive Negativprobe zu generieren und zu evaluieren, wurden die entsprechenden unreaktiven Propylamid-Analoga, als auch die eigentlichen, potentiell kovalent-bindenden Molekülen getestet.

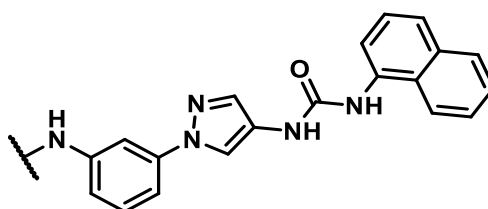


Tabelle 19: Biochemische Testwerte für Aminopyrazol-Derivate mit potentiell kovalenten Warheads und den entsprechenden unreaktiven Propionylamid-Resten.

Nr.	R	IC ₅₀ (JNK1) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK2) ³³ PanQinase [nM]	IC ₅₀ (JNK3) ³³ PanQinase [nM]	Selektivität: IC ₅₀ (JNK1)/ IC ₅₀ (JNK2)
P-91		26300	7090	7725	3,7x
P-92		7625	1314	1922	5,8x
P-93		18360	3838	5201	4,8x
P-94		> 100000	830	1909	120,5

Die Hemmdaten wurden von der CRO Reaction Biology Europe GmbH (Freiburg i. Br., DE) als Einzelmessungen erhoben.

Die so erhaltenen Aktivitätswerte zeigen den Trend, dass Verbindungen mit *para*-substituierten *Linker* (**P-91 + P-92**), sowohl mit Acrylamid-/ als auch Propionylamidrest, im Vergleich zu Verbindungen mit *meta*-substituierten *Linkern*, zu schlechteren

Ergebnisse und Diskussion

Aktivitätswerten auf allen drei JNK-Isoformen führen. Dazu sind die Verbindungen mit Propionylamidrest (**P-91 + P-93**) deutlich weniger potent wie die analogen Acrylamid-Derivate (**P-92 + P-94**). Die Testverbindung **P-94** mit *meta*-ständigem Acrylamid-substituierten *Linker* zeigt im Gegensatz zu allen anderen Verbindungen dieser Reihe eine signifikante JNK1/JNK2-Selektivität (121-fach). Dazu zeigt diese Verbindung eine sub-mikromolare Aktivität auf JNK2. Bei der Betrachtung der erhaltenen IC₅₀-Werte für die evaluierten, potentiell kovalenten Inhibitoren, muss beachtet werden, dass aufgrund der bereits ausgeführten Zeitabhängigkeit der Ausbildung einer (irreversiblen) kovalenten Bindung, Endpunkt-/ IC₅₀-Bestimmungen nur bedingt für die Evaluierung von echten, kovalent-bindenden Inhibitoren geeignet sind. Ein besseres Maß für kovalente Inhibitoren ist die Inaktivierungseffizienz, ausgedrückt über die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_{inact}/K_i .^{180, 181}

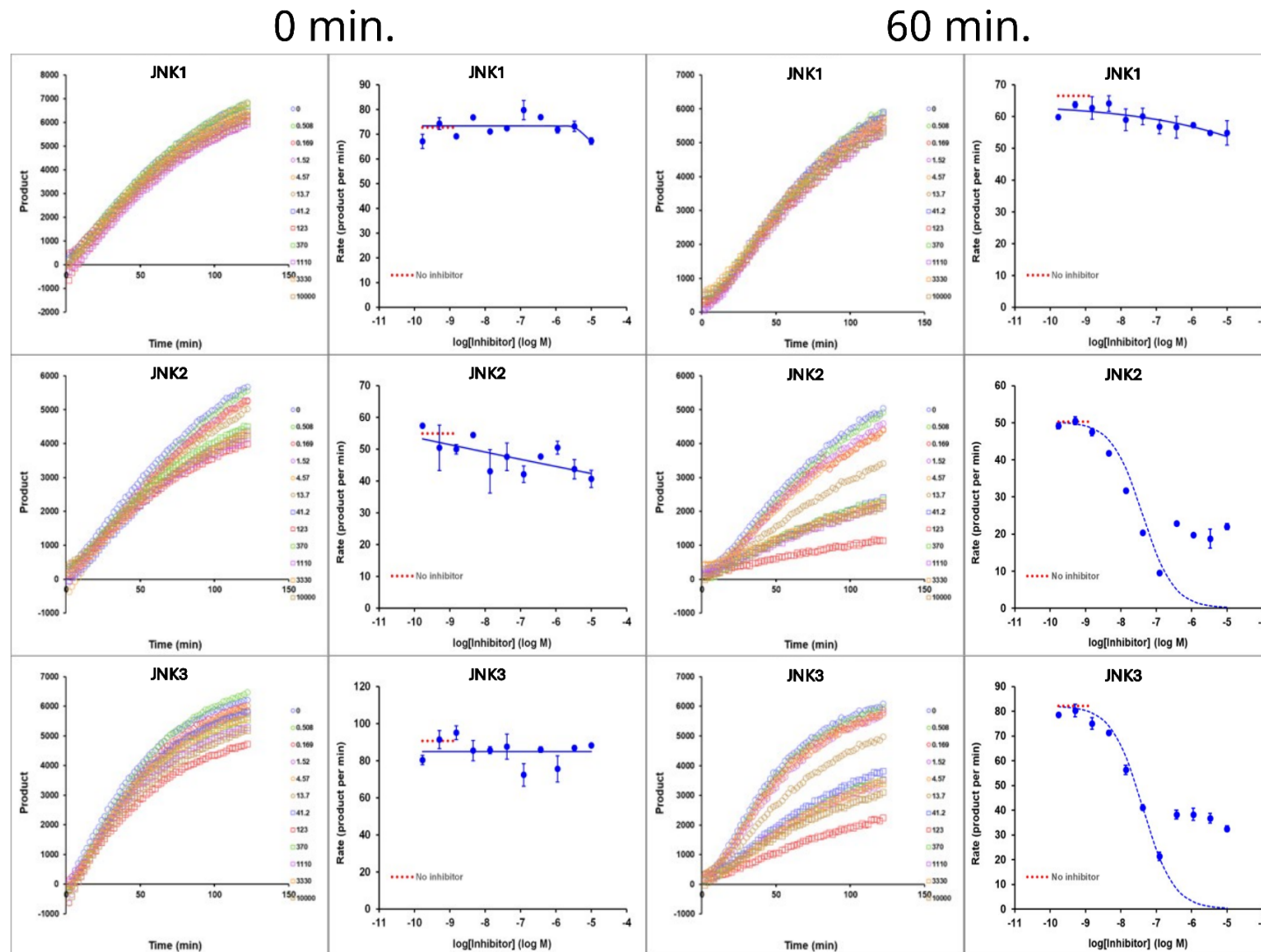
Im Vorfeld der angestrebten k_{inact}/K_i -Bestimmung der beiden potentiell kovalent-agierenden Inhibitoren (**P-92 + P-94**) musste die Zeitabhängigkeit der Inhibition (*Time-Dependent-Inhibition (TDI)*) als zentrales Charakteristikum einer kovalenten Modulation bewiesen werden. Hierzu wurde eine zweifach IC₅₀ (K_i)-Bestimmung im PhosphoSense-Assaysystem durchgeführt. Einmal wurden die Inhibitoren 60 min. vor ATP-Zugabe und eigentlicher Aktivitätsmessung prä-inkubiert und einmal ohne Präinkubation vermessen. Die darauf folgende Assay-Laufzeit belief sich auf jeweils 240 min. Ob folglich eine Zeitabhängigkeit der Inhibition (TDI) vorliegt, lässt sich nach der Beschreibung des CROs (AssayQuant) anhand von zwei Beobachtungen festmachen. Sofern man die Umwandlung in das phosphorylierte Sox-Substrat gegen die Zeit aufträgt (siehe Abbildungen **22 + 23**), sollten sich bei dem Auftreten von TDI diese zwei Beobachtungen aus dem entsprechenden Kurvenverlauf erkennen lassen:²¹⁴

- 1) Inhibitoren welche TDI aufzeigen sollten bei der Auftragung der 0 min Kohorte keinen linearen Kurvenverlauf in Ihren Verlaufskurven besitzen (Auftragung Produkt über Zeit).
 - 2) Bei den Verlaufskurven mit 60 min. Präinkubation müsste man eine Linearisierung der Kurven beobachten.
- ⇒ Die Kurvenverläufe liefern entsprechend Anzeichen von TDI für Inhibitor **P-94** (siehe Abbildung **22**), allerdings nicht für Inhibitor **P-92** (siehe Abbildung **23**), und auch nur für die Isoformen JNK2 und JNK3 aber nicht für JNK1.

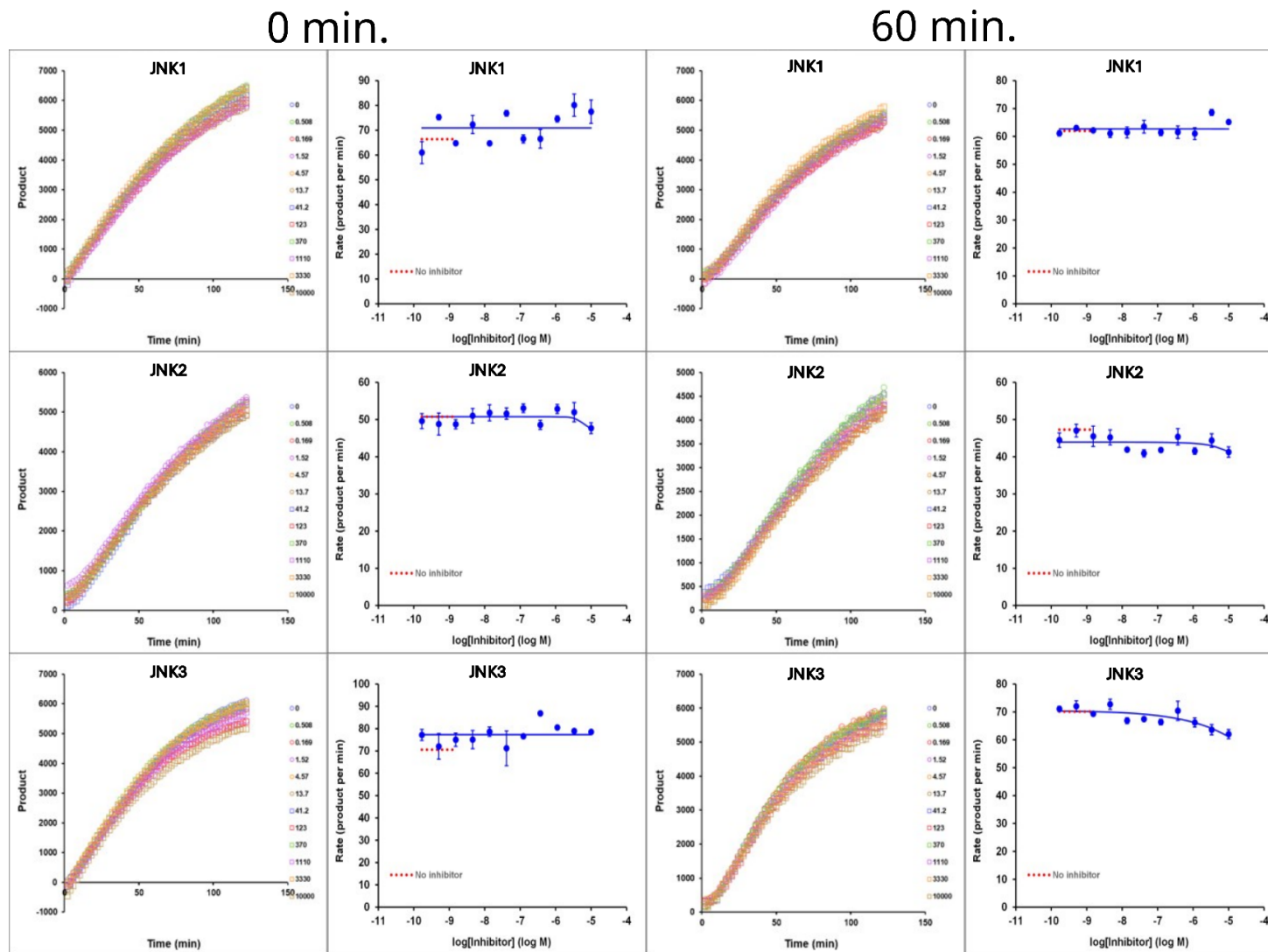
Trägt man nun die Umsetzungsrate gegen den dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration auf, erhält man die jeweiligen Dosis-Wirkungskurven, aus denen sich der IC_{50} bestimmen lässt. Über die Cheng-Prusoff-Gleichung lässt sich wiederum die in **Tabelle 20** ebenfalls dargestellte Inhibitionskonstanten K_i berechnen:²¹⁵

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Für den Inhibitor **P-94** ist zu beobachten, dass diese Dosis-Wirkungskurven bei der 0 min. Kohorte sehr flach verlaufen (Abbildung **22**; 0 min; blaue Auftragungen), was sich in einem IC_{50} -/ K_i -Wert über der Nachweisgrenze und damit von > 10000 nM niederschlägt. Die entsprechenden Werte sind in **Tabelle 20** aufgelistet. Lediglich für die Testung mit 60 minütiger Präinkubation und ausschließlich bei den Isoformen JNK2 und JNK3 und nur für Inhibitor **P-94** und nicht für dessen linearisiertem Analogon (**P-92**), konnten Kurven welche näherungsweise sigmoidale, auswertbare Verläufe zeigen, erhalten werden. Wie jedoch zu erkenne ist, besaßen die beiden Kurven einen sichtbaren „Hook-Effekt“ bei den vier höchsten Konzentrationen (Abbildung **22**; 60 min; blaue Auftragungen). Diese Werte wurden entsprechend bei den angewendeten *Fitting*-Methoden und der Bestimmung der IC_{50} -Werte nicht berücksichtigt. Es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt durch Präzipitation des Wirkstoffs im hauptsächlich wässrigen Assay-Puffermedium zu Stande kam.

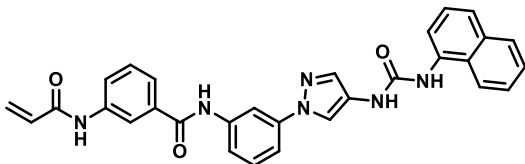
Abbildung 22: TDI-Analyse von Inhibitor **P-94** im PhosphoSense-Assay ohne (0 min.) und mit Präinkubation (60 min.) für alle drei JNK-Isoformen.*

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO AssayQuant Technologies Inc. (Marlborough, MA, USA) erhoben und erstellt.

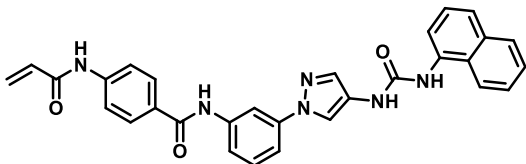
Abbildung 23: TDI-Analyse von Inhibitor **P-92** im PhosphoSense-Assay ohne (0 min.) und mit Präinkubation (60 min.) für alle drei JNK-Isoformen.*

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO AssayQuant Technologies Inc. (Marlborough, MA, USA) erhoben und erstellt.

Tabelle 20: IC₅₀ und K_i-Bestimmung der potentiell kovalent-bindenden Verbindungen via PhosphoSense-Assay*



P-94



P-92

Nr.	JNK1				JNK2				JNK3			
	0 min.		60 min.		0 min.		60 min.		0 min.		60 min.	
	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]
P-94	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	<u>25</u>	<u>13</u>	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	<u>40</u>	<u>20</u>
P-92	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴	>1*10 ⁴

* Die Hier gezeigten Daten wurden von der CRO AssayQuant Technologies Inc. (Marlborough, MA, USA) erhoben. Werte wurde im Duplikat bestimmt.

Bei dem direkten Vergleich der erhaltenen IC₅₀-Werte aus dem PhosphoSense-Assay mit denen aus dem ³³PanQinase-Assay wird schnell klar, dass Inhibitor **P-94** auf dem von AssayQuant angebotenen Assay deutlich besser abschneidet. Dies ist sicherlich, zu einem hohen Anteil auf die 60 min. Präinkubationszeit zurückzuführen, bei dieser der Inhibitor nicht mit hohen Mengen an ATP (Konzentration = K_m der jeweiligen Isoform) um die Bindetasche konkurriert, wonach k_{on} während dieser Zeitperiode entsprechen hoch ausfällt. Es muss jedoch beachtet werden, dass IC₅₀-Werte welche aus unterschiedlichen Assays mit unterschiedlichen Auslesemethoden, Substraten sowie Substrat-Konzentrationen resultieren, nur bedingt aussagekräftig verglichen werden können.

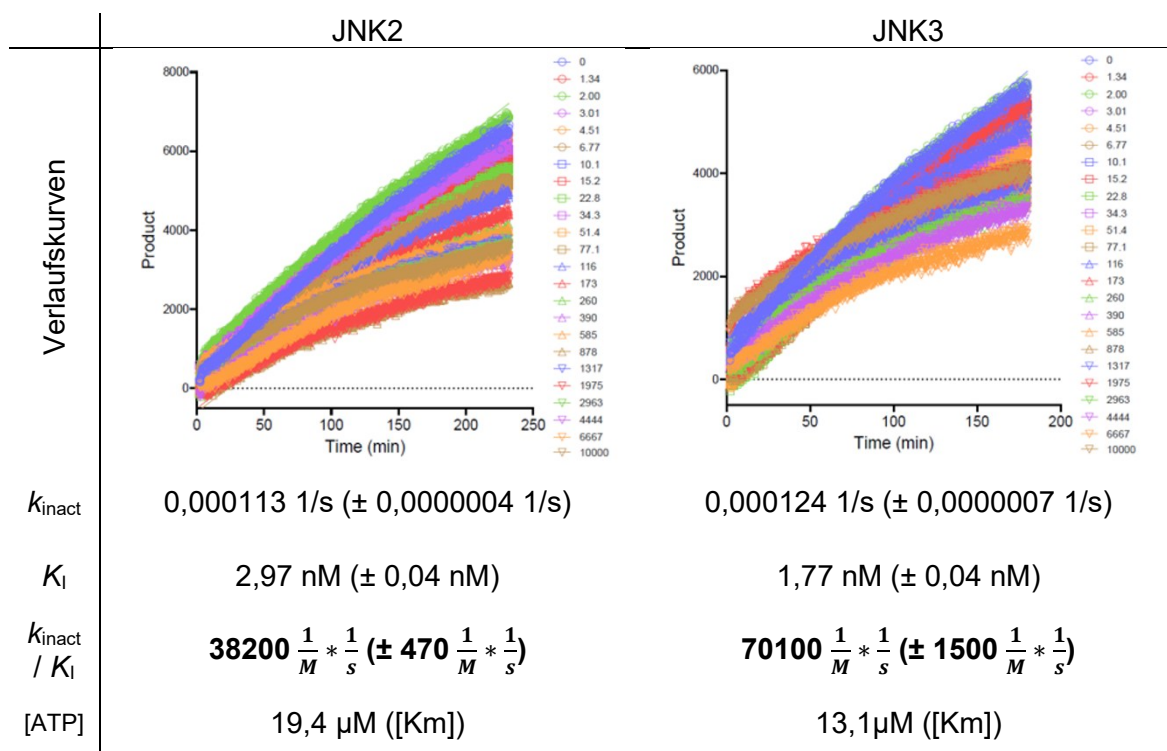
5.1.12.1 Enzyminaktivierungseffizienz (k_{inact}/K_i)

Im Anschluss an den Beweis der TDI wurden Verlaufskurven für Inhibitor **P-94** via PhosphoSense-Plattform ermittelt, um daraus über ein zweistufiges globales *Fitting* eine k_{inact}/K_i-Bestimmung vorzunehmen. Die entsprechend aufgeschlüsselten Kenndaten sind aus Tabelle **21** zu entnehmen. Die Bestimmung erfolgte bei apparenten K_m an ATP der jeweiligen JNK-Isoformen.

Der Inhibitor zeigte k_{inact}/K_i-Werte im 10⁴ M⁻¹*s⁻¹ Bereich für beide Isoformen. Vergleicht man diese Werte mit k_{inact}/K_i-Werte von zugelassenen, von der FDA bewerteten, kovalenten Kinaseinhibitoren für EGFR (Afatinib; Neratinib; Dacomitinib), so befinden diese sich typischerweise in einem Bereich von 10⁵-10⁷ M⁻¹*s⁻¹.²¹⁶ Der Inhibitor **P-94** besitzt demnach einen vielversprechenden k_{inact}/K_i-Wert.

Gliedert man diese Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung in ihrer einzelnen Subparameter auf, so ist auffallend, dass der doch recht hohe k_{inact}/K_I -Wert hauptsächlich durch die sehr geringe Inaktivierungskonstante K_I zustande kommt. Aus dem Quotienten (k_{inact}/K_I) ergibt sich dadurch, trotz der sehr geringen k_{inact} -Werte $< 0,001$ 1/s, ein hoher Wert.

Tabelle 21: Verlaufskurven von Inhibitor **P-94** im PhosphoSense-Assay aus denen die k_{inact}/K_I – Werte ermittelt wurden.*



* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO AssayQuant Technologies Inc. (Marlborough, MA, USA) erhoben und erstellt.

Der k_{inact} -Wert steht hierbei wie bereits unter Kapitel **4.2.2** beschrieben für den kovalente Anteil an der Bindung zur Zielstruktur und K_I für den reversiblen Bindungsanteil. Für Inhibitor **P-94** sehen wir also eine sehr hohe reversible Bindung, ausgedrückt durch eine kleine Inaktivierungskonstante, wodurch entsprechend nur eine geringe einstellig nanomolare Inhibitorkonzentration $[I]$ notwendig ist, um $\frac{1}{2} k_{inact}$ zu erreichen. Der kovalente Bindungsanteil fällt bei beiden getesteten Isoformen sehr gering aus. Dies ist grundsätzlich nicht als rein-negativ zu bewerten, da ein geringe k_{inact} auch für eine geringe Reaktivität und damit Promiskutivität des kovalenten *Warheads* + Grundgerüst spricht. Allerdings fließt in k_{inact} auch u.a. die Reaktivität/ Nukleophilie der anvisierten Aminosäure, sowie die Präorientierung der beiden Komponenten zueinander ein.²¹⁷

5.2 Biologische Evaluation

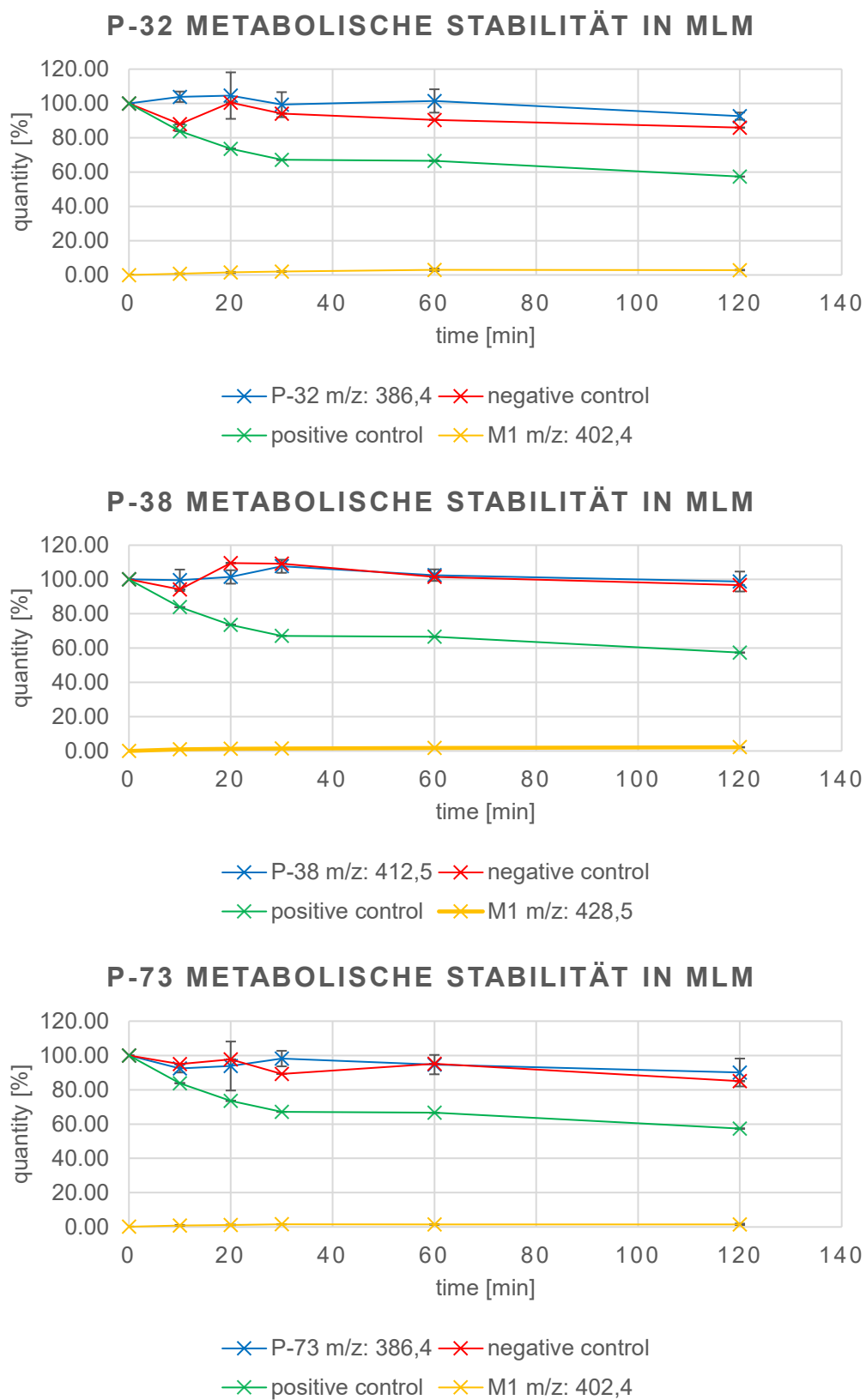
5.2.1 Metabolismus-Daten

Im Vorfeld der biologischen Evaluation durch zelluläre Assays und PK-Studien musste die metabolische Stabilität anhand von ausgewählten Vertretern (Leitstrukturen) abgeklärt werden, um eine Desaktivierung durch metabolische katalysierte Reaktionen, wie beispielsweise Amidspaltungen durch Amidasen, ausschließen zu können. Metabolische Instabilitäten könnten z.B. in PK-Studien zu einem drastischen Abfall an Inhibitor-Konzentrationen in Blut und Gewebe und bei zellulären Assay-Systemen zu einer geringen Aktivität führen.²¹⁸

Entsprechend wurde wie in Abbildung **24** dargestellt, die Verbindungen **P-32**, **P-38** sowie **P-73** in Maus-Leber-Mikrosomen für 2 Stunden inkubiert (Konz. = 0,1 mM) und nach 6 Zeitpunkten Proben gezogen, welche massenanalytisch quantifiziert wurden. Als Negativprobe diente eine Kondition ohne Mikrosomen und als Positivprobe wurde der bekannte Metabolismus von Verapamil analysiert.

Da keine der getesteten Verbindungen nach 2 Stunden eine Restkonzentration von < 90 % besaß, scheinen diese Leitstrukturen eine gewisse metabolische Stabilität zu besitzen. Strukturell ähnliche Verbindungen sollten ähnliche Stabilitäten aufweisen, wobei eine jeweilige Bestimmung der metabolischen Stabilität für eine genau Aussage hierzu notwendig ist. Als einziger auffindbarer Metabolit wurde jeweils ein *m/z*-Signal von [M+16] beobachtet. Dies spricht für eine Oxidation oder Hydroxylierung der Moleküle.

Abbildung 24: Metabolismus der Leitstrukturen nach Verdau durch MLM.*



* Diese Testungen wurden von Alexander Rasch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Laufer an der Universität Tübingen durchgeführt. Die hier dargestellten Graphen wurden von Alexander Rasch erstellt.

5.2.2 NanoBRET-Assay

Diverse Leitstrukturen wurden auch auf zellulärer Ebene im NanoBRET-Assay evaluiert. Hierbei sollte nicht nur die zelluläre Potenzen der Verbindungen quantifiziert werden, sondern gleichzeitig die Zell-Gängigkeit untersucht, die Fähigkeit der Inhibitoren mit der Zielstruktur innerhalb eines Zellsystems zu interagieren (*Target Engagement*), sowie die zelluläre Isoform-Selektivität der Verbindungen bestimmt werden. Entsprechend wurden EC_{50} für alle Isoformen bestimmt (siehe Tabelle 22)

Als Referenzen wurden neben der Ausgangsverbindung des Aminopyrazol-Grundgerüsts (**A-1**) auch der reversible bindende Multikinaseinhibitor **CTX0294885** sowie der ebenfalls im AK Laufer entwickelte, hochpotente und kovalent bindende pan-JNK Inhibitor **LN2332** via NanoBRET vermessen. Der Multikinaseinhibitor **CTX0294885** wurde deswegen als reversible Positivprobe ausgewählt, da für diese Verbindung bereits NanoBRET-Werte für JNK1 und JNK3 literaturbekannt waren.^{216, 219, 220} Wie aus den Daten zu entnehmen, waren die reversiblen Inhibitoren mit Ausnahme der Referenz hauptsächlich über der Nachweisgrenze von 10 bzw. 5 μ M. Lediglich für die reversiblen Inhibitoren **P-77** ($EC_{50}(\text{JNK2}) = 9529 (\pm 3041 \text{ nM})$) und **P-38** ($EC_{50}(\text{JNK2}) = 7512 (\pm 789 \text{ nM})$) konnten auswertbare Ergebnisse mit EC_{50} -Werten nah an der Nachweisgrenze erzielt werden.

Der Inhibitor **P-79** jedoch, welcher als Weiterentwicklung der Leistruktur **P-38** entwickelt wurde, zeigte nicht nur einen EC_{50} von 1555 nM auf JNK2 und 3646 nM auf JNK3, sondern auch eine gewisse Selektivität (6,4-fach) gegenüber JNK1 ($EC_{50} > 10000 \text{ nM}$). Entsprechend bewies dieser Inhibitor sowohl seine Zellgängigkeit, als auch *Target Engagement* und zelluläre Selektivität gegenüber der Isoform JNK1.

Die bereits biochemisch beschriebenen SARs der kovalenten Inhibitoren **P-92 + P-94** konnte wie in Tabelle 22 dargestellt auf der zellulären Ebene des NanoBRET-systems auch beobachtet werden. Der *para*-ständige Inhibitor **P-92** zeigt auch im NanoBRET-Assay keine Selektivität zwischen den Isoformen und ist weniger potent als der *meta*-ständige Inhibitor **P-94**.

Es ist aus den Daten ersichtlich, dass die kovalenten Inhibitoren im Vergleich zu den reversiblen Vertretern allgemein deutlich besser in diesem zellulären Assay-System abschneideten. Dies ist die umgekehrte Beobachtung wie jene die bei der biochemischen Testung mittels ³³PanQinase-Assay gemacht wurde, wo die meisten in Tabelle 22 aufgezeigten reversiblen Verbindungen deutliche aktiver waren. Der kovalente Inhibitor **P-94** zeigte aus dieser Testreihe die besten zellulären Hemmwerte. **P-94** zeigte in diesem Assay nicht nur die höchste Potenz gegenüber JNK2 (883 nM), sondern auch eine, auf zellulärer Ebene erstaunlich hohe Selektivität gegenüber JNK1 (11,3-fach).

Tabelle 22: NanoBRET Testwerte*

Bindemodus	Nr.	EC ₅₀ (JNK1) NanoBRET [nM]	Wdh. [n]	EC ₅₀ (JNK2) NanoBRET [nM]	Wdh. [n]	EC ₅₀ (JNK3) NanoBRET [nM]	Wdh. [n]	Selektivität: EC ₅₀ (JNK1)/ EC ₅₀ (JNK2)	Selektivität: EC ₅₀ (JNK3)/ EC ₅₀ (JNK2)
Reversibel	Ref-1: CTX0294885	2609 (± 372)	2	700 (± 218)	3	759 (± 22)	3	3,7x	1,1x
	Ref-2: A-1	ND	-	>10000	≥2	>10000	≥2	-	-
	Ref-3: TCS JNK 5a	ND	-	>10000	≥2	>10000	≥2	-	-
	P-24	ND	-	>10000	≥2	>10000	≥2	-	-
	P-32	ND	-	>10000	≥2	>10000	≥2	-	-
	P-38	ND	-	7512 (±789)	≥2	>10000	≥2	-	1,3x
	P-49	ND	-	>10000	≥2	>10000	≥2	-	-
	P-69	ND	-	>10000	≥2	>10000	≥2	-	-
	P-73	ND	-	>10000	≥2	>10000	≥2	-	-
	P-74	>10000	2	>5000	2	>10000	2	-	-
	P-76	ND	-	>10000	2	ND	-	-	-
	P-77	ND	-	9529 (±3041)	2	ND	-	-	1,0x
	P-78	>10000	2	>5000	2	>10000	2	-	-
	P-79	>10000	2	1555 (± 156)	2	3646 (± 1499)	2	≥6,4x	2,3x
	Kovalent	P-92	5374 (±1893)	2	3794 (± 673)	3	3515 (± 955)	3	1,4x
P-94		>10000	2	883 (± 340)	4	**	7	≥11,3x	-

* Die hier aufgezeigten Werte wurden von der Kooperationspartnerin Dr. Nicole Plank an der Universität Regensburg am Arbeitskreis Prof. Koch erhoben. ** Nicht genau bestimmbar wegen zu hoher Abweichung der Werte.

5.2.3 Western Blots (WBs)

Parallel zu der zellulären Evaluation via NanoBRET-Assay, wurden Western Blots angefertigt, um Effekte der bereits biochemisch bestätigten, selektiven JNK2/3-Hemmung auf die Phosphorylierung von *downstream* gelegenen Substraten von JNK zu untersuchen. Hierbei wurde versucht, als Positivprobe die von Bennet et al. für den hochcharakterisierten pan-JNK Referenzinhibitor **SP600125** publizierte zelluläre Aktivität, welche ebenfalls via Western Blot quantifiziert wurde, mit dem hier aufgesetzten Assay zu reproduzieren.¹²⁷

Wie bereits im Kapitel **4.8** des biologischen Teils erläutert, wurde für die Aktivierung des stressinduzierten JNK-Signalwegs die Zellen eine Stunde mit konzentrierter Sorbitol-Lösung inkubiert, nachdem die Zellen mit der jeweiligen Konzentration an Testverbindung für 2 h bei 37 °C inkubiert wurden (Inhibitoren hierbei nicht entfernt). Dieser osmotische Reiz führt zur Signalkaskade, welche in der D-Spalte (+ Sorbitol) zum Ausdruck kommt (Bandenschatten entspricht 100 % Signal).¹⁸⁶ Die D-Spalte ohne Sorbitol wiederum entspricht der 0-Probe und der allgemeinen Aktivität des Signalwegs ohne Reiz. Es wurden pro getesteter Verbindung drei Konzentrationen vermessen.

Die hier aufgezeigten WBs wurden im Labor von Prof. Dr. med. Lars Zender unter Supervision von und in Zusammenarbeit mit Stefan Zwirner angefertigt und von S. Z. ausgewertet.

In Abbildung **25** ist die WB-Analyse des initiale Inkubationsversuch mit Referenzinhibitor **SP600125** sowie den Inhibitoren **A-1**, **P-38** & **P-32** dargestellt. Mit Antikörpern gegen phosphoryliertes c-Jun (p-c-Jun; phosphoryliert an Serin 73; Klon: CST9164) sowie gegen phosphoryliertes JNK2 (p-JNK2; phosphoryliert an Threonin 183; Klon: P02706), wurden diverse Effekte der selektiven Hemmung sichtbar.

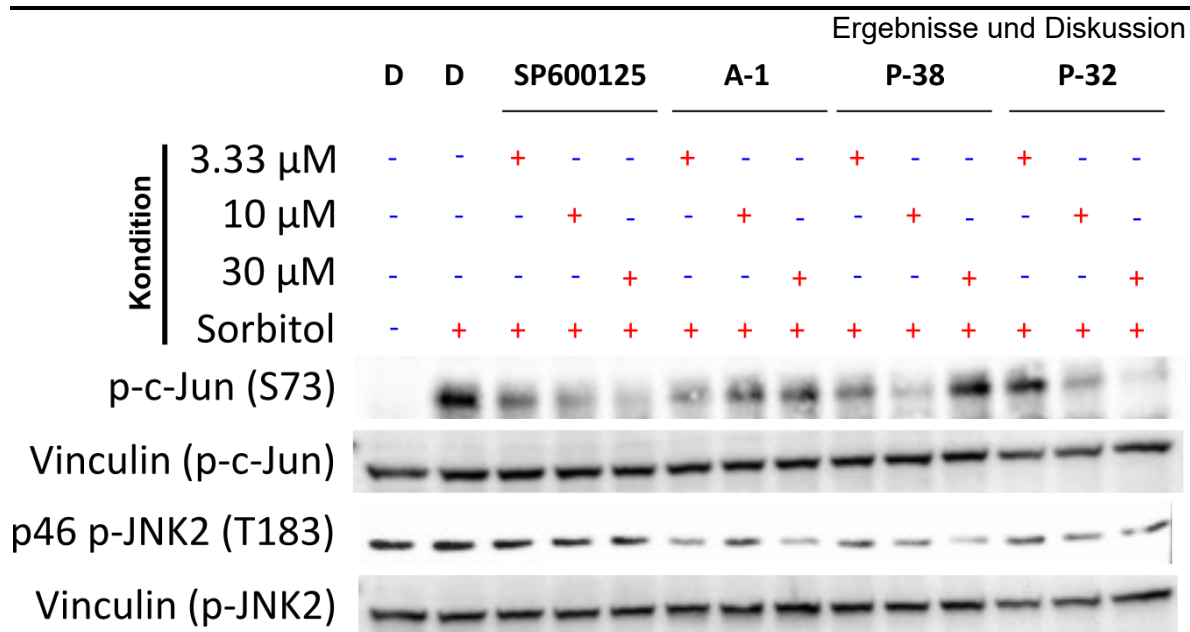


Abbildung 25: WB-Analyse von isoform-selektiver JNK-Inhibition auf die Phosphorylierung des *downstream* JNK liegenden Hauptsubstrats c-Jun sowie der Phosphorylierung von JNK2. WB durchgeführt mittels Ganzzelllysaten aus adhärennten murinen *Nras*^{G12V}; *CDKn2a*^{ARF-/-} HCC Zellen. Die Zellen wurden insgesamt für 3 h mit den entsprechenden Inhibitoren (**SP600125**; **A-1**; **P-38**; **P-32** oder reinem DMSO (D)) in drei Konzentrationen (3,33 μ M; 10 μ M; 30 μ M) inkubiert. Nach 2 h wurde ein osmotischer Stimulus von **250 mM Sorbitol** gesetzt um die JNK-Signalkaskade zu aktivieren (außer bei der Nullprobe, bzw. der ersten D-Kontrolle). Ein + steht hierbei für das Zutreffen der in der linken Spalte dargestellten Konditionen und ein - steht für ein Ausbleiben der jeweiligen Kondition. Durchgeführt im Singulat. Das Skelettprotein Vinculin wird als Ladungsprobe genutzt. Dargestellt ist die Bande der phosphorylierte 46 kDa JNK2-Splicevariante. Die dargestellten WB-Experimente wurden von Stefan Zwirner aus der Arbeitsgruppe Zender am Universitätsklinikum Tübingen etabliert und unter dessen Supervision sowie in Zusammenarbeit durchgeführt.

Mit einer Potenz ähnlich wie publiziert (publiziert = 5-10 μ M), war es der Positivprobe möglich das Phosphorylierungssignal auf c-Jun auch noch bei einer Inhibitorkonzentration von 3,33 μ M zu verringern (siehe auch Abb.26).¹²⁷ Entsprechend konnten wir hiermit unser Assay-Protokoll validieren. Die Banden bei **SP600125** dienten in den folgend hergestellten WBs als Indikator für eine gelungene Inkubation bzw. Protokolldurchführung allgemein.

P-32 zeigte in diesem initialen Versuch eine dosisabhängige Hemmung der c-Jun-phosphorylierung die leicht schwächer ausfiel wie durch **SP600125**, erkennbar an der Kondition mit der niedrigsten Konzentration (3,33 μ M). **P-38** zeigte korrespondierend zu dessen besserer biochemischer Aktivität, ebenfalls eine stärkere Inhibition im WB bei einer Konzentration von 3,33 μ M im Vergleich zu **P-32**. Allerdings ist bei der höchsten Inhibitorkonzentration von 30 μ M keine Inhibition zu erkennen. Bei dieser hohen Konzentration an Inhibitor sind Interaktionen mit anderen Kinase sowie sonstigen Proteinen wahrscheinlicher, was zu diesem paradoxen Nebeneffekten führen könnte. Dieses Phänomen wird im Zuge der Analyse von nachfolgenden WBs weiter besprochen werden. Die weitere Referenzverbindung **A-1** zeigte diesen Effekt in ähnlicher Weise.

Interessanterweise scheinen nur die JNK2/3 selektiven Inhibitoren (**A-1**, **P-32** und **P-38**) dazu in der Lage zu sein, auch die Phosphorylierung von JNK2 zu beeinflussen. Dieser Effekt trat jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen auf (10-30 μ M). Um diesen Effekt zu

Ergebnisse und Diskussion

validieren sind weitere Versuche und Replikate dieses Versuches nötig ($n = 1$). Insbesondere der Einfluss der Verbindungen auf die *upstream* gelegenen Kinasen wie MKK4/ MKK7 müsste untersucht werden. Die stärkste, dosis-abhängige Inhibition besaß hierbei die Verbindung **P-38**.

Es wurden unterschiedliche Antikörperklone für die Detektion sowie unterschiedlich defiziente murine Hepatokarzinom-Zelllinien gescreent, um die WB-Analyse weiter zu optimieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle **23** dargestellt. Für die Detektion waren beide Antikörperklone gut geeignet. Die auf den *Nras*^{G12V}/*Cdkn2a*^{ARF-/-}-HCC-Zellen (abgekürzt p19^{-/-}-Zellen) erhaltenen Blots ließen sich auch bei der Wdh. des Versuchs in murinen *Nras*^{G12V}/*p53*^{-/-}-HCC-Zellen (abgekürzt p53^{-/-}-Zellen) reproduzieren, wobei Inhibitor **P-38** eine Verstärkung des Phosphorylierungssignals nun bei allen Konditionen aufzeigte und **A-1** weder Verstärkung noch Inhibition zu vermitteln schien.

Ferner wurde der Effekt der Testverbindungen auf die Phosphorylierung der beiden *downstream* gelegenen JNK Substrate ATF2 und ELK1 sowohl in p19^{-/-}-Zellen als auch bei p53^{-/-}-Zellen untersucht (Tabelle **24**). Wohl auch an der Qualität der Antikörper liegend, waren die Banden der Blots deutlich verschmierter und dadurch schlechter sichtbar als bei p-c-Jun. Dazu war bei der Untersuchung der beiden Substrate via WBs jeweils bei der DMSO-Kondition ohne Sorbitol-Zugabe (D; - Sorbitol) ein Effekt und damit ein Phosphorylierungssignal erkennbar, welches sich nur geringfügig von der DMSO-Kondition mit Sorbitol (D; + Sorbitol) absetzte.

Es ist nicht auszuschließen, dass der durch das Sorbitol induzierte osmotische Stress und das dadurch wiederum ausgelöste vermehrte Zellsterben und Freiwerden von Interleukinen, neben der Induktion der Phosphorylierung der JNKs auch zu einer Aktivierung anderer Kinasen oder MAPKs wie bspw. der Unterfamilie der p38-Isoformen geführt haben könnte. Aktivierte p38-Enzyme würden entsprechend wiederum ELK1 und ATF2 phosphorylieren, aber nicht durch die Inhibitoren gehemmt werden, wodurch es zu diesem Effekt kommen könnte.³⁸ Entsprechend bedürfte es weiterer Optimierung der Inkubations-Bedingungen wie z.B. der Wechsel des Signalkaskaden-Aktivators um aussagekräftigere Ergebnisse für die Phosphorylierung von ATF2 und ELK1 bei JNK-Hemmung zu erzielen. Auch wenn weitere Replikate hiervon notwendig sind, so sind dennoch manche, bei der Hemmung der p-c-Jun-Bildung gemachte Beobachtung, auf diese Substrate übersetzbar, wie die Hemmung der Bildung von p-ATF2 durch **SP600125** bei beiden Zellen. Die jeweiligen Blots für der Detektion von p-ELK1 sind aufgrund des schwachen Signals schwer interpretierbar.

Tabelle 23: Antikörper-/ Zellkulturscreening für die p-c-Jun-Detektion via WB.*

Antikörperklonscreening														
p-C-Jun (S73) CST9164**						p-C-Jun (S73) CST3270								
	D	D	SP600125	A-1	P-38	P-32		D	D	SP600125	A-1	P-38	P-32	
3.33 μ M	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
10 μ M	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
30 μ M	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-c-JUN (S73) CST9164														
Vinculin														
Zellkulturscreening														
murine <i>Nras</i>^{G12V} + <i>Cdkn2a</i>^{ARF-/-} HCC-Zellen**						murine <i>Nras</i>^{G12V} + <i>p53</i>^{-/-} HCC-Zellen								
	D	D	SP600125	A-1	P-38	P-32		D	D	SP600125	A-1	P-38	P-32	
3.33 μ M	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
10 μ M	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
30 μ M	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-c-JUN (S73) CST9164														
Vinculin														

* Es wurde für alle Blots das gleiche Lysat wie für den WB aus Abbildung 25 genutzt (n = 1). ** Identische Blots. Doppelte Darstellung dient nur dem Vergleich zu den rechts liegenden WBs. Die dargestellten WB-Experimente wurden von Stefan Zwirner aus der Arbeitsgruppe Zender am Universitätsklinikum Tübingen etabliert und unter dessen Supervision sowie in Zusammenarbeit durchgeführt.

Tabelle 24: Inhibition der Phosphorylierung von weiteren *downstream* JNK liegenden Substraten.***Screening weiterer *downstream* Substrate**

		murine <i>Nras</i> ^{G12V} + <i>Cdkn2a</i> ^{ARF-/-} HCC-Zellen												murine <i>Nras</i> ^{G12V} + <i>p53</i> ^{-/-} HCC-Zellen												
		D		D		SP600125		A-1		P-38		P-32		D		D		SP600125		A-1		P-38		P-32		
p-ATF2	3.33 μ M	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-		
	10 μ M	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
	30 μ M	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	p-ATF2 (T51 + T69) ab131106																									
p-ELK1	3.33 μ M	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-		
	10 μ M	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
	30 μ M	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	p-ELK1 (S383) CST9181																									

* Es wurde für alle Blots das gleiche Lysat wie für den WB aus Abbildung 25 genutzt. n = 1. Die dargestellten WB-Experimente wurden von Stefan Zwirner aus der Arbeitsgruppe Zender am Universitätsklinikum Tübingen etabliert und unter dessen Supervision sowie in Zusammenarbeit durchgeführt.

Um die nötige Wiederholbarkeit zu gewährleisten, wurden abschließend ein Triplikate des WB-Versuchs für die Referenz **SP600125** sowie **P-38**, **P-32** und dem HCl-Salz von **A-1** erstellt. Die Ausgangsverbindung **A-1** wurde ursprünglich von Zheng et al. als Salz der Trifluoressigsäure (*TFA*) bereits in einem *in-cell* Western-Assay auf seine zelluläre Aktivität hin evaluiert wobei vierstellig nanomolare Werte erhalten wurden (Lit. $IC_{50}(p-c-Jun) = 1436 \text{ nM}$).¹³³ Entsprechend war es überraschend, dass sowohl auf der NanoBRET-Plattform als auch im Western Blot keine Aktivität für die freie Base der **A-1** Referenz erhalten werden konnte. Um Löslichkeitsproblematiken vorzubeugen, wurde das HCl-Salz von **A-1** generiert und diese Spezies nun entsprechend in den Wiederholungen des WB-Versuchs vermessen.

Um eine genauere Eingrenzung der Inhibitionswerte zu gewährleisten, wurde nun bei niedrigeren Konzentrationen (1,11 μM ; 3,33 μM ; 10 μM) Zellen inkubiert. **P-32** zeigte hierbei eine leicht stärkere Verringerung der p-c-Jun Phosphorylierung wie Referenzinhibitor **SP600125**, insbesondere bei der niedrigsten Inhibitor Konzentration. Er unterdrückte die induzierte Phosphorylierung von p-c-Jun auch noch bei einer Inhibitor Konzentration von 1,11 μM anteilig. **P-38** zeigte ähnlich wie bei Abbildung 25 paradoxe Effekte. Das HCl Salz der Verbindung **A-1** wiederum zeigte gegensätzlich zu dem Verhalten der freien Base in diesem Testsystem eine Inhibition des aufbauenden p-c-Jun-Signals, leicht schwächer wie die von **P-32** und dennoch leicht stärker wie beim Referenzinhibitor **SP600125**. Dies entspricht grob dem publizierten Verhalten für **A-1**.¹³³

Ergebnisse und Diskussion

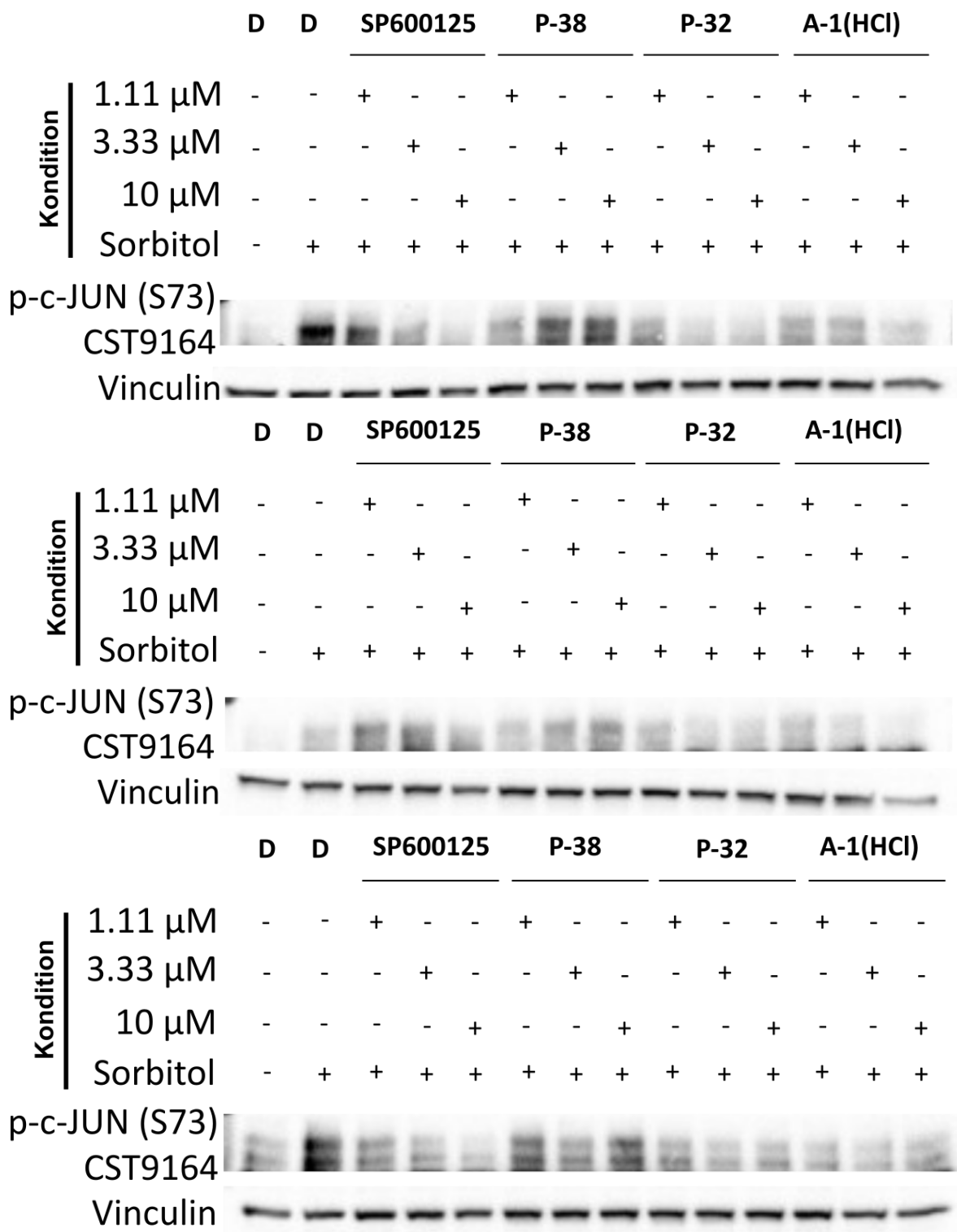


Abbildung 26: Triplikats-Messung bei Inhibitor-Konzentrationen von 1,11 μ M, 3,33 μ M und 10 μ M. Anstatt der bisher üblichen Konzentration von Sorbitol (250 μ M) wurde in diesem Fall eine Konzentration von **133 μ M Sorbitol** genutzt. Diese Abbildung wurde bereits in ähnlicher Weise in einer Publikation veröffentlicht (Wydra et al.).¹¹⁶ Die dargestellten WB-Experimente wurden von Stefan Zwirner aus der Arbeitsgruppe Zender am Universitätsklinikum Tübingen etabliert und unter dessen Supervision sowie in Zusammenarbeit durchgeführt.

5.2.4 PK-Studie

Nachdem machen Leitstrukturen dazu fähig waren, die induzierte Phosphorylierung von c-Jun einem Substrat der JNKs, zu inhibieren und gleichzeitig gute metabolische Stabilität zeigten, wurde eine kleine pharmakokinetische Studie durchgeführt. Die Inhibitoren wurden wie unter Kapitel 4.7 beschrieben, i.v. in zwei Kassetten à drei Inhibitoren in einer Dosis von 10 mg/kg und einer jeweiligen Konzentration von 2 mg/mL verabreicht. Die Ergebnisse sind zusammengefasst dargestellt in Abbildung 28. Wird eine halb-logarithmische Darstellung gewählt ($\log(c) = y$ -Achse gegen $t = x$ -Achse), so erhält man für jede einzelne aufgenommene Kinetik in den eng beieinanderliegenden ersten Messpunkten, initial einen kurvenförmigen (verm. exponentiellen) Abfall der Konzentration, welcher in einen linearen Abfall übergeht (siehe Abbildung 27). Dies ist der typische Verlauf einer i.v. Eliminationskinetik erster Ordnung nach einem offenen Zwei-Kompartimenten-Modell.²²¹

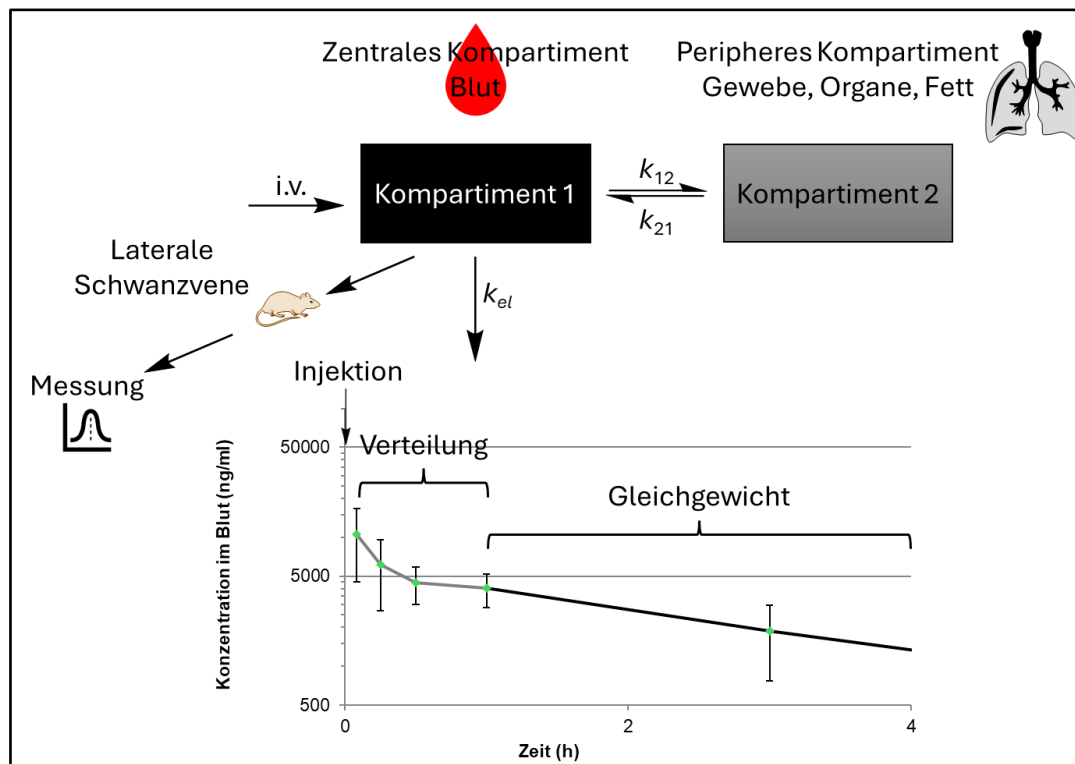


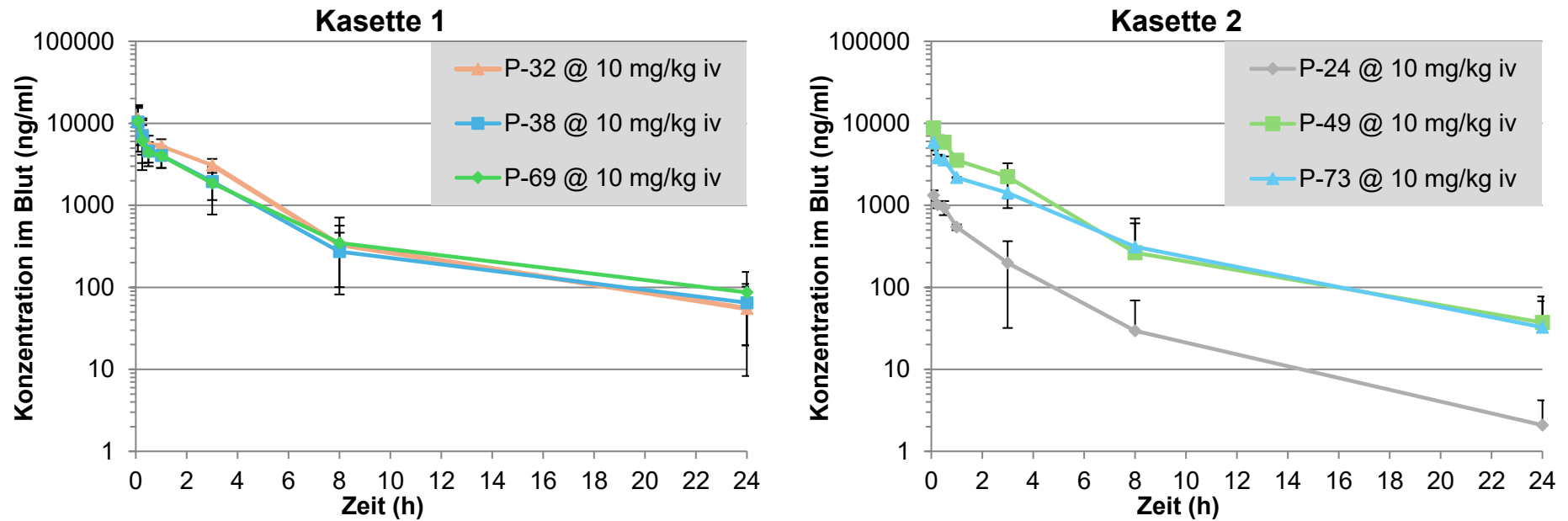
Abbildung 27: Schematische Darstellung des Zwei-Kompartimenten-Modells. Graph entspricht Auszug aus der Kinetik von P-69. Schematische Darstellung abgeleitet von Loughnan et al.²²¹

Der initiale kurvenförmige Abfall der Blutkonzentration an Wirkstoff kommt nach diesem Modell dadurch zustande, dass nach der i.v. Injektion der Dosis, der Wirkstoff nicht nur durch das „offene“ System eliminiert wird (k_{el}) sondern sich gleichzeitig schnell aus dem Blut (Kompartiment 1) in das Gewebe (Kompartiment 2) umverteilt mit den Geschwindigkeiten der Konstanten k_{12} bzw. k_{21} . Nach dem Einstellen des Gleichgewichtes kommt es zu einem konstanten Abfall.²²¹

Die erhaltenen Halbwertszeiten waren für alle sechs Verbindungen der zwei Kassetten ähnlich (Abbildung 28). Auffällig war jedoch die Kinetik von **P-24**. Bei dieser Verbindung kam es sehr schnell zu einem deutlich größeren Konzentrationsabfall. Dies spricht dafür, dass sich die Verbindung entweder sehr schnell im Gewebe verteilt hat, schnell metabolisiert wurde, oder deutlich schneller als die anderen Leitstrukturen eliminiert worden war.

Als weiteren Kennwert, welcher auch noch die Potenz der getesteten Verbindung mit einbezieht, kann wie in den Tabelle 35-40 (siehe Anhang) dargestellt, die verbleibende Konzentration des Stoffes als Vielfaches des jeweiligen IC_{50} - bzw. IC_{90} -Wertes ausgedrückt, herangezogen werden. Hierbei sind die Verbindungen **P-38** und **P-32** aufgrund ihrer Werte herauszustellen. **P-38** verblieb nach 8 h noch mit einer Konzentration 9,1-fach des IC_{50} in der Maus (**P-32** = 8,5-fach).

Abbildung 28: PK-Studie und erhaltenen Halbwertszeiten.*



Vehikel: DMA/PEG400/Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (20% w/w in Wasser) (10/60/30)

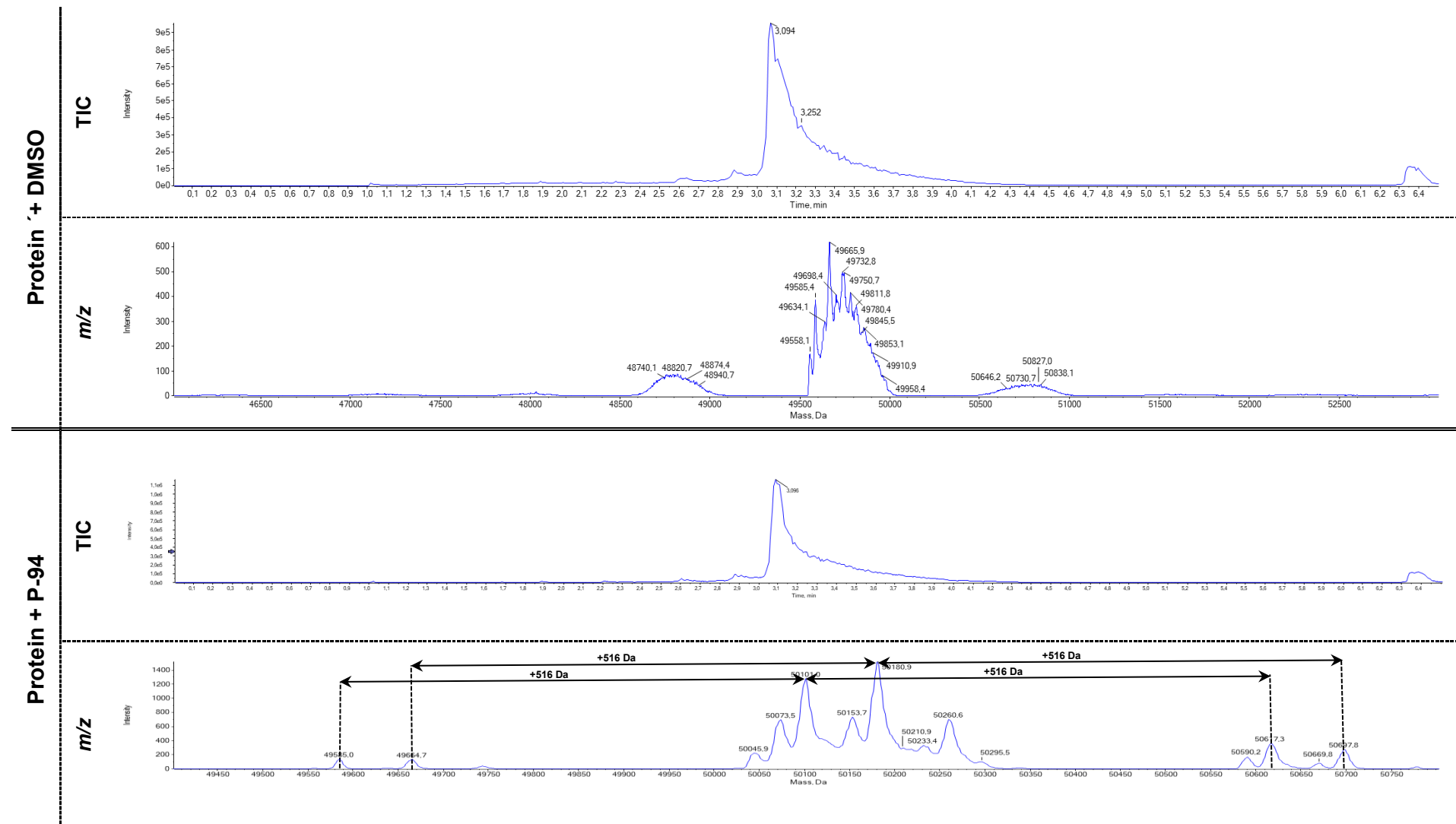
t_{1/2} [h] i.v.	<i>Kassette 1</i>	P-32	3.21 ± 0.779
		P-38	3.33 ± 0.829
		P-69	3.83 ± 1.07
	<i>Kassette 2</i>	P-24	2.68 ± 0.761
		P-49	3.01 ± 0.879
		P-73	3.45 ± 1.27

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE) erhoben und erstellt.

5.2.5 Experimente zur biologischen Evaluation von kovalenten Inhibitoren

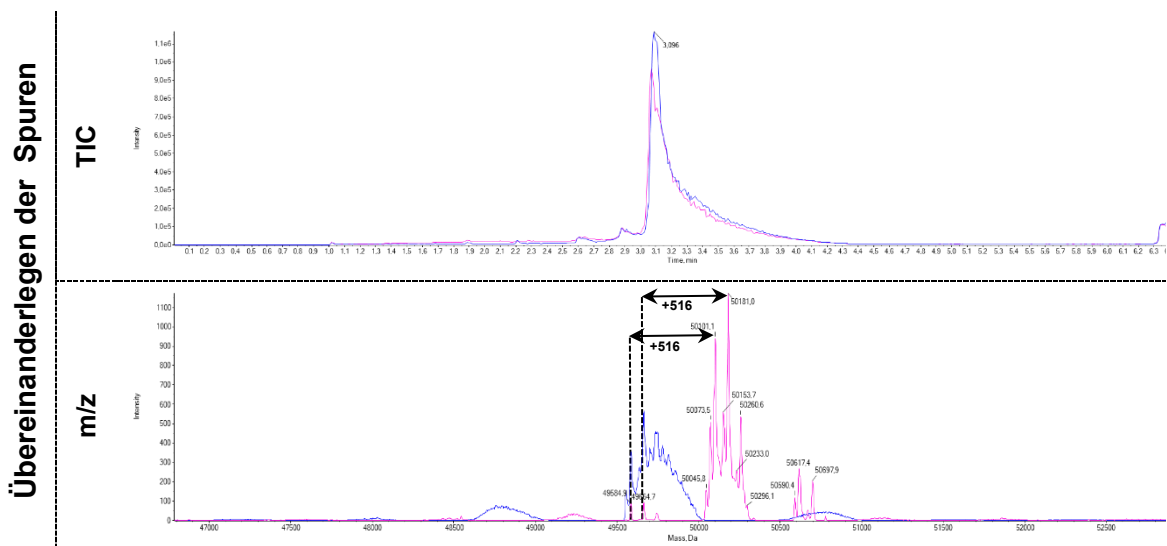
5.2.5.1 IPMS-Versuch

Die entsprechenden Ergebnisse des IPMS-Experiments sind in Tabelle **25** + **26** aufgetragen. Wie abgebildet, wurde mit Inhibitor **P-94** inkubierte aktivierte JNK2 und als Blindprobe ein mit DMSO inkubiertes Protein via LC-MS analysiert. Legt man die beiden Spuren übereinander erhält man die in Tabelle **26** dargestellten Chromatogramme. Die m/z Auftragungen gegen die M_r zeigt bei der Blindprobe drei Clusterpeaks, welche sich um ca. 1 kDa unterscheiden (Tabelle **25**). Der mittlere Cluster entspricht dem ungelabelten Zielprotein, welches ein theoretisches Molekulargewicht von 49,6 kDa besitzt. Die beiden weiteren Cluster sind wahrscheinlich Unreinheiten welche in dem kommerziell erworbenen JNK2-Protein bereits vorhanden waren. Da es sich des Weiteren hierbei um ein Gemisch an aktivierter und damit unterschiedlich und teilweise vielfach phosphorylierter JNK2 handelt und Oxidations- und Hydrolyse-Prozesse während der Inkubation wahrscheinlich sind, wird kein definiertes Signal mit einer einzelnen Masse erhalten, sondern viele Proteinmassen ähnlicher Masse. Bei der mit Inhibitor inkubierten Probe wurden ebenfalls drei Cluster detektiert, welche sich jedoch jeweils um die M_r von 516 Da unterschieden. Der Cluster mit dem geringsten Gewicht entspricht hierbei dem Rest an ungelabelten Protein.

Tabelle 25: LC gekoppelte Massenanalyse der inkubierten Proben. *Total ion count* (TIC) als Signal gegen die Zeit aufgetragen sowie die in der TIC-Spur enthaltenen *m/z**

* Die Vermessung der Proben via LC-MS, sowie die hier dargestellte Datenanalyse wurde von Benedikt Masberg an der Universität Tübingen im Arbeitskreis Lämmerhofer durchgeführt.

Tabelle 26: Überlagerung der Massen-Chromatogramme



* Die Vermessung der Proben via LC-MS, sowie die hier dargestellte Datenanalyse wurde von Benedikt Masberg an der Universität Tübingen im Arbeitskreis Lämmerhofer durchgeführt.

Das erfolgreiche *Labeling* wird insbesondere durch das Übereinanderlegen der Signale wie in Tabelle 26 dargestellt deutlich (blaues Chromatogramm = Protein mit DMSO inkubiert; magenta-rotes Chromatogramm = Protein mit **P-94** inkubiert). Der mittig stehende Cluster, welcher die höchsten Intensität aufweist, bildet das durch den Inhibitor **P-94** mono-*gelabelte* Proteingemisch ab $[\text{Prot}+\text{P-94}]^+$. Der letzte Clusterpeak wiederum ist entsprechend zweifach *gelabeltes* Protein. Wie oft das Zielprotein bei einer IPMS-studie *gelabelt* wird hängt hauptsächlich von folgenden Faktoren ab:

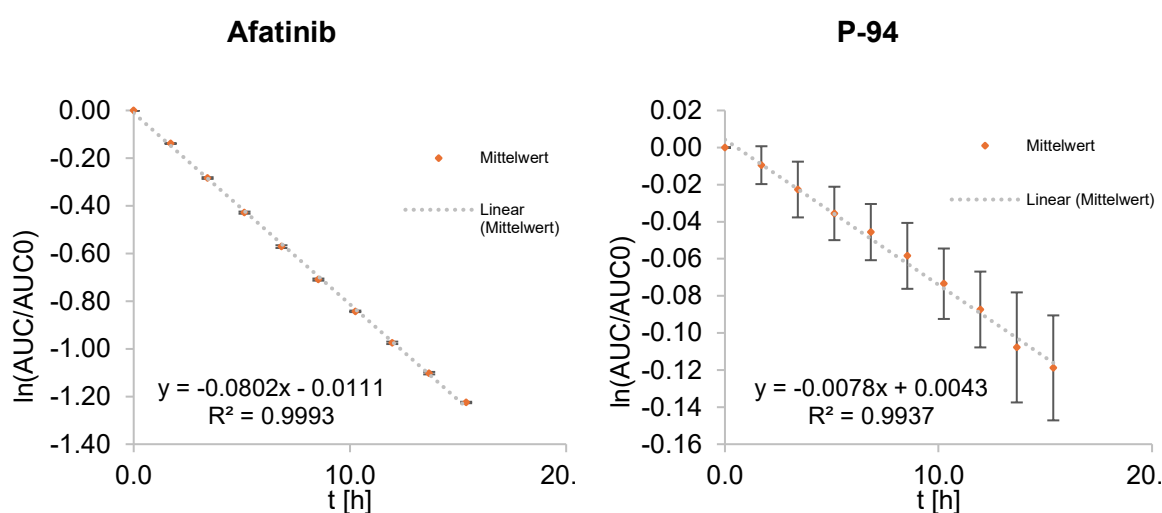
- Reaktivität des *Warheads*
- Inhibitor: Protein-Verhältnis
- Inkubationszeit sowie Inkubationstemperatur

Bei den hier gewählten Konditionen von 4,25 h Inkubation bei 20 °C und einem Inhibitor: Proteinverhältnis von 5:1. wird hauptsächlich durch **P-94** einfach *gelabeltes* Protein detektiert, was für eine wenig promiskuitiven Inhibitor spricht.

5.2.5.2 GSH-Stabilitäts-Assay

Im Zuge der Charakterisierung von Inhibitor **P-94** sollte dessen allgemeine Reaktivität und damit Promiskuität gegenüber Schwefel-Nukleophile quantifiziert werden. Entsprechend wurde ein *in-House* von dem Arbeitskreis von Prof. Gehringer bereits etablierter GSH-Stabilitäts-Assay angewandt.¹⁹³ Die ursprüngliche Vorarbeit zu diesem Protokoll wurde von Keeley et al veröffentlicht.¹⁹² Die ausgewerteten Stabilitäts-Daten sind in Tabelle 27 dargestellt. Um den Assay zu validieren, wurde unter den gleichen Bedingungen wie für **P-94** auch ein Stabilitätstest mit dem von der FDA zugelassenen, Arcrylamid-*Warhead* beinhaltenden, Arzneistoff Afatinib durchgeführt.

Tabelle 27: Vergleich der Reaktivität gegenüber GSH von Afatinib und **P-94** im GSH-Stabilitäts-Assay*



$$y = -0,0802x - 0,0111$$

$$k(\text{Afatinib}) = 0,0802 \frac{1}{h}$$

$$t_{1/2}(\text{Afatinib}) = 8,64 h$$

$$y = -0,0078x - 0,0043$$

$$k(\text{P-94}) = 0,0078 \frac{1}{h}$$

$$t_{1/2}(\text{P-94}) = 88,9 h$$

* Gemessen im Triplikат.

Über die in Kapitel 4.9 dargestellten Formeln und entsprechende Berechnungen lassen sich aus den linearen Regressionen des Inhibitor-Abbaus über die Zeit die Geschwindigkeitskonstanten sowie die Halbwertszeiten für Afatinib und **P-94** berechnen. Die R^2 -Werte der jeweiligen Regression (Bestimmtheitsmaß) verdeutlichen den linearen Verlauf der erhaltenen Werte, welche so eine Extrapolation des $t_{1/2}$ über die Berechnung zulassen. Wie in Tabelle 27 dargestellt, besitzt **P-94** (88,9 h) die 10-fache Halbwertszeit von Afatinib (8,64 h) und kann so als wenig intrinsisch reaktiv eingestuft werden.

5.2.5.3 NanoBRET Verdrängungsexperimente

Um die Irreversibilität von Inhibitor **P-94** nachzuweisen, wurde ein auf der NanoBRET-Technik basiertes Auswaschexperiment durchgeführt. Hierzu wurde in einem Zell-Assay-Setting, wie in Kapitel 4.11.1 beschrieben, die am Vortag transfizierte Zielstruktur zuerst mit Inhibitor abgesättigt. Es folgt nun eine phasenweise Auswaschphase. Erst danach wird das Tracer-Molekül zugegeben, womit sich langsam ein BRET-Signal aufbaut. Dieses entsteht, indem der Tracer den Inhibitor verdrängt oder wenn der Inhibitor durch die Auswaschphase bereits entfernt wurde und dadurch der Tracer in die räumliche Nähe von an das Zielprotein fusionierten Nanoluciferase kommt. Ist nun jedoch der Inhibitor (z.B.: **P-92** oder **P-94**) kovalent-irreversibel an die Zielstruktur gebunden, so baut sich das Signal nicht auf, oder es baut sich langsamer auf, bedingt durch die *turnover-time* des beobachteten Enzyms. Ein langsames Wiederaufbauen des BRET-Signals würde auch für eine reversible Inhibition mit hoher *target-residence-time* (τ) sprechen, sowie für eine kovalent-reversible Hemmung. Die Ergebnisse für dieses Experiment sind in Abbildung 29 aufgeführt. Als reversiblen Referenzinhibitor wurde erneut **CTX-0294885** verwendet, welcher sowohl mit als auch ohne Auswaschphase getestet wurde.

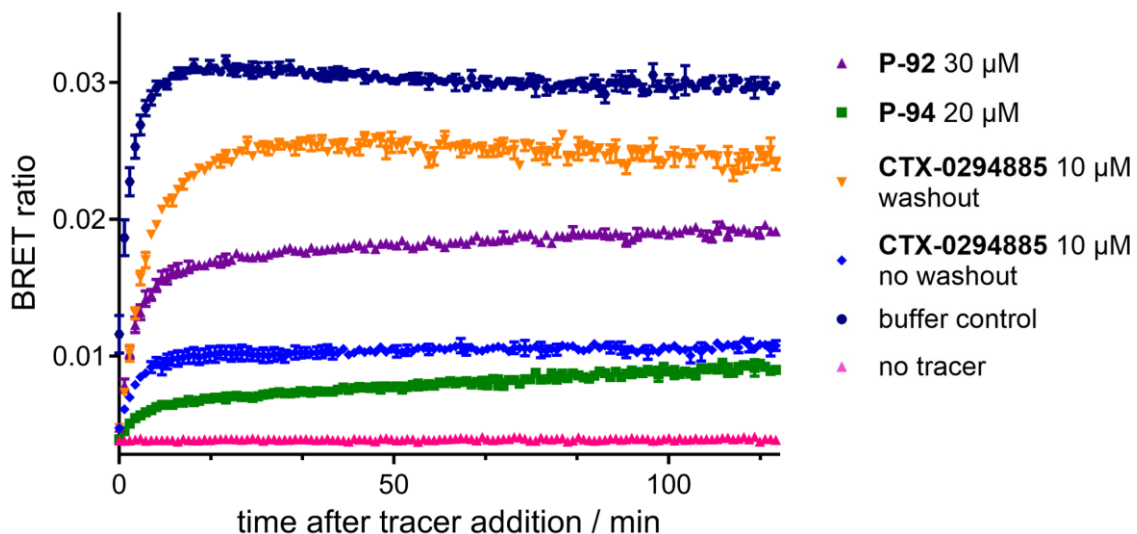


Abbildung 29: Verdrängungsexperiment bei JNK2. Aufgetragen ist das sich wieder aufbauende BRET-Signal (Y-Achse) nach *Tracer*-Zugabe gegen die Zeit (X-Achse). Die Enzyme wurde vorab mit Inhibitor abgesättigt, welcher durch den *Tracer* wieder verdrängt wird. Legende: lila Dreiecke = Verdrängung von Inhibitor **P-92** (eingesetzte Konz. = 30 μ M); grüne Vierecke = Verdrängung von Inhibitor **P-94** (eingesetzte Konz. = 20 μ M); invertierte, gelbe Dreiecke = Verdrängung von Inhibitor **CTX-0294885** (eingesetzte Konz. = 10 μ M) mit Auswaschphase des Inhibitors von den Zellen; blaue Rauten = Verdrängung von Inhibitor **CTX-0294885** (eingesetzte Konz. = 10 μ M) ohne Auswaschphase des Inhibitors von den Zellen; blaue Kreise = Blindprobe mit Puffer; pinke Dreiecke = Negativprobe ohne *Tracer*-Molekül. Diese Testung wurde durchgeführt und ausgewertet von Dr. Nicole Plank von der Universität Regensburg. Der hier gezeigte Graph wurde von Frau Dr. Plank erstellt. Gemessen im Duplikat.

Wird kein *Tracer* zugegeben, kann sich folglich kein BRET-Signal aufbauen (Negativprobe; pinke Dreiecke). Werden die Zellen nur mit Puffer inkubiert, so bildet sich nach *Tracer*-Zugabe sehr schnell das BRET-Signal aus (Positivprobe; blaue Punkte). Diese Kondition

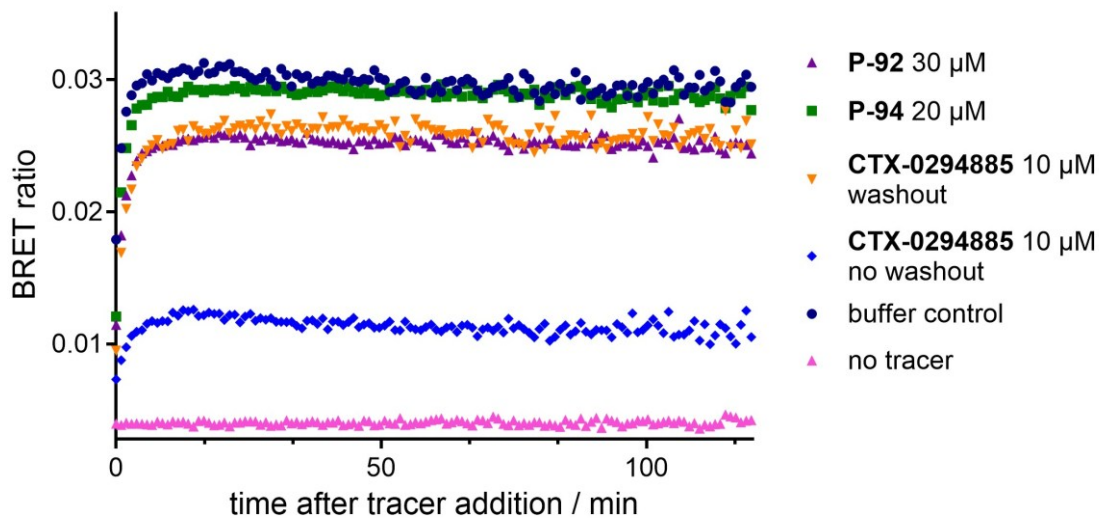
zeigt das maximalen BRET-Signal, welches unter den gewählten Konditionen aufgebaut werden kann.

Ein großer Unterschied ist bei dem Vergleich der beiden getesteten Konditionen des reversiblen Inhibitors **CTX-0294885** zu beobachten. Dieser wurde einmal mit Auswaschphase (gelbe Dreiecke) und einmal ohne getestet (blaue Rauten). Mit Auswaschphase ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten, wie bei der Inkubation ohne Inhibitor. Der rein reversibel-bindende Inhibitor wird entsprechend gut von dem eingesetzten *Tracer*-Molekül verdrängt. Allerdings fällt auf, dass die Kondition mit **CTX-0294885** ein leicht geringeres BRET-Signal-Plateau aufbaut als die Puffer-Kontrolle. Dieser Effekt ist auch in dem Replikat und in Folgeversuchen zu erkennen. Ohne Auswaschphase ist neben der JNK2-NanoLuc, der intra- und extrazelluläre Raum weiterhin mit Inhibitor komplett abgesättigt. Es stellt sich entsprechend nach einer Zeit ein Gleichgewicht ein, welches ein deutlich niedrigeres BRET-*ratio* produziert (blaue Rauten).

Interessante Beobachtungen ergaben sich bei dem Vergleich der Verdrängungsexperimente der beiden Inhibitoren **P-92** und **P-94**. Trotz der höheren eingesetzten Konzentration vom **P-92** (lila Dreiecke), stellt sich ein deutlich höheres BRET-Signal bei **P-92** ein, als am Ende der Mess-Zeit bei **P-94** (grüne Vierecke). Entsprechend kann auch für diese Testung **P-94** eine höhere Target-Affinität zugeschrieben werden. Nur Inhibitor **P-94** zeigt das erwartete Verhalten eines kovalent bindenden Inhibitors. Der leichte Anstieg des BRET-Signals über die Zeit ist jedoch etwas untypisch für rein-irreversible Inhibitoren. Andere kovalente pan-JNK Inhibitoren wie **LN2332** sind dazu fähig das BRET-Signal nach *Tracer*-Zugabe gar nicht mehr ansteigen zu lassen.²⁰⁰ Dieser beobachtete Effekte könnte daran gelegen haben, dass nicht bei allen JNK2-NanoLuc-Proteinen eine kovalente Bindung von **P-94** ausgebildet wurde. Der bereits besprochene relativ geringe k_{inact} -Wert von **P-94** ist ein Indiz hierfür.

Neben dem Auswaschexperiment mit JNK2-NanoLuc wurde auf demselben Prinzip basierend Verdrängungsexperimente mit transfizierten Zellen durchgeführt, die JNK2C116A-NanoLuc sowie JNK3C154A-NanoLuc exprimieren. Durch die jeweiligen Mutationen sollte es kovalenten Inhibitoren nicht mehr möglich sein, kovalent zu binden, sofern dieses Cystein die kovalente Bindungsstelle darstellen sollte. Die Ergebnisse dieser Kombination aus Mutagenese- und Auswaschexperiments sind in Abbildung **30** dargestellt.

A) JNK2C116A



B) JNK3C154A

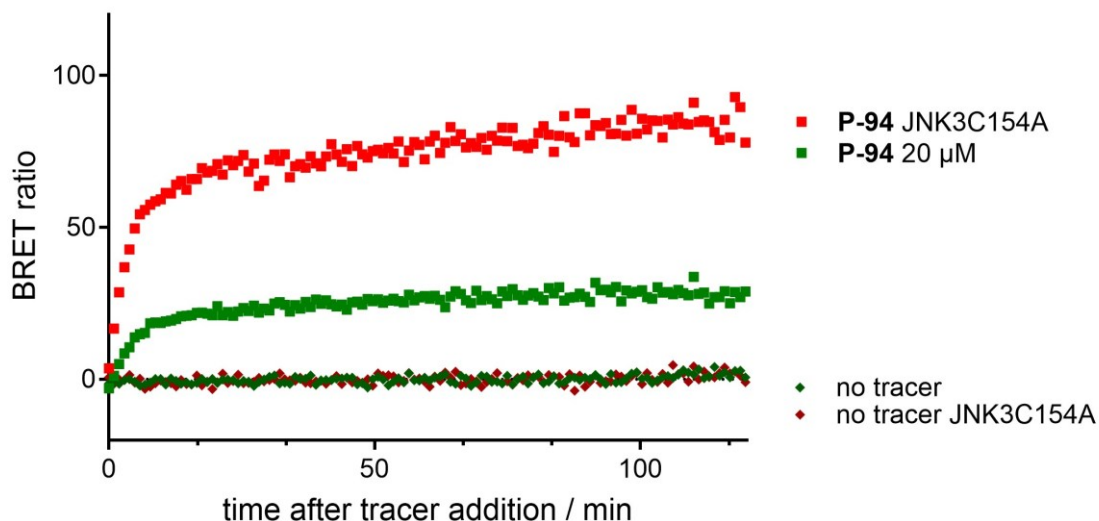


Abbildung 30: NanoBRET-basiertes Verdrängungsexperiment mit JNK-Mutanten. Aufgetragen ist das sich wieder aufbauende BRET-Signal (Y-Achse) nach *Tracer*-Zugabe gegen die Zeit (X-Achse). Die Enzyme wurde vorab mit Inhibitor abgesättigt, welcher durch den *Tracer* wieder verdrängt wird. **A)** Verdrängungsexperiment mit JNK2C116A Mutante. Legende: lila Dreiecke = Verdrängung von Inhibitor **P-92** (eingesetzte Konz. = 30 μM); grüne Vierecke = Verdrängung von Inhibitor **P-94** (eingesetzte Konz. = 20 μM); invertierte, gelbe Dreiecke = Verdrängung von Inhibitor **CTX-0294885** (eingesetzte Konz. = 10 μM) mit Auswaschphase des Inhibitors von den Zellen; blaue Rauten = Verdrängung von Inhibitor **CTX-0294885** (eingesetzte Konz. = 10 μM) ohne Auswaschphase des Inhibitors von den Zellen; blaue Kreise = Positivprobe mit Puffer; pinke Dreiecke = Negativprobe ohne *Tracer*-Molekül. **B)** Verdrängungsexperiment mit JNK3C154A Mutante im Vergleich zu JNK3wt. Legende: rote Vierecke = Verdrängung von Inhibitor **P-94** auf der JNK3C154A Mutante; grüne Vierecke = Verdrängung von Inhibitor **P-94** (eingesetzte Konz. = 20 μM) auf JNK3wt; grüne Rauten = Negativprobe ohne *Tracer*-Molekül JNK3wt; dunkel-rote Rauten Negativprobe ohne *Tracer*-Molekül JNK3C154A. Diese Testung wurde durchgeführt und ausgewertet von Dr. Nicole Plank von der Universität Regensburg. Die hier gezeigten Graphen wurde von Frau Dr. Plank erstellt. Versuch A) wurde als Dublikat, Versuch B) als Singulat durchgeführt.

Durch die Mutation von Cys116 (JNK2) bzw. Cys154 (JNK3) zu Alanin ist keine kovalente Bindung des *Warheads* an diese Ziel-Aminosäure mehr möglich, da Alanin keine nucleophile Funktionalität in der Aminosäureseitenkette aufweist.

- In dem JNK2C116A-Mutageneseversuch (Abb. **30A**) zeigt Inhibitor **P-94** nicht wesentlich weniger BRET-Signal als die Kontrollprobe.
- In dem JNK3C154A-Mutageneseversuch (Abb. **30B**) zeigt Inhibitor **P-94** auf der Mutante eine deutlich geringere Retention und damit ein höheres BRET-Signal, als bei den Zellen welche den JNK3wt-Phänotypen besitzen.

Entsprechend muss **P-94** bei dem zuvor getätigten Experiment (Abbildung **29**) kovalent gebunden haben. Hiermit ist bewiesen, dass **P-94** kovalent an C116(JNK1/2) bzw. C154(JNK3) bindet. Die Bindestelle ist damit eindeutig charakterisiert.

5.2.6 Testung der Kinom-Selektivität

Für die beiden potentesten, im zellulären NanoBRET-Assay getesteten Verbindungen, dem reversiblen Inhibitor **P-79** und dem kovalente Inhibitor **P-94**, sollte nun eine Testung ihrer Selektivität im Kinom erfolgen. Diese sollte aus Kostengründen bei einer einzigen Inhibitorkonzentration, jedoch nur bei einer der beiden Verbindung erfolgen. Lediglich der Inhibitor, welcher auf dieser Assay-Plattform die potenteste sowie isoform-selektivste Verbindung darstellen würde, sollte weiter auf seine Kinom-Selektivität hin getestet werden. Es war entsprechend eine Vortestung auf dem KINOMEscan-Assays-System notwendig.

5.2.6.1 Prä-Evaluierung/ K_d -Wert Bestimmung

Die entsprechenden Daten der K_d -Wertbestimmung der beiden Inhibitoren, jeweils im Duplikat sind in Tabelle **28** und Tabelle **29** dargestellt. Zu erkennen ist, dass in diesem Assay-System **P-79** (8,8-fach) deutlich schlechtere JNK1/JNK2-Selektivitäten aufzeigt als **P-94** (42,7-fach), wohingegen die JNK3/JNK2-Selektivität bei dem reversiblen Inhibitor **P-79** stärker ausgeprägt ist (10-fach).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 28: K_d -Wertbestimmung Inhibitor P-79*

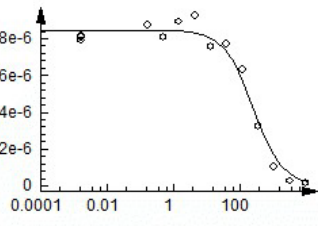
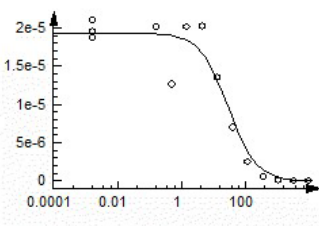
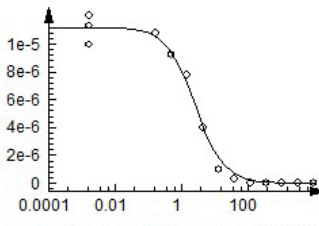
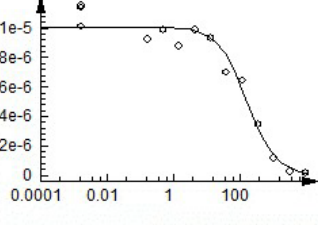
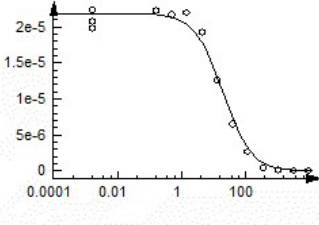
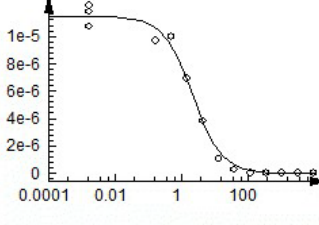
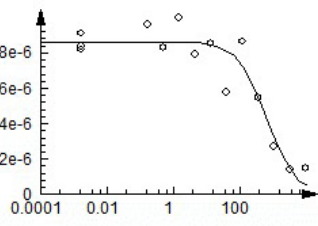
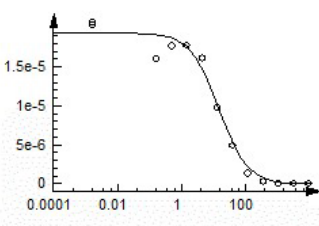
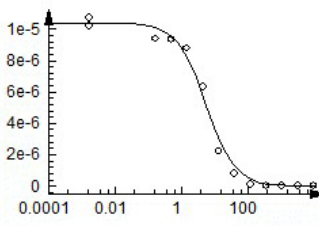
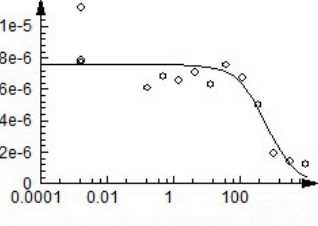
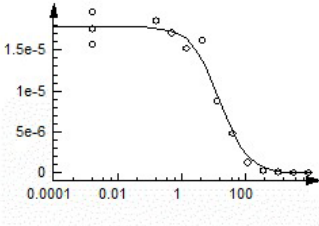
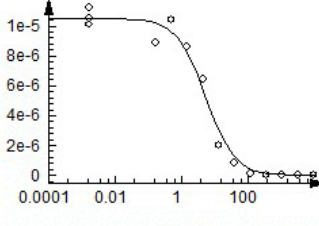
	JNK1	JNK2	JNK3
Replik 1			
	$K_{d1} = 260 \text{ nM}$	$K_{d1} = 29 \text{ nM}$	$K_{d1} = 2,6 \text{ nM}$
Replik 2			
	$K_{d2} = 170 \text{ nM}$	$K_{d2} = 20 \text{ nM}$	$K_{d2} = 2,2 \text{ nM}$
K_d	210 nM	24 nM	2,4 nM
Selektivität	$K_d(\text{JNK1}) / K_d(\text{JNK2}) = 8,8x$		
	$K_d(\text{JNK1}) / K_d(\text{JNK3}) = 87,5x$		
		$K_d(\text{JNK3}) / K_d(\text{JNK2}) = 10,0x$	

Tabelle 29: K_d -Wertbestimmung Inhibitor P-94*

	JNK1	JNK2	JNK3
Replik 1			
	$K_{d1} = 640 \text{ nM}$	$K_{d1} = 15 \text{ nM}$	$K_{d1} = 5,6 \text{ nM}$
Replik 2			
	$K_{d2} = 630 \text{ nM}$	$K_{d2} = 16 \text{ nM}$	$K_{d2} = 5,5 \text{ nM}$
K_d	640 nM	15 nM	5,5 nM
Selektivität	$K_d(\text{JNK1}) / K_d(\text{JNK2}) = 42,7x$		
	$K_d(\text{JNK1}) / K_d(\text{JNK3}) = 116,4x$		
		$K_d(\text{JNK3}) / K_d(\text{JNK2}) = 2,7x$	

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Eurofins DiscoverX (San Diego, CA, USA) erhoben und erstellt.

5.2.6.2 Kinomscreen

Aufgrund der deutlich höheren Selektivität gegenüber JNK1 wurde sich dazu entschlossen, den kovalenten Inhibitor **P-94** einem Kinom-Selektivitäts-Screening zu unterziehen. In dem scanEdge-Produkt des KINOMEScan-Assays bei dem auf 97 Kinasen getestet wurde, zeigte Verbindung **P-94** bei einer Inhibitorkonzentration von 500 nM keine Restaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe nur auf JNK2 (POC = 1,4) und JNK3 (POC = 0,3). Hierbei wurden Kinasen mit einem *POC* (*percentage of control*) > 35% als nicht inhibiert gewertet. Dies entspricht der Standard-Einordnung von Eurofins DiscoverX (siehe Abbildung 31). Welche Kinasen genau im Screening untersucht wurden, ist in Tabelle 30 aufgeschlüsselt.

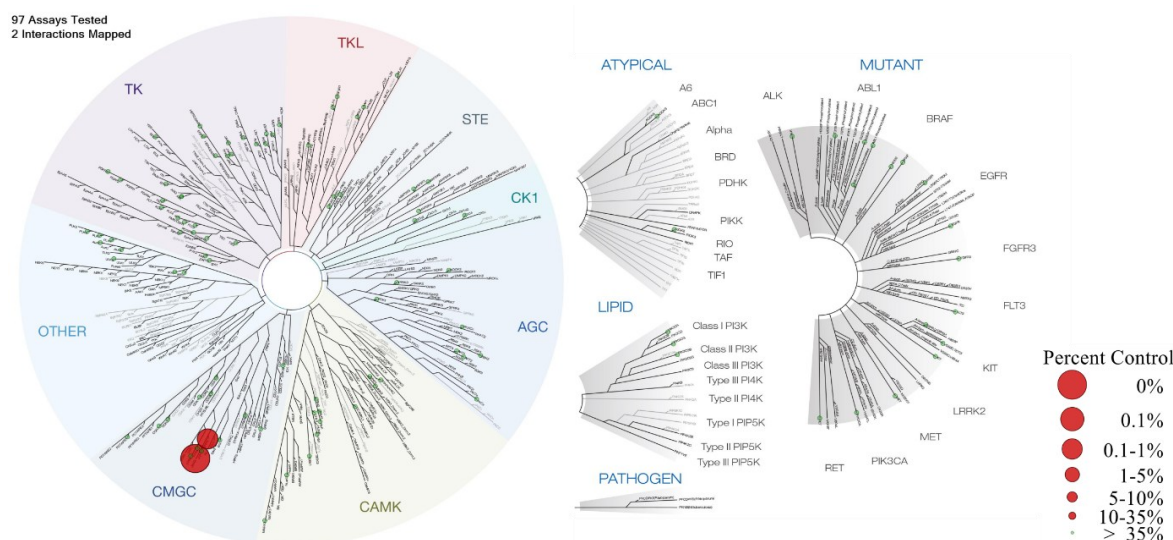


Abbildung 31: KINOMEScan-Assay – scanEdge-Format. Ab einer POC > 35 % wurde nach den Standardkriterien von Eurofins DiscoverX dies als keine Bindung zum jeweiligen Enzym definiert. Dieses Screening wurde bei einer Konzentration von 500 nM **P-94** durchgeführt.¹⁸³ *Disclaimer: „Image generated using TREEspot Software Tool and reprinted with permission from KINOMEScan, a division of DiscoverX Corporation, © DISCOVERX CORPORATION 2010.“*

Tabelle 30: Tabellarische Auflistung der im scanEDGE – KINOMEScan getesteten Kinasen und der dazugehörigen POC-Werte.*

Kinase	POC @ 500 nM (P-94)
ABL1(E255K)-phosphorylated	65
ABL1(T315I)-phosphorylated	100
ABL1-nonphosphorylated	45
ABL1-phosphorylated	88
ACVR1B	80
ADCK3	98
AKT1	100
AKT2	100
ALK	100
AURKA	100
AURKB	100
AXL	87
BMPR2	100
BRAF	100
BRAF(V600E)	100
BTK	100
CDK11	100

Ergebnisse und Diskussion

CDK2	98
CDK3	100
CDK7	100
CDK9	98
CHEK1	99
CSF1R	100
CSNK1D	88
CSNK1G2	93
DCAMKL1	96
DYRK1B	93
EGFR	91
EGFR(L858R)	93
EPHA2	100
ERBB2	47
ERBB4	82
ERK1	99
FAK	100
FGFR2	64
FGFR3	99
FLT3	93
GSK3B	100
IGF1R	92
IKK-alpha	100
IKK-beta	100
INSR	100
JAK2(JH1domain-catalytic)	100
JAK3(JH1domain-catalytic)	100
JNK1	65
JNK2	1.4
JNK3	0.3
KIT	89
KIT(D816V)	100
KIT(V559D,T670I)	100
LKB1	100
MAP3K4	92
MAPKAPK2	100
MARK3	100
MEK1	95
MEK2	95
MET	81
MKNK1	100
MKNK2	100
MLK1	86
p38-alpha	100
p38-beta	93
PAK1	97
PAK2	100
PAK4	91
PCTK1	100
PDGFRA	100
PDGFRB	84
PDPK1	100
PIK3C2B	100
PIK3CA	100
PIK3CG	100
PIM1	95

PIM2	100
PIM3	84
PKAC-alpha	100
PLK1	100
PLK3	100
PLK4	100
PRKCE	42
RAF1	62
RET	100
RIOK2	100
ROCK2	100
RSK2(Kin.Dom.1-N-terminal)	100
SNARK	100
SRC	100
SRPK3	100
TGFBR1	70
TIE2	100
TRKA	100
TSSK1B	100
TYK2(JH1domain-catalytic)	100
ULK2	100
VEGFR2	96
YANK3	100

* Die Hier gezeigten Daten wurden von der CRO Eurofins DiscoverX (San Diego, CA, USA) erhoben.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse & Fazit

Ziel der hier dargelegten Arbeit war es, von mehreren Ausgangsstrukturen ausgehend, eine geeignete „*high-quality chemical probe*“ zu entwickeln, welche isoform-selektiv JNK2 adressiert und idealerweise auch für Tierversuche geeignet ist. Die nachfolgende Abbildung **32** zeigt den Entwicklungsverlauf der zu diesem Zweck generierten und weiterentwickelten Verbindungen.

Ausgegangen wurde von den drei Literaturverbindungen **TCS JNK 5a**, **A-1** und **JNK-IN-8** die jeweils nach unterschiedlichen, struktur-basierten Design-Ansätzen optimiert wurden. **TCS JNK 5a** wurde in seinen HR-II gerichteten Motiven, sowie im *Hinge*-bindenden Motiv modifiziert. Eine Vergrößerung des alicyclischen Ringsystems führte zu einer Erhöhung der JNK1/JNK2-Selektivität, bei gleichzeitiger Verringerung der JNK2-Aktivität (**P-14**). Das Einführen einer basischen Aminogruppe (**P-16**) oder einer Harnstoff-Funktion (**P-17**) in den Alicyclus wurde ebenfalls toleriert.* Die Verkleinerung der Ringsystems (**P-11-P-13**), als auch der Austausch des *Hinge*-Binders führte zu in-aktiven Verbindungen (**P-18 + P-19**). Aufgrund der schlechten Löslichkeit dieser Verbindungsklasse, sowie der ausbleibenden Aktivität von **TCS JNK 5a** im NanoBRET-Assay, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

In einem weiteren Ansatz wurde von der Grundstruktur des kovalenten pan-JNK-inhibitors **JNK-IN-8** ausgegangen und dessen elektrophiler *Warhead* gegen saure Gruppen ausgetauscht. Hiermit wurde versucht, Verbindungen zu synthetisieren, welche über eine Salzbrücke zu His120 (JNK2) eine spezifische Wechselwirkung allein zu JNK2 ausbilden sollten. Allerdings zeigten die generierten Verbindungen Selektivität gegen JNK2 (**P81-P83**), wodurch auch diese Ansatz verworfen wurde.

Auf der Aminopyrazol-basierten Verbindungsklasse von Ausgangsverbindung **A-1** lag in dieser Arbeit der größte Fokus. Zuerst wurde das HR-I adressierenden Motiv von **A-1** chemisch modifiziert. In diesem ersten Set konnte Verbindung **P-10** hergestellt werden, welche ähnlich wie **TCS JNK 5a** einen Naphthyl-Rest in HR-I Position aufweist. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung **A-1** zeigt **P-10** im ³³PanQinase-Assay höhere JNK1/JNK2-Selektivität (16,3-fach), sowie einstellig nanomolare Aktivitäten gegenüber JNK2 (7 nM) und JNK3 (6 nM). Ausgehend von dieser Verbindung wurden in einem nächsten Schritt die HR-II- bzw. lösemitteladressierenden Reste substituiert oder gänzlich entfernt. Ein komplettes Entfernen des HR-II adressierenden Motivs, samt verknüpfender Amidfunktion resultierte in dem Phenyl-Derivat **P-23**, welches hohe Selektivität gegenüber JNK1 aufwies (113,7-fach). Bei der weiteren Substitution der Benzolstruktur durch Pyridinyl-

* Die Inhibitoren **P-14** und **P-16** wurde 2024 in einer Publikation von Iqbal et al. veröffentlicht und in einem korrespondierenden Patent aufgeführt.^{209, 210}

Reste, konnte ein signifikanter Regioisomeren Effekt bezüglich der JNK1/JNK2-Selektivität der Derivate beobachtet werden (*meta* << *para* << *ortho*). Das 2-Pyridinyl-Derivat **P-24** zeigte hierbei exzellente JNK2-Selektivität gegenüber JNK1 (299,7-fach). Angestoßen durch publizierte Thiophen-Pyrazolharnstoff- und Aza-Indazol-basierte JNK3-Inhibitoren von Feng et al. mit übertragbaren SAR, wurden Verbindungen mit reduziertem HR-II adressierenden Resten synthetisiert.^{132, 134} Derivate mit kleinen aliphatische (**P-32**), allylische (**P-49**) sowie alicyclische (**P-38**) Resten zeigten hierbei gute JNK1/JNK2-Selektivitäten bei drei- bis zweistellig nanomolaren Aktivitäten gegenüber JNK2. Größere Reste wurden schlechter toleriert (**P-29 + P 36**), wobei das Einführen von basischen Resten (**P-39-P-41**) zu einer Verbesserung der Aktivität, aber auch zu einer Verschlechterung der JNK2-Selektivität führte. Folgend wurde versucht, die bereits untersuchten SARs miteinander zu kombinieren. Die resultierenden Pikolinsäure- (**P-65 + P-66**) und Isonicotinsäure-Derivate (**P-67 + P-68**) zeigten jedoch schlechtere Selektivitäten als die Ausgangsverbindungen **P-24** und **P-32** und nur mittlere, dreistellig-nanomolaren Aktivitätswerte. Die Linearisierung des Aminopyrazol-basierten Grundgerüsts, führte zu einem Abfall an Aktivität als auch an Selektivität gegenüber JNK1 (**P-56-P-58**). Ebenso führte die Rigidisierung der Verbindung **P-10** zu einem Pyrazolo[1,5-a]chinolin-Derivat, zu dem un-selektiven und wenig aktiven Inhibitor **P-21** (Nicht in Abb. **32** dargestellt).

Versuche, Reste des Typ I $\frac{1}{2}$ p38 α Inhibitors **LN2258** auf das Aminopyrazolgrundgerüst zu übertragen, waren wenig erfolgreich und produzierten hauptsächlich inaktive Inhibitoren (**P-84-P-90**). Allerdings ist eine leichte Tendenz dieses Sets hin zu einer JNK3/JNK2 Selektivität (**P-90** = 4,0-fach) zu erkennen.

Neue SAR wurden auch bei der Invertierung der HR-II gerichteten Amid-Funktion bzw. bei dessen Substitution deutlich. Anilin-Derivate wurde toleriert, wobei das entsprechende Derivat **P-69** eine hohe JNK1/JNK2 Selektivität aufwies (167,0-fach). Das Invertierte Acetamid-Derivat **P-73** zeigt die höchste JNK1/JNK2-Selektivität aller synthetisierten Verbindungen auf (\geq 340,1-fach). Das korrespondierende Trifluoracetamid-Derivat **P-74** besitzt wiederum nicht nur eine hohe JNK1/JNK2-Selektivität, aber auch eine leichte Selektivität gegenüber JNK3 (6,1-fach).

Ausgehend von der Inhibitor Serie mit verkürztem HR-II-Anteil (**P-38**) bzw. von der Reihe mit inversem HR-II gerichteten Amid-Rest (**P-73**), konnten schlussendlich eine reversible (**P-79**), als auch eine kovalente Leitstruktur (**P-94**) entwickelt werden.

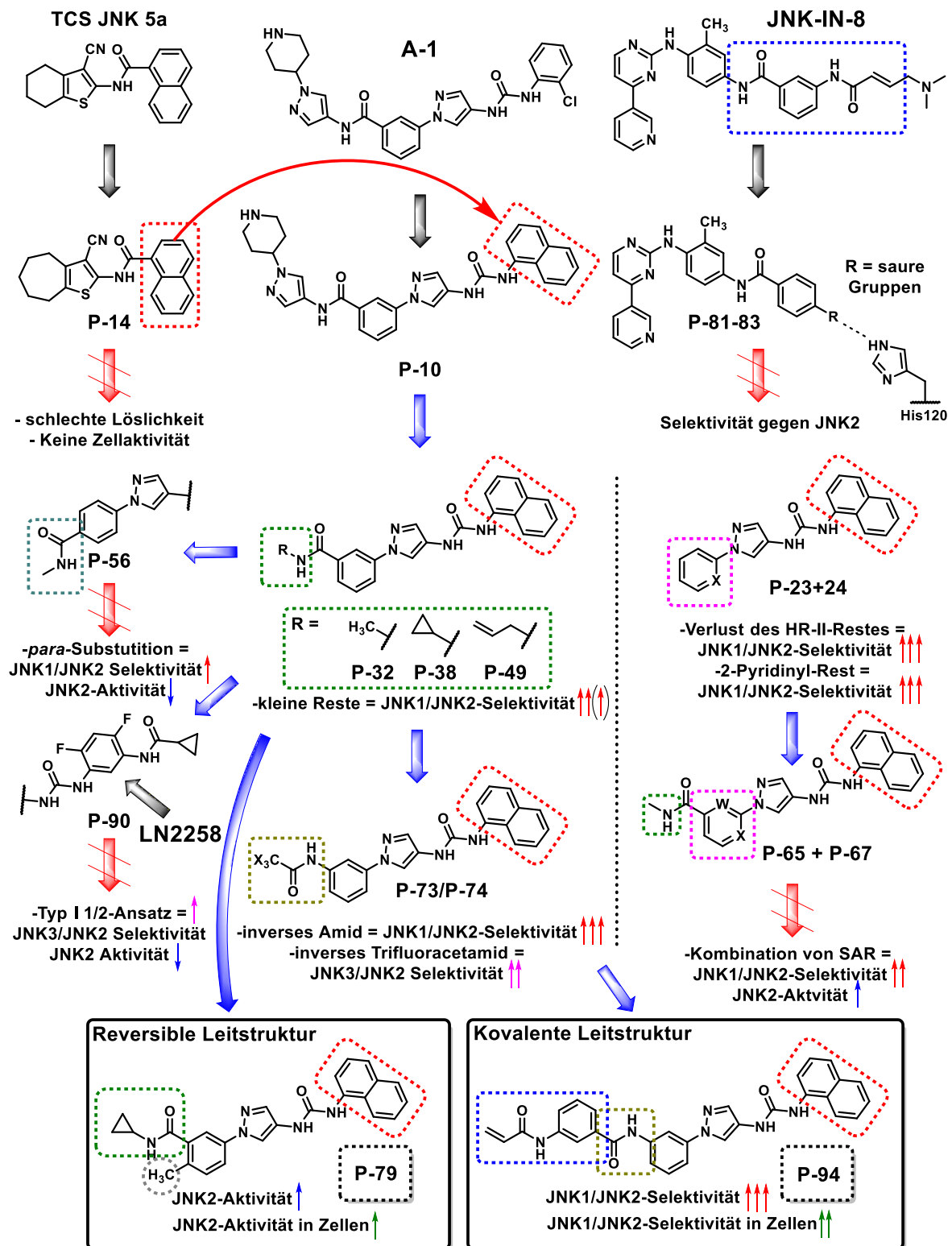


Abbildung 32: Schematischer Entwicklungsverlauf der hier vorgestellten JNK2/3-selektiven Inhibitoren. Legende: JNK1/JNK2-Selektivität > 10x = ↑, > 30x = ↑↑, > 100 = ↑↑↑, < 10x = ↓, < 5 = ↓↓, < 1 = ↓↓↓; $\text{IC}_{50}^{(33\text{PanQinase-JNK2})}$ < 1000 nM = ↑, < 100 nM = ↑↑, < 10 nM = ↑↑↑, < 5000 nM = ↓, < 20000 nM = ↓↓, < 100000 nM = ↓↓↓; $\text{EC}_{50}^{(\text{NanoBRET-JNK2})}$ < 5000 nM = ↑, < 1000 = ↑↑; JNK3/JNK2-Selektivität = 3-5 = ↑, > 5 = ↑↑.

Die reversible Leitstruktur **P-79** ist hierbei eine Kombination aus dem Cyclopropylamid-Derivat **P-38** und der in 2-er Position methylierten Version von **P-10**, dem Inhibitor **P-77**. **P-77** zeigte die höchste Aktivität von allen im $^{33}\text{PanQinase}$ -Assay getesteten Verbindungen (JNK2 = 4 nM, JNK3 = 6 nM). Die so designte Leitstruktur **P-79** zeigte nicht nur zweistellig nanomolare Aktivitäten gegen JNK2/3 (64nM) und eine gute Selektivität gegen JNK1 (49,6-fach) im biochemischen Assay auf, sondern erzielte auch einen Effekt im zellulären NanoBRET-Assay ($\text{EC}_{50}(\text{JNK2}) = 1555 \pm 156 \text{ nM}$). Hier wurde eine gewisse zelluläre Isoform-Selektivität ($\text{EC}_{50}(\text{JNK1})/\text{EC}_{50}(\text{JNK2}) = 6,4\text{x}$) von **P-79** beobachtet.

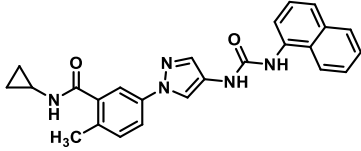
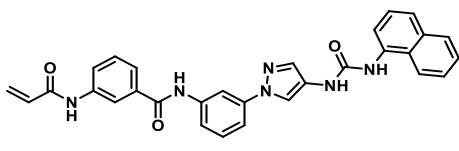
Die kovalente Leitstruktur **P-94** hingegen, wurde durch einen struktur-basierten Ansatz aus den Inhibitoren **P-73** und **JNK-IN-8** gebildet. Durch das Übertragen des elektrophilen *Warheads*, samt verknüpfender 3-Aminobenzamid-Linkerstruktur von **JNK-IN-8** auf die Aminopyrazol-Grundstruktur mit inverser Amidkomponente (**P-73**), konnte ein kovalenter Inhibitor entwickelt werden. Dieser Inhibitor zeigte gute JNK1/JNK2 Selektivitäten im $^{33}\text{PanQinase}$ -Assay (120,5-fach), sowie eine Enzyminaktivierungseffizienz ($k_{\text{inact}}/K_{\text{i}}$) im Bereich von $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für beide Isoformen (JNK2 = $38200 \pm 470 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, JNK3 = $70100 \pm 1500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Im GSH-Stabilitäts-Assay zeigte der Inhibitor eine geringe intrinsische Reaktivität gegenüber Schwefel-Nukleophilen ($t_{1/2} = 88,9 \text{ h}$) im Vergleich zum FDA-zugelassenen Inhibitor Afatinib ($t_{1/2} = 8,64 \text{ h}$). Über IPMS-Versuche sowie NanoBRET-basierte Auswaschexperimente konnte die Bindung zum Zielprotein, sowie die Bindungsamino-säure Cys116 (JNK2) bzw. Cys154 (JNK3) eindeutig bestätigt werden. Im NanoBRET-Assay zeigt **P-94** sowohl einen sub-mikromolaren EC_{50} ($883 \pm 340 \text{ nM}$) für JNK2, als auch eine zelluläre JNK1/JNK2-Selektivität von $\approx 11,3$ -fach auf.

Eine komplette Darstellung der entwickelten Aminopyrazol-Verbindungen samt ihrer biochemischen und biologischen SARs sind im Anhang in Abb. **33** zusammengefasst.

Zusammenfassung der Ergebnisse & Fazit

Die so final entwickelten Leitstrukturen, können nun auf Ihre Tauglichkeit zu einer *high-quality chemical probe* hin bewertet werden (siehe **Tabelle 31**).

Tabelle 31: Evaluation der reversiblen und kovalenten Leitverbindung auf „high-quality chemical probe“ Kriterien.

Kriterien	Reversible Inhibitoren		Kovalente Inhibitoren	
	Leitstruktur		Leitstruktur	
				
	Kriterien	P-79	Kriterien	P-94
Biochemische Potenz	<100 nM	IC ₅₀ (JNK2) = 64 nM (✓) IC ₅₀ (JNK3) = 64 nM (✓)	Bestimmung der Inaktivierungsrate (k_{inact}/K_i)	k_{inact}/K_i (JNK2) = 38200 (± 470 1/M*1/s) (✓) k_{inact}/K_i (JNK3) = 70100 (± 1500 1/M*1/s) (✓)
Zelluläre Potenz	<1 µM	EC ₅₀ (JNK2-NanoBRET) = 1555 ± 156 nM (✗) EC ₅₀ (JNK3-NanoBRET) = 3646 ± 1499 nM (✗)	<1 µM	EC ₅₀ (JNK2-NanoBRET) = 883 ± 340 nM (✓) EC ₅₀ (JNK3-NanoBRET) = ND
Zielstruktur-validierung	Bestimmung der Zielstrukturbindung in Zellen etc.	NanoBRET (✓)	Bestimmung der Bindungsamino-säure	Mutagenese JNK2 (C116A) und JNK3 (C154A) NanoBRET Verdrängungs-Assay (✓)
Selektivität	> 30x innerhalb der Proteinfamilie	ND	Proteom-weite Selektivität Oder: > 30x innerhalb der Proteinfamilie	Bei 500 nM im ScnaEDGE-Kinomscan (✓)
Kontrollen (inaktiv)	Kontrollverbindung mit ähnlicher Struktur <u>und gleicher reaktiver Gruppe</u> aber >100x schwächerer Bindung	z.B.: P-52 (✓)	Kontrollverbindung mit ähnlicher Struktur <u>und gleicher reaktiver Gruppe</u> aber >100x schwächerer Bindung	P-92 allerdings nur im PhosphoSense-Assay (✓?)
Chemische Stabilität	Stabilität in Medium	ND	Keine überhöhte/promiskuitive Reaktivität	t _{1/2} (GSH) = 88,9 h (✓)
Zelltoxizität	Toxizität in Zellen erst ab >10x zellulärer Potenz	ND	Toxizität in Zellen erst ab >10x zellulärer Potenz	ND
Verbindungs-spezifische Eigenschaften	Vermeiden von PAINs und promiskuitive Struktur-motive. + Gute Löslichkeit	ND	Vermeiden von PAINs und promiskuitive Struktur-motive. + Gute Löslichkeit	ND

In dieser Arbeit konnten die folgenden Ergebnisse erzielt werden:

- Es konnten mehrere, reversible-bindende Leitstrukturen auf Basis des Aminopyrazol-Grundgerüsts entwickelt werden, welche in einem biochemischen Assay hohe Isoform-Selektivität gegenüber JNK1 (>100-fach) zeigten (**P-32**, **P-49**, **P-69**, **P-73**, **P-74**).
 - Weitere SARs dieser Strukturklasse gegenüber den JNKs wurden beobachtet.
 - Ausgewählte Vertreter dieser Reihe an reversiblen JNK2/3-isoform-selektiven Verbindungen zeigten gute metabolische Stabilität (**P-32**, **P-38**, **P-72**), Wirkung auf *downstream* gelegene Substrate der JNKs in Zellen (**P-32**), sowie vielsprechende Halbwärtszeiten in Maus-Pharmakokinetik-Experimenten (**P-32**, **P-38**, **P-49**, **P-69**, **P-73**).
 - Es ist gelungen einen elektrophilen *Warhead* samt verknüpfender Struktur auf das Aminopyrazol-Grundgerüst zu übertragen, um einen kovalent-bindenden Inhibitor zu generieren (**P-94**). Dieser Inhibitor zeigt vierstellige $k_{\text{inakt}}/K_{\text{I}}$ -Werte für JNK2 als auch für JNK3 und ein sauberes Kinomselektivitätsprofil. Die Ausbildung der irreversiblen Bindung zur Zielstruktur (JNK2) wurde nachgewiesen und die Bindungsaminosäure konnte eindeutig bestimmt werden (JNK2 + JNK3).
 - Die reversible Leitstruktur **P-79** als auch die kovalent-bindenden Leitstruktur **P-94** zeigten sowohl Aktivität als auch Isoform-Selektivität im zellulären NanoBRET-Assay.
- ⇒ Insgesamt wurden **94** Testverbindungen generiert.
- ⇒ Zum Zeitpunkt der Finalisierung dieser Arbeit befand sich Verbindung **P-94** in einem *Review-Prozess* durch das *scientific expert review panel* (SERP) des *chemical probes* Portals (chemicalprobes.org).^{142, 222} In diesem wird **P-94** auf seine Tauglichkeit zu einer *high-quality chemical probe* hin evaluiert.

Die größte Herausforderung stellt weiterhin die Entwicklung von Hemmstoffen mit Selektivität zwischen den beiden Isoformen JNK2 und JNK3 dar. Die starke Ähnlichkeit, speziell innerhalb der orthosterischen ATP-Bindetasche führt dazu, dass Nuancen an strukturellen Unterschieden zwischen den beiden Isoformen ausgenutzt werden müssen, um eine entsprechende Selektivität zu generieren. Ein möglicher Ansatzpunkt ist ein Aminosäure-Unterschied in der *R-Spine* zwischen Leu77 bei JNK2 und Met115 bei JNK3, welcher sich über Inhibitoren von Typ II und Typ I $\frac{1}{2}$ adressieren lassen müsste. Die hier beschriebenen Kinaseinhibitoren vom potentiellen Typ I $\frac{1}{2}$ lassen einen Trend bereits erkennen, allerdings sind weitere Studien und mehr Optimierungsarbeit nötig, um reine JNK2-isoform-selektive Verbindungen zu generieren.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Methoden, Materialien und Chemikalien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden Chemikalien von kommerzieller Qualität ohne weitere Aufbereitung verwendet. Trockene Lösemittel wurden direkt nutzfertig erworben (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, DE).

Analytisches Reaktionsmonitoring via Normalphasen Dünnschicht-Chromatographie (DC) wurde auf DC Kieselgel 60 F₂₅₄-(Merck, Darmstadt, DE) oder ALUGRAM Xtra SIL G UV254-(Macherey Nagel, Düren, DE) Kieselgelplatten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht bei zwei Wellenlängen ($\lambda = 254 \text{ nm} \ \& \ 366 \text{ nm}$).

Präparative Aufreinigung via Flash-Chromatographie wurde entweder auf einer Interchim PuriFlash 430 oder PuriFlash XS420 (Interchim, Montluçon, FR) durchgeführt. Die Verbindungen wurde, sofern nicht explizit beschrieben, via Trockenauftragung auf die Trennsäulen beladen. Hierzu wurde die Verbindungen in einem geeigneten LM gelöst und auf Celite R 503 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) am Rotationsverdampfer imprägniert/ wieder einrotiert. Für die Vorsäulen wurde Geduran Si Ø 60-200 μm Silikagel (Merck, Darmstadt, DE) genutzt. Für die selbst gepackten Normalphasen-Trennsäulen wurde wiederum Davisil LC60Å Ø 20-45 μm Silikagel (Grace Davison, Columbia, MD, USA) genutzt. Für präparative Aufreinigungen via Umkehrphasen-Flüssigchromatographie wurden vorgepackte puriFlash C18AQ Trennsäulen eingesetzt.

7.1.1 Reinheitsbestimmung (HPLC)

Via *high performance liquid chromatography* (HPLC) wurde allgemein die Reinheit der hergestellten Verbindungen evaluiert, aber auch der GSH-Assay wurde hiermit durchgeführt. Über einen UV/Vis-*dioden array detektor* (DAD) wurde die Absorption der eingespritzten Proben bei den beiden Wellenlängen $\lambda = 254 \ \& \ 230 \text{ nm}$ gemessen. Je nach Verwendung wurden unterschiedliche *Setups* genutzt.

Allgemeine Methode zur Reinheitsbestimmung:

Die Reinheitsbestimmung wurde auf einem Agilent Technologies 1100 series system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) unter Verwendung einer Phenomenex Luna 5 μ (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) C8 Umkehrphasen Trennsäule (Phenomenex, Torrance, CA, USA) bei einer Fließrate von 1,5 mL/min. und mit einem Injektionsvolumen von 10 μL durchgeführt. Für die Flüssige Phase wurde MeOH in HPLC-Qualität (Phase A) sowie 0,01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{aq.})$ (pH = 2,3) in Reinstwasser (Phase B) innerhalb einer Gradienten-Chromatographie-Methode, wie in Tabelle 32 dargestellt, genutzt.

Tabelle 32: Chromatographische Methode zur Reinheitsbestimmung.

t	Phase A (MeOH)	Phase B (0,01 M KH₂PO₄ -Puffer, pH = 2,3)
Startpunkt t ₀ = 0 min.	40 %	60 %
0-8 min.	85 %	15 %
8-13 min.	85 %	15 %
13-14 min.	40 %	60 %
14-16 min.	40 %	60 %

Methode des GSH-Assays:

Zur Bestimmung der Stabilität von potentiell kovalent agierenden Verbindungen im GSH-Assay wurde eine Phenomenex Kinetex C8 100A (150 mm x 4,6 mm, 2,6 µm) (Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA) Trennsäule verwendet. Hierbei wurde eine Fließrate von 0,5 ml/min. und ein Injektionsvolumen von 5 µL verwendet. Über einen integrierten HPLC-Ofen wurde die Proben konstant auf einer Temp. von 40 °C gehalten. Die Chromatographie-Methode verlief wie in Tabelle 33 beschrieben. Die AUC des UV/vis-Signals der gemonitorten Verbindungen wurde bei 254 nm bestimmt.

Tabelle 33: Chromatographische Methode für den GSH-Assay

t	Phase A (MeOH)	Phase B (0,01 M KH₂PO₄ -Puffer, pH = 2,3)
Startpunkt t ₀ = 0 min.	40 %	60 %
0-9 min.	95 %	5 %
9-10 min.	95 %	5 %
10-11 min.	40 %	60 %
11-16 min.	40 %	60 %

7.1.2 Identitätsbestimmung

Die Identitätsbestimmung der synthetisierten Verbindungen wurde via *nuclear magnetic resonance* Spektroskopie (NMR), unterschiedlichen Apparaturen zur Massenspektrometrie, als auch durch *attenuated total reflection - Fourier transform* Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR) durchgeführt.

7.1.2.1 NMR

Die NMR-Spektren wurde auf einem Bruker AVANCE III HD, -HDX 400 oder -HDX 700-Gerät vermessen. Die Signale sind in ppm relativ zu dem Signal von Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) angegeben und gegen die jeweiligen Residualsignale der eingesetzten deuterierten Lösemittel kalibriert.

7.1.2.2 Massenspektrometrie

DC-MS (ESI):

Massenspektren wurde u.a. über ein Plate Express® TLC-Plattenleser (Advion, Ithaca, NY, USA) gekoppelten ExPresslon kompakt Massenspektrometer (Advion, Ithaca, NY, USA) mit Elektrospray-Ionisations- (ESI-) Quelle vermessen.

ASAP-MS (APCI):

Via *atmospheric pressure chemical ionization*- (APCI-) Quelle vermessene Verbindungen wurden über eine *atmospheric solid analysis probe* (ASAP) gekoppeltes ExPresslon-S kompakt Massenspektrometer (Advion, Ithaca, NY, USA) vermessen.

LCHR-MS (ESI):

HR-MS Messungen wurde von Benedikt Masberg aus der Arbeitsgruppe von Prof. Lämmerhofer an der Universität Tübingen durchgeführt. Die genau hierzu entwickelte Methodik und die genutzten Gerätschaften wurde in einer Publikation von Sander et. al bereits veröffentlicht.²²³

7.1.2.3 ATR FTIR

Die IR-Spektren wurden auf einem Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) gemessen. Es wurden 8-10 charakteristische Signale in die jeweilige Analytik mit aufgenommen.

7.2 WB-Protokoll

Für die zelluläre Testung via Western Blots wurden entweder in 2 cm Ø 6-Well-Plates pro Napf 2×10^5 adhärenente murine hepatozelluläre Krebszellen (*Nras*^{G12V}; *Cdkn2a*^{ARF-/-}) ausgesät und jeweils in 2 mL *Dulbecco's Modified Eagle Medium*- (DMEM-) Anzuchtmedium angezüchtet, oder es wurden in 10 cm Ø Petrischalen 10^6 Zellen in 10 mL DMEM-Anzuchtmedium bebrütet.

Im Folgenden werden nur die Konditionen des *6-well-plate-Setups* beschrieben. Weitere Unterschiede zum 10 cm Ø Petrischalen-*Setup* sind:

- Osmotischer Reiz: gesetzt durch insgesamt 250 mM Sorbitol Inkubation.
- Die auf die Gele geladenen Ladungs-Proben wurden auf eine Gesamtproteinkonzentration von 100 µg normalisiert.

Inkubation:*

Nach ca. 24 h Anzucht wird 2 mL Anzuchtmedium mit DMSO bzw. der entsprechenden Inhibitorkonzentration (2x konzentriert) auf die Zellen gegeben um die gewünschte Endkonzentration auf den Platten zu erhalten (V = 4 mL). Die Zellen werden nun 2 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert und anschließend mit 0,286 mL einer 2 M Sorbitol-Lösung in *phosphate-buffered saline* (PBS) (pH eingestellt auf 7,2) versetzt. Es wird entsprechend eine Endkonzentration von 133 µM Sorbitol erreicht. Die Platten werden nun wiederum 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation werden die Platten auf Eis gelegt. Das Medium samt Inhibitor und Sorbitol wird entfernt, der Napf nachgewaschen und die jeweilige Zellkultur mittels Schaber und 2x 0,5 mL PBS-Puffer (pH = 7,4) in ein Eppendorfgefäß überführt.

Zell-Lyse:

Die jeweiligen Proben auf Eis werden zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die sichtbaren Zellkolonien werden mit 200 µL Radioimmunpräzipitations-Assay- (RIPA-) Lysepuffer versetzt und gut vermengt. Die Zellen werden unter ständiger Kühlung sonifiziert, bis keine sichtbaren Zellbestandteile mehr zu sehen sind.

Proteinbestimmung:

In einer 96-Wellplatte wird via DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE) siehe Kapitel 4.8.1, die Gesamtproteinmenge pro Probe bestimmt.

Probenvorbereitung:

Die Proben werden mit PBS-Puffer (pH = 7,4) und Lämmli-Puffer (4x) derart gemischt, dass sich in allen Proben eine Gesamtproteinkonzentration von 55 µg Protein befindet. Die Proben werden bei 96 °C für 5-10 min auf einem Heizblock unter schütteln inkubiert (Die Beladungsproben können bei -20 °C eingefroren werden).

Probenanalyse:

Nach einem Standardprotokoll für *sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-Page) werden die entsprechenden Gele (Laufgele = 10 %) gegossen, laufen gelassen (90-130 V für 1,5 – 2 h) und auf Membrane transferiert (Immobilion-P PVDF-Membrane (Merck KGaA, Darmstadt, DE). Die entstehenden Blots werden mit 5 %-Lösung von bovinem Serumalbumin- (BSA-) über Nacht geblockt und mit den gewünschten Antikörpern oder Vinculin-Antikörper (V9131; Sigma Aldrich) inkubiert. Die Vinculinbanden werden als Ladungsprobe verwendet. Nach einem Tag werden die bebrüteten Blots mit dem jeweiligen anti-Tier-AB, und die initial mit Vinculin bebrüteten Blots mit anti-Mouse-AB versetzt und einen weiteren Tag lang inkubiert. Die Blots werden via ChemiDoc MP imaging system ausgewertet, unter Verwendung von Clarity Western enhanced chemiluminescence (ECL) Substrat (Bio-Rad Laboratories).

* Das hier dargelegte Protokoll wurde von Stefan Zwirner bzw. der Arbeitsgruppe Zender am Universitätsklinikum Tübingen etabliert.

7.2.1 Eingesetzte Puffer und Medien für die Zellanzucht und WB- Herstellung

DMEM (full) Anzuchtmedium:

<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	500 mL
<i>fetal bovine serum</i> (FBS)	50 mL
Natrium Pyruvat (100 mM)	5 mL
Pen Strep	5 mL
MEM <i>Non-Essential Amino Acids</i> (NEAA) (100x)	5 mL

Lyse-Puffer (RIPA-Buffer) (frisch, 2-8°C):

1 M Tris-HCl (pH = 8)	500µL
5 M NaCl	300µL
Triton X-100	100µL
10% Sodium deoxycholat (lichtempfindlich)	500µL
10% SDS	100µL
Protease Inhibitor Mini pill (Roche, Ref#4693159001)	1 Tabl.
PhosSTOP (Roche)	1 Tabl.
zu 10 mL mit MilliQ Wasser auffüllen	

Proben-Puffer (Laemmli-Puffer) (4x) (-20°C):

1 M Tris-HCl-Puffer (pH = 6,8)	10ml
Sodiumdodecylsulfat	4,0g
Glycerol	20mL
B-Mercaptoethanol	10mL
Bromphenolblau	0.1g
zu 50 mL mit MilliQ Wasser auffüllen	

SDS-Page Lauf-Puffer (1x):

Tris Base	3.02g
Glycin	14.4g
SDS	1g
Zu 1000 mL mit MilliQ Wasser auffüllen	

Transfer-Puffer (1x):

Tris Base	3.02g
Glycin	14.4g
MeOH	150 mL
Zu 1000 mL mit MilliQ Wasser auffüllen	

Tris-buffered saline + 0,1% Tween 20 (TBS-T) (1x):

1M Tris-HCl (pH 7.4) (50 mM)	50 mL
5M NaCl (150 mM)	30mL
Tween 20	1mL
Zu 1000 mL with MilliQ Wasser auffüllen	

Laufgel:

	10% (6 Gele)
MilliQ Wasser	24,6 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	15 mL
10 % (w/v) SDS	600 μ L
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/ 0.8% w/v)	20 mL
TEMED	40 μ L
10%(w/v) Ammoniumpersulfate	300 μ L

Sammelgel:

	4% (6 Gele)
MilliQ Wasser	12,2 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 mL
10 % (w/v) SDS	200 μ L
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/ 0.8% w/v)	2,68 mL
TEMED	20 μ L
10%(w/v) Ammoniumpersulfate (APS)	100 μ L

7.3 Allgemeine Synthesevorschriften (ASV):

ASV-1: Ullmann-artige, liganden-gestützte Kupplung

In einem Schlenk-Kolben/-Rohr wird 4-Nitro-1*H*-pyrazol oder Ethyl-4-pyrazolcarboxylat vorgelegt, zusammen mit dem entsprechendem Arylhalogenid und Cs₂CO₃ bzw. K₂CO₃. Die Komponenten werden in trockenem DMF suspendiert und der Kolben wird 3x evakuiert und mit Argon wieder begast. Im Argon Gegenstrom wird nun Cu(I)I sowie *trans*-*N,N'*-dimethylcyclohexan-1,2-diamin zugegeben. Der Ansatz wird erneut 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Folgend wird der Ansatz verschlossen und auf 90-100°C erhitzt bis die Pyrazol-Komponente aufgebraucht ist, oder der Ansatz abgebrochen wird. Nach Abschluss der Reaktion wurde der Ansatz mit 10 % HCl (aq.)-Lösung oder Wasser versetzt. Ausgefallenes Produkt wurde abgesaugt, mit salzsaurem Wasser gewaschen und im Umluftofen getrocknet. Fällt das Produkt nicht aus, wird die salzsaure Lösung mit EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und weiter aufgereinigt.

ASV-2: Carbonsäureamid-Kupplung

ASV-2a: EDC-HOBt-Methode

Die entsprechende Carbonsäure wird zusammen mit HOBt Monohydrat (+14-20 wt.% Wasser) und EDC·HCl in trockenem DCM, THF oder DMF gelöst, vorgelegt. Der Ansatz wird im Eis-Wasserbad gekühlt und DIPEA wird zum Ansatz gegeben. Nach 5-30 min. wird die Amin-Komponente zugegeben. Nach wenigen min. wird die Kühlung entfernt. Nach vollständiger Umsetzung wird der Ansatz mit Wasser versetzt. Hierbei ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und nachgewaschen mit Pentan oder Et₂O. Fällt das Produkt nicht aus oder wird DCM als Lösemittel genutzt, wird der Ansatz 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und eingeeengt. Falls nötig wird das Produkt via Flashchromatographie aufgereinigt.

ASV-2b: Methode mit Carbonsäurehalogeniden

Die entsprechenden Amine werden vorgelegt und in trockenem Pyridin gelöst. Unter Eis-Wasserbad-Kühlung wird das Carbonsäurechlorid langsam zugegeben. Nach Ablauf der initialen exothermen Reaktion wird die Kühlung entfernt. Die Reaktion wird bei RT rühren gelassen bis zur vollständigen Umsetzung eines der beiden Edukte.

ASV-2c: CDI-Methode

Die entsprechende Carbonsäure-Komponente sowie CDI wird vorgelegt und in trockenem THF gelöst. Die Säureaktivierung wird nach wenigen Stunden gemonitort, wobei eine Probe mit Isobutylamin vermengt und via DC und DC-MS analysiert wird. Konnte das

Isobutylamin-Derivat via DC-MS identifiziert werden und ist eine quantitative Umsetzung vorhanden, so wird das Amin zugegeben. Die Reaktion wird am nächsten Tag abgebrochen. Das so erhaltene Produkt wird weiter aufgereinigt.

ASV-2d: HATU-Methode

Die entsprechende Carbonsäure sowie HATU wird vorgelegt und trockenem THF oder DMF gelöst. DIPEA wird zugegeben und die Reaktion wird 30-60 min. bei RT rühren gelassen. Folgend wird das Amin zugegeben. Am nächsten Tag wird Wasser zum Ansatz gegeben. Ausgefallenes Produkt wird abfiltriert. Andernfalls wird das Produkt gegen EtOAc extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. *crudes* Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt.

ASV-3 Reduktion von Nitrofunktionen

ASV-3a: Béchamp-Reduktion mit Fe(0) von N-arylierten 4-Nitropyrazolen

Das entsprechende 4-Nitropyrazol-Derivat, Fe(0)-pulver sowie NH_4Cl wird vorgelegt und in einer Mischung aus EtOH und H_2O suspendiert. Der Ansatz wurde auf $60\text{-}70^\circ\text{C}$ erhitzt für 45 min. – 3 h, oder bis die Nitroverbindung vollständig zum Amin umgesetzt ist. Nach dem Abkühlen der Reaktion, wird der Ansatz über Celite filtriert und stark mit MeOH und EtOH nachgespült. Die alkoholischen Lösemittel wir am Rotationsverdampfer wieder abgenommen, und die verbleibende wässrige Phase wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Die organische Phase wird mit 1-2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x reextrahiert mit EtOAc. Die vereinten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und zur Trockene einrotiert.

ASV-3b: Katalytische Hydrierung mittels Pd/C im Überdruckreaktor

Das entsprechende Edukt wird innerhalb eines miniclave[®] Glasreaktors (Büchi) vorgelegt und in EtOAc/ EtOH oder MeOH dispergiert. Der Reaktor wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird Pd/C zugegen. Der Ansatz wird abermals 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Folgend wird 6-7 bar H_2 aufgedrückt und der Reaktor wird verschlossen. Je nach eingesetzten Ausgangsmaterialien wird unter leichtem Erwärmen im Wasserbad die Reaktion bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Die erhaltenen Lösungen werden über Celite filtriert und zur Massenkonstanz am Rotationsverdampfer eingengt.

ASV-4: Veresterung von Benzoessäure-Derivaten

Die entsprechende Säure wird vorgelegt und in einem Überschuss an technischen MeOH suspendiert. Nach der Zugabe einer katalytischen Menge konzentrierter H₂SO₄ wird die Reaktion zum Reflux erhitzt bis das Substrat vollständig aufgebraucht ist. Nach dem Abkühlen wird das ausgefallene Produkt vakuumfiltriert und getrocknet.

ASV-5: Methylester-VerseifungASV-5a: Methode mit KOH

Der entsprechende Methylester wird zusammen mit einem Überschuss KOH vorgelegt und in einer Mischung von MeOH und H₂O (20+1) suspendiert. Der Ansatz wird bei 60 °C über Nacht gerührt oder bis zur vollständigen Umsetzung.

ASV-5b: Methode mit LiOH

Der entsprechende Methylester wird in einer Mischung aus MeOH und H₂O suspendiert, wobei bei geringer Löslichkeit des Edukts auch THF zugesetzt wird. Ein Überschuss an 1 M LiOH-Lösung wird zum Ansatz gegeben. Dieser wird bei RT bis zur vollständigen Umsetzung des Esters gerührt.

ASV-6: Gewalt-Reaktion

Das entsprechende Keton wird zusammen mit elementarem gelben Schwefel und der CH-aciden bicarbonylischen Verbindung vorgelegt und in EtOH gelöst. Es wird TEA oder Morpholin dazugegeben und der Ansatz wird bei 50-70 °C o.n. erhitzt. Bei de Einsatz von Boc-geschützten Piperidinonen ist keine Erwärmung notwendig.

ASV-7: HarnstoffbildungASV-7a: Methode mit Isocyanaten

Die entsprechende Amine werden vorgelegt und in trockenem DCM oder THF gelöst. Das Isocyanat wird zugegeben und die Lösung wird bei RT über Nacht rühren gelassen. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt. Verblieb das Produkt in Lösung, wird der MeOH zum Ansatz gegeben und der Ansatz einrotiert. Nach dem Entfernen des Lösemittels, wird der Ansatz via Flash-Chromatographie aufgereinigt.

ASV-7b: Methode mit Phenylcarbamaten

Das entsprechende Anilin wird vorgelegt und in ACN gelöst. Folgend wird der Ansatz via Eis-Wasserbad gekühlt und Phenylchlorformiat wird zugegeben. Anschließend wird Pyridin (1 eq.) zugegeben und die Kühlung wird nach 5-30 min. Rühren wieder entfernt. Nachdem eine Reaktionskontrolle via DC die vollständige Umsetzung zum intermediären Carbamat

anzeigt, wird das Pyrazolamin-Derivat hinzugegeben sowie DIPEA (2 eq.). Der Ansatz wird über Nacht bei RT oder leichtem Erhitzen (40-60 °C) rühren gelassen. Nun wird ausgefallenes Produkt abfiltriert oder der Ansatz mit Wasser versetzt, wodurch das Produkt ausfällt und abfiltriert werden kann.

ASV-8: HCl-saure Entschützung von Boc-geschützten Amin

Das entsprechend Boc-geschützte Derivat wird in EtOH gelöst und ein 10x Überschuss an HCl (in EtOH, 1,25 M) wird zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei 60°C rühren gelassen. Nach Reaktionskontrolle via HPLC wird der Ansatz einrotiert, in Et₂O oder Pentan wieder aufgenommen, geschallt und vakuumfiltriert.

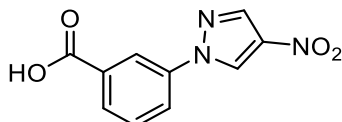
7.4 Synthesevorschriften (Vorstufen):

Hinweis:

In Folgenden Kapiteln 7.4 und 7.5, wurden bei der NMR-Analytik als auch bei der Massenanalytik Punkte als Dezimaltrennzeichen verwendet.

7.4.1 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.2

3-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-1**)



Summenformel: C₁₀H₇N₃O₄

Exakte Masse: 233,04

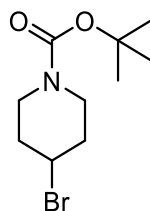
Molekulargewicht: 233,18

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

5000 mg 4-Nitropyrazol (44,22 mmol; 1 eq.), 13333 mg 3-Brombenzoesäure (66,32 mmol; 1,5 eq.) sowie 43220 mg Cs₂CO₃ (132,6 mmol; 3 eq.) werden in einem Schlenk-Kolben vorgelegt. Die Edukte werden in 200 mL trockenem DMF suspendiert. Es wird eine Argon-Atmosphäre aufgebaut und im Argon-Gegenstrom wird 1684 mg Cu(I) (8,843 mmol; 0,2 eq.) sowie 2,79 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (17,69 mmol; 0,4 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen und für 20 h bei 95 °C gerührt. Der Ansatz wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Der ausfallende FS wird abgesaugt und mit 10 % HCl (aq.) nachgewaschen. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 9020 mg (88 %); Reinheit: 98,3 % (254,4 nm); 96,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.36 (br s, 1H), 9.87 – 9.67 (m, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.51 – 8.42 (m, 1H), 8.20 (ddd, J = 8.2, 2.4, 1.0 Hz, 1H), 8.03 – 7.92 (m, 1H), 7.69 (t, J = 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.3, 138.5, 137.1, 137.0, 132.4, 130.1, 128.8, 128.5, 123.5, 120.1; DC-MS (ESI) *m/z*: 232.0 [M-H]⁻.

tert-Butyl-4-brompiperidin-1-carboxylat (**S-2**)



Summenformel: C₁₀H₁₈BrNO₂

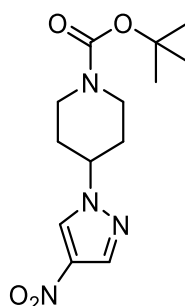
Exakte Masse: 263,05

Molekulargewicht: 264,16

2000 mg 4-Brompiperidin·HBr (8,165 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 20 mL trockenem DCM suspendiert. Folgend wird tropfenweise unter Eisbadkühlung 2,78 mL DIPEA zugegeben (16,33 mmol; 2 eq.). Nach dem Abklingen der exothermen Reaktion wird das Eisbad entfernt und der Ansatz 30 min. bei RT gerührt. 1782 mg Di-*tert*-butyldicarbonat (8,165 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei RT rühren gelassen. Die Lösung wird 1x mit verdünnter HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die erhaltene wässrige Phase wird 1x reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird 1x mit ges. NH₄Cl (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Massenkonzanz am Rotationsverdampfer eingengt. Das erhaltene *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/PE: 10/90 isokratisch). Man erhält das Produkt als gelbes Öl (Ausbeute: 2009 mg (93 %); Reinheit: HPLC-Methode ungeeignet für Reinheitsbestimmung).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.37 – 4.29 (m, 1H), 3.72 – 3.62 (m, 2H), 3.34 – 3.26 (m, 2H), 2.13 – 2.03 (m, 2H), 1.97 – 1.86 (m, 2H), 1.45 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.7, 79.9, 49.6, 42.2, 35.7, 28.5.

tert-Butyl-4-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-3**)



Summenformel: C₁₃H₂₀N₄O₄

Exakte Masse: 296,15

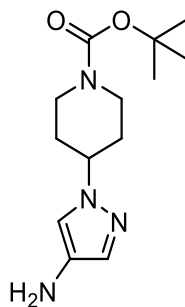
Molekulargewicht: 296,33

820 mg 4-Nitropyrazole (7,252 mmol; 1 eq.) sowie 3006 mg K₂CO₃ (21,75 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL trockenem ACN suspendiert. Folgend wird 3448 mg S-2 (13,05 mmol; 1,8 eq.) zugegeben und mit 10 mL trockenem ACN in den Ansatz gespült. Der Ansatz wird 53 h bei 85 °C zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird mit 50 mL demin. Wasser versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das erhaltene *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie (EtOAc/Pe: 20/80 – 50/50) aufgereinigt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Man erhält das Produkt als gelbes Öl, welches im Hochvakuum als weißer FS auskristallisiert (Ausbeute: 1385 mg (61 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 97,3 % (230,0 nm)).

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 4.34 – 4.21 (m, 3H), 2.89 (t, $J = 12.8$ Hz, 2H), 2.16 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 1.90 (qd, $J = 12.2, 3.9$ Hz, 2H), 1.47 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 154.6, 135.9, 135.7, 126.4, 80.4, 60.8, 42.6, 32.1, 28.5; DC-MS (ESI) m/z : 196.8 $[\text{M-Boc+H}]^+$; 230.7 $[\text{M-Boc+Cl}]^-$.

tert-Butyl-4-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-4**)



Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$

Exakte Masse: 266,17

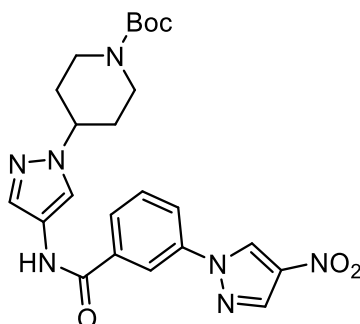
Molekulargewicht: 266,35

Die Synthese wird nach ASV-3b durchgeführt.

3000 mg S-3 (10,12 mmol; 1 eq.) werden innerhalb eines miniclave[®] Glasreaktors (Büchi) in 90 mL EtOAc aufgelöst. Der Reaktor wird 3x alternierend evakuiert und mit Argon begast. Im Argon-Gegenstrom wird 151 mg (10 %) Pd/C (0,1417 mmol (Pd); 0,014 eq.) zugegeben. Der Reaktor wird mit 7 bar H_2 beladen. Der Ansatz wird bei 40 °C bis zur vollständigen Umsetzung rühren gelassen. Der Ansatz wird über Watte gefiltert und via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als himbeerrotes Öl, welches zu einem hell-roten FS auskristallisiert (Ausbeute: 2648 mg; 98 %; Reinheit: 95,5 % (254,4 nm); 97,3 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.06 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 4.12 (tt, $J = 11.4, 4.0$ Hz, 1H), 3.99 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 3.79 (s, 2H), 2.85 (br s, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.67 (qd, $J = 12.4, 4.4$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.9, 130.6, 128.9, 114.5, 78.8, 57.7, 42.4 (Signal unterdrückt), 31.9, 28.1; DC-MS (ESI) m/z : 289.6 $[\text{M+Na}]^+$.

tert-Butyl-4-(4-(3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-5**)



Summenformel: C₂₃H₂₇N₇O₅

Exakte Masse: 481,21

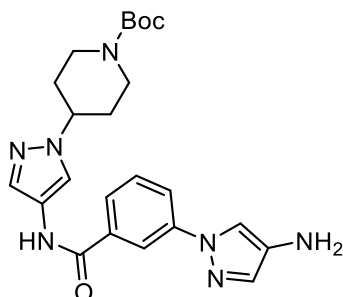
Molekulargewicht: 481,51

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

2250 mg S-1 (9,649 mmol; 1 eq.), 3700 mg EDC·HCl (19,30 mmol; 2 eq.) und 3546 mg HOBt Monohydrat (19,30 mmol; 2 eq.) (enthält 20 wt.% Wasser) werden vorgelegt und in 40 mL trockenem DCM suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 5 mL DIPEA (28,95 mmol; 3 eq.) werden zugegeben. Der Ansatz wird 20 min rühren gelassen, 2621 mg S-4 (9,842 mmol; 1.02 eq.) werden zugegeben und mit 15 mL DCM nachgespült. Die Kühlung wird entfernt und die Reaktion wird über Nacht rühren gelassen. Der Ansatz wird mit 100 mL demin. Wasser versetzt. Der Ansatz wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und zur Trockene eingengt. Das *crude* Produkt wurde via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als rot-orangene Flakes (Ausbeute: 3809 mg; (82 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 100,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.60 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.49 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.72 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 4.37 (tt, J = 11.3, 3.9 Hz, 1H), 4.04 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 2.90 (s, 2H), 2.05 – 1.95 (m, 2H), 1.78 (qd, J = 12.4, 4.3 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3, 153.8, 138.4, 137.0, 136.9, 135.7, 130.3, 129.9, 128.3, 127.1, 122.2, 121.2, 119.2, 118.5, 78.7, 58.0, 42.3 (Signal unterdrückt), 31.8, 28.0; DC-MS (ESI) *m/z*: 371.6 [M-Boc+H]⁺; 504.6 [M+Na]⁺; 480.6 [M-H]⁻; 516.6 [M+Cl]⁻.

tert-Butyl-4-(4-(3-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-6**)



Summenformel: C₂₃H₂₉N₇O₃

Exakte Masse: 451,23

Molekulargewicht: 451,53

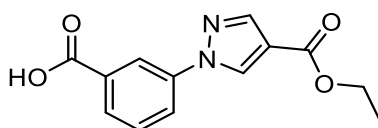
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

500 mg S-5 (1,04 mmol; 1 eq.), 580 mg Fe(0)-Pulver (10,4 mmol; 10 eq.) sowie 555 mg NH₄Cl (10,4 mmol; 10 eq.) werden vorgelegt und in 45 mL einer EtOH:H₂O-Mischung (2:1) suspendiert. Der Ansatz wird auf 65-70 °C erhitzt und für 45 min. gerührt. Man lässt den Ansatz auf RT abkühlen und filtriert ihn über Celite. Die alkoholische Komponente wird am Rotationsverdampfer entfernt und der wässrige Rest wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Die Mischung wird 2x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen und die entstehende wässrige Phase wird 1x reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und zur Trockene eingeeengt. Man erhält das Produkt als roter FS (Ausbeute: 418 mg (89 %); Reinheit: 97,5 % (254,4 nm); 96,7 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.54 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.74 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.36 (tt, J = 11.3, 3.8 Hz, 1H), 4.27 (br s, 2H), 4.04 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 2.90 (br s, 2H), 1.99 (d, J = 10.2 Hz, 2H), 1.78 (qd, J = 12.4, 4.3 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.0, 153.9, 140.1, 135.4, 133.9, 133.1, 130.3, 129.6, 123.6, 121.4, 119.7, 119.2, 115.8, 112.1, 78.8, 58.0, 42.4 (Signal unterdrückt), 31.9, 28.1; DC-MS (ESI) *m/z*: 474.7 [M+Na]⁺; 450.7 [M-H]⁻; 486.7 [M+Cl]⁻.

7.4.2 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.2.1

3-(4-(Ethoxycarbonyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-7**)



Summenformel: C₁₃H₁₂N₂O₄

Exakte Masse: 260,08

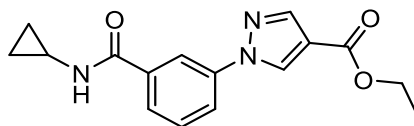
Molekulargewicht: 260,25

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

1350 mg Ethyl-4-pyrazolcarboxylat (9,63 mmol; 1 eq.) sowie 2324 mg 3-Brombenzoesäure (11,56 mmol; 1,2 eq.) und 9416 mg Cs_2CO_3 (28,90 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 40 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 92 mg $\text{Cu}(\text{I})\text{I}$ (0,48 mmol; 0,05 eq.) sowie 0,304 mL *trans-N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (1,93 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 100 °C erhitzt und für 16 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H_2O sowie (10 %) HCl (aq.)-Lösung versetzt. Die Lösung wird 3x mit EtOAc extrahiert. Folgend wird die organische Phase 3x mit 1-2 M NaOH (aq.)-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird angesäuert bis FS präzipitiert. Der FS wird abgesaugt, mit demin. H_2O gewaschen. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 1833 mg (73 %); Reinheit: 93,5 % (254,4 nm); 93,4 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.25 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.47 – 8.41 (m, 1H), 8.19 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.93 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.65 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); DC-MS (ESI) m/z : 261.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 305.3 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$; 259.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Ethyl-1-(3-(cyclopropylcarbamoyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-carboxylat (**S-8**)



Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$

Exakte Masse: 299,13

Molekulargewicht: 299,33

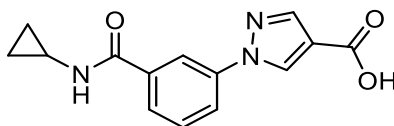
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

500 mg S-7 (1,923 mmol; 1 eq.) sowie 737 mg $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (3,845 mmol; 2 eq.) und 685 mg HOBt Monohydrat (3,845 mmol; 2 eq.) (enthält 14 wt.% Wasser) werden vorgelegt und in 20 mL trockenem DMF suspendiert, während der Ansatz via Eis-Wasserbad gekühlt wird. Folgend wird 1,308 mL DIPEA (7,689 mmol; 4 eq.) zugegeben. Nach 5 min. wird 266 μL Cyclopropylamin (3,845 mmol; 2 eq.) zugegeben. Die Kühlung wird entfernt und die Reaktion wird für 24 h bei RT gerührt. Folgend wird die Lösung mit demin. Wasser versetzt, wobei das Produkt ausfällt. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 416 mg (72 %); Reinheit: 97,6 % (254,4 nm); 97,6 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.12 (s, 1H), 8.59 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.07 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.95 – 2.82 (m, 1H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.78 – 0.69 (m, 2H), 0.64

Experimenteller Teil

– 0.56 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.4, 162.0, 141.9, 138.8, 135.8, 131.3, 129.7, 126.2, 121.6, 117.6, 116.4, 60.1, 23.1, 14.3, 5.8; DC-MS (ESI) m/z : 322.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 354.5 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$; 298.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

1-(3-(Cyclopropylcarbamoyl)phenyl)-1H-pyrazol-4-carbonsäure (**S-9**)

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$

Exakte Masse: 271,10

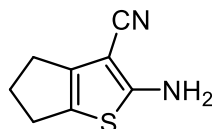
Molekulargewicht: 271,28

Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

200 mg S-8 (0,668 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) suspendiert. Folgend wird 3,341 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (3,341 mmol; 5 eq.) zugegeben. Die Reaktion wurde für 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit (10 %) HCl (aq.)-Lösung angesäuert. Hierbei präzipitiert das Produkt. Der FS wird abfiltriert, wodurch man das Produkt als weißen FS erhält (Ausbeute: 151 mg (83 %); Reinheit: 97,6 % (254,4 nm); 97,7 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.69 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.59 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 8.31 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.05 (ddd, $J = 8.0, 2.1, 0.8$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.87 (tq, $J = 7.9, 4.0$ Hz, 1H), 0.75 – 0.70 (m, $J = 7.1, 4.7$ Hz, 2H), 0.63 – 0.57 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.5, 163.5, 142.2, 138.9, 135.8, 131.3, 129.7, 126.0, 121.5, 117.6, 117.4, 23.1, 5.8.

7.4.3 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.3

2-Amino-5,6-dihydro-4H-Cyclopenta[*b*]thiophen-3-carbonitril (**S-10**)

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$

Exakte Masse: 164,04

Molekulargewicht: 164,23

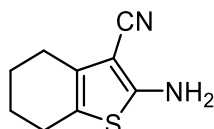
Die Synthese wurde nach ASV-6 durchgeführt.

190 mg Schwefel (5,9439 mmol; 1 eq. (bezogen auf atomaren Schwefel)), 393 mg Malononitril (5,9439 mmol; 1 eq.) sowie 0,528 mL Cyclopentanon (5,9439 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in insgesamt 30 mL EtOH suspendiert. Es wird 0,828 mL TEA (5,9439 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird bei 70°C über Nacht erhitzt. Nach

vollständiger Umsetzung (Monitoring via DC: 20 % EtAc in Hexan), wird der Ansatz abkühlen gelassen und das Lösemittel wird abgenommen. Der Ansatz wird in EtOAc sowie Anteilen von THF und DCM wieder aufgenommen. Die organische Phase wird mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 2x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert, eingeeengt und via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Pe: 10/90 – 40/60). Man erhält das Produkt als gelbräunliche Kristalle (Ausbeute: 365 mg (37 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 99,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.01 (s, 2H), 2.68 – 2.62 (m, 2H), 2.59 – 2.53 (m, 2H), 2.30 – 2.21 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.6, 141.0, 121.3, 116.4, 78.8, 28.9, 28.0, 26.7; DC-MS (ESI) *m/z*: 219.3 [M+Na+MeOH]⁺.

2-Amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-3-carbonitril (**S-11**)



Summenformel: C₉H₁₀N₂S

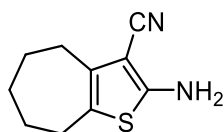
Exakte Masse: 178,06

Molekulargewicht: 178,25

Die Synthese wurde nach ASV-6 durchgeführt.

391 mg Schwefel (12,2262 mmol; 1 eq. (bezogen auf atomaren Schwefel)), 808 mg Malononitril (12,2262 mmol; 1 eq.) sowie 1,263 mL Cyclohexanon (12,2262 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in insgesamt 60 mL EtOH suspendiert. Es wird 1,704 mL TEA (12,2262 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird bei 70°C über Nacht erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (Monitoring via DC: 30 % EtAc in Pe), wird der Ansatz abkühlen gelassen, das Lösemittel wird abgenommen und der Ansatz via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Pe: 15/85 – 35/65). Man erhält das Produkt als gelber FS (Ausbeute: 1019 mg (47 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 100,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.94 (s, 2H), 2.43 – 2.36 (m, 2H), 2.35 – 2.28 (m, 2H), 1.76 – 1.61 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 131.1, 116.8, 116.2, 83.2, 24.0, 23.5, 23.0, 21.8; DC-MS (ESI) *m/z*: 233.3 [M+Na+MeOH]⁺; 201.3 [M+Na]⁺; 177.3 [M-H]⁻.

2-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]thiophen-3-carbonitril (**S-12**)Summenformel: C₁₀H₁₂N₂S

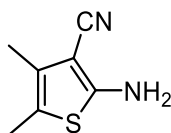
Exakte Masse: 192,07

Molekulargewicht: 192,28

Die Synthese wurde nach ASV-6 durchgeführt.

143 mg Schwefel (4,4575 mmol; 1 eq. (bezogen auf atomaren Schwefel)), 294 mg Malononitril (4,4575 mmol; 1 eq.) sowie 0,526 mL Cycloheptanon (4,4575 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in insgesamt 30 mL EtOH suspendiert. Es wird 0,621 mL TEA (4,4575 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird bei 70°C über Nacht erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (Monitoring via DC: 20 % EtAc in Hexan), wird der Ansatz abkühlen gelassen und das Lösemittel wird abgenommen. Der Ansatz wird in EtOAc wieder aufgenommen. Die organische Phase wird mit einer Mischung aus ges. NaCl (aq.)-Lösung und ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen und die wässrige Phase wird 2x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert, eingengt und via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Pe: 10/90 – 35/65). Man erhält das Produkt als gelb-orange Flakes (Ausbeute: 445 mg (52 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 99,2 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.43 (s, 2H), 2.64 – 2.59 (m, 2H), 2.59 – 2.54 (m, J = 6.8, 4.4 Hz, 2H), 1.86 – 1.76 (m, 2H), 1.68 – 1.58 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.9, 137.0, 124.0, 116.0, 92.1, 32.0, 29.5, 29.3, 28.2, 27.3; DC-MS (ESI) *m/z*: 247.2 [M+Na+MeOH]⁺.

2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-carbonitril (**S-13**)Summenformel: C₇H₈N₂S

Exakte Masse: 152,04

Molekulargewicht: 152,21

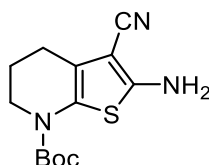
Die Synthese wurde nach ASV-6 durchgeführt.

444 mg Schwefel (13,8677 mmol; 1 eq. (bezogen auf atomaren Schwefel)), 916 mg Malononitril (13,8677 mmol; 1 eq.) sowie 1,242 mL 2-Butanon (13,8677 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in insgesamt 60 mL EtOH suspendiert. Es wird 2,416 mL

Morpholin (27,7354 mmol; 2 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird bei 50°C über Nacht erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (Monitoring via DC: 20 % EtAc in Hexan), wird der Ansatz abkühlen gelassen und auf Eis-Wasser gegossen. Der FS wird abgesaugt und in geeignetem LM (EtOH) umkristallisiert. Man erhält das Produkt als gelblichen FS (Ausbeute: quant.; Reinheit: 94,2 % (254,4 nm); 97,7 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6.87 (s, 2H), 2.07 (d, J = 0.7 Hz, 3H), 1.93 (d, J = 0.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.4, 128.9, 117.1, 114.1, 85.9, 12.9, 12.5.

tert-Butyl-2-amino-3-cyano-5,6-dihydrothieno[2,3-*b*]pyridin-7(4*H*)-carboxylat (**S-14**)



Summenformel: C₁₃H₁₇N₃O₂S

Exakte Masse: 279,10

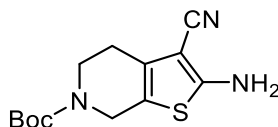
Molekulargewicht: 279,36

Die Synthese wurde nach ASV-6 durchgeführt.

80 mg Schwefel (2,5094 mmol; 1 eq. (bezogen auf atomaren Schwefel)), 166 mg Malononitril (2,5094 mmol; 1 eq.) sowie 500 mg 1-Boc-3-piperidon (2,5094 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in insgesamt 30 mL EtOH suspendiert. Es wird 0,350 mL TEA (2,5094 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird bei RT über das Wochenende rühren gelassen. Nach vollständiger Umsetzung (Monitoring via DC: 20 % EtAc in Hexan) wird das Lösemittel abgenommen. Der Ansatz wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Hexan: 20/80 – 60/40). Man erhält das Produkt als gelber FS (Ausbeute: 137 mg (20 %); Reinheit: 93,2 % (254,4 nm); 97,3 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6.93 – 6.60 (m, 2H), 3.64 (s, 2H), 2.38 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 1.87 (s, 2H), 1.47 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159.0, 151.5, 118.7, 116.5, 116.3, 81.0, 44.3, 27.9, 22.0, 21.5.

tert-Butyl-2-amino-3-cyano-4,7-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(5*H*)-carboxylat (**S-15**)



Summenformel: C₁₃H₁₇N₃O₂S

Exakte Masse: 279,10

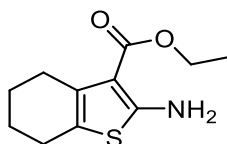
Molekulargewicht: 279,36

Die Synthese wurde nach ASV-6 durchgeführt.

Experimenteller Teil

80 mg Schwefel (2,5094 mmol; 1 eq. (bezogen auf atomaren Schwefel)), 166 mg Malononitril (2,5094 mmol; 1 eq.) sowie 500 mg 1-Boc-4-piperidon (2,5094 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in insgesamt 30 mL EtOH suspendiert. Es wird 0,350 mL TEA (2,5094 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird bei RT über das Wochenende rühren gelassen. Nach vollständiger Umsetzung (Monitoring via DC: 20 % EtAc in Hexan) wird das Lösemittel abgenommen. Der Ansatz wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Hexan: 15/85 – 40/60). Man erhält das Produkt als gelb-orangene Kristalle (Ausbeute: 574 mg (82 %); Reinheit: 98,5 % (254,4 nm); 99,7 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.13 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 3.55 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.40 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H); DC-MS (ESI) m/z : 334.3 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$; 277.7 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Ethyl-2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-3-carboxylat (**S-16**)

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$

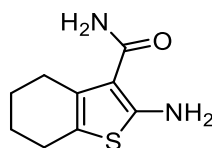
Exakte Masse: 225,08

Molekulargewicht: 225,31

Die Synthese wurde nach ASV-6 durchgeführt.

1598 mg Schwefel (49,9236 mmol; 1 eq. (bezogen auf atomaren Schwefel)), 5647 mg Ethylcyanoacetat (49,9236 mmol; 1 eq.) sowie 5,174 mL Cyclohexanon (49,9236 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in insgesamt 100 mL EtOH suspendiert. Es wird 6,958 mL TEA (49,9236 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird bei Rückfluss über Nacht erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (Monitoring via DC: 20 % EtAc in Pe), wird der Ansatz abkühlen gelassen und das Lösemittel wird abgenommen. Der Ansatz wird in EtOAc wieder aufgenommen. Die organische Phase wird 2x mit ges. NH_4Cl (aq.)-Lösung und 1x mit demin. H_2O gewaschen. Die vereinte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert, eingengt. Das Produkt wird in EtOH umkristallisiert. Man erhält das Produkt als gelb-bräunliche Nadeln (Ausbeute: 7137 mg (63 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.20 (s, 2H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.41 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 1.72 – 1.60 (m, 4H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165.1, 162.9, 131.3, 115.4, 102.6, 58.6, 26.5, 23.9, 22.8, 22.4, 14.4.

2-Amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-3-carboxamid (**S-17**)Summenformel: C₉H₁₂N₂OS

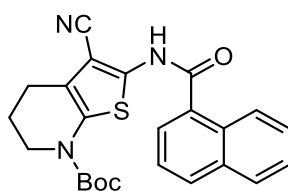
Exakte Masse: 196,07

Molekulargewicht: 196,27

2 mL konz. H₂SO₄ wird vorgelegt. Unter Eis-Aceton-Kühlung wird 200 mg S-11 (1,122 mmol; 1 eq.) unter starkem Rühren portionsweise zugegeben. Die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird 3 d bei RT rühren gelassen. Nach vollständiger Umsetzung (Monitoring via HPLC) wird der Ansatz vorsichtig auf Eis gekippt. Die entstehende Mischung wird mit K₂CO₃ neutralisiert. Die wässrige Lösung wird 2x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phase werden 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Der Ansatz wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH:DCM). Man erhält das Produkt als braunen FS (Ausbeute: 203 mg (92 %); Reinheit: 98,5 % (254,4 nm); 98,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.91 (d, J = 19.6 Hz, 2H), 6.51 (s, 2H), 2.58 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.43 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 1.68 (d, J = 5.0 Hz, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 159.0, 130.0, 115.6, 107.6, 25.9, 24.0, 22.7, 22.6; DC-MS (ESI) *m/z*: 219.2 [M+Na]⁺; 251.2 [M+Na+MeOH]⁺.

tert-Butyl-2-(1-naphthamido)-3-cyano-5,6-dihydrothieno[2,3-*b*]pyridin-7(4*H*)-carboxylat

(S-18)Summenformel: C₂₄H₂₃N₃O₃S

Exakte Masse: 433,15

Molekulargewicht: 433,53

Die Synthese wurde nach ASV-2b durchgeführt.

114 mg S-14 (0,4081 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt. Diese werden in 10 mL trockenem Pyridin gelöst. Zum Ansatz wird 61 µl Naphthoesäurechlorid (0,4081 mmol; 1 eq.) gegeben. Der Ansatz wird 20 h bei 80°C gerührt. Folgend wird erneut 22 µL Naphthoesäurechlorid (0,1428 mmol; 0,35 eq.) zur heißen Lösung gegeben und 2 h gerührt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, mit EtOAc verdünnt und 2x mit 10% HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das Produkt wird

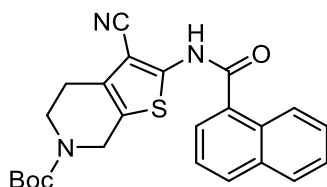
Experimenteller Teil

via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Hexan: 10/90 – 40/60). Folgend wird der Ansatz mit EtOAc wieder aufgenommen und 3x mit 2 M NaOH-Lösung gewaschen. Der Ansatz wird erneut via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Hexan: 10/90 – 40/60). Man erhält das Produkt als FS (Ausbeute: 73 mg (41 %); Reinheit: 98,8 % (254,4 nm); 98,2 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.02 (s, $J = 18.3$ Hz, 1H), 8.43 – 8.35 (m, 1H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J = 9.2, 7.5$ Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 7.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.64 – 7.52 (m, 3H), 4.55 (s, 2H), 3.71 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.68 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 1.50 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.3, 165.7, 154.7, 147.8, 134.0, 132.8, 130.8, 130.4, 128.8, 128.1, 127.1, 126.4, 125.1, 124.7, 113.9, 93.7, 80.7, 60.5, 28.6, 24.3, 21.2, 14.3; DC-MS (ESI) m/z : 456.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 432.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

tert-Butyl-2-(1-naphthamido)-3-cyano-4,7-dihydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6(5*H*)-carboxylat

(S-19)



Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

Exakte Masse: 433,15

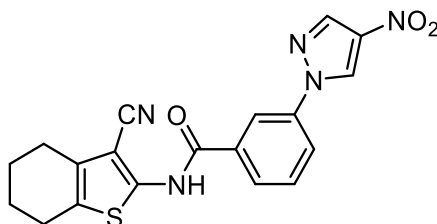
Molekulargewicht: 433,53

Die Synthese wurde nach ASV-2b durchgeführt.

60 mg S-15 (0,2148 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt. Diese werden in 5 mL trockenem Pyridin gelöst. Zum Ansatz wird 40 μL Naphthoesäurechlorid (0,2684 mmol; 1,25 eq.) gegeben. Der Ansatz wird 20 h bei 80°C gerührt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt, mit EtOAc verdünnt und 2x mit 10% HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Hexan: 20/80 – 40/60). Man erhält das Produkt als neongelber kristalliner FS (Ausbeute: 91 mg (98 %); Reinheit: 99,5 % (254,4 nm); 99,0 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) m/z : 456.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 432.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

N-(3-Cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-2-yl)-3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid
(S-20)



Summenformel: C₁₉H₁₅N₅O₃S

Exakte Masse: 393,09

Molekulargewicht: 393,42

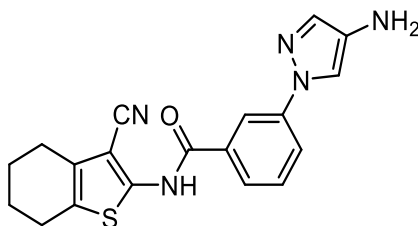
Schritt 2 wird nach ASV-2b durchgeführt.

Schritt 1: Vorgelegt wird 350 mg S-1 (1,5019 mmol; 1 eq.), diese werden in 15 mL trockenem DCM suspendiert. Im Ansatz wird N₂-Atmosphäre aufgebaut. Es wird 1 tropfen DMF (kat.) zum Ansatz gegeben. Folgend wird tropfenweise 0,386 mL Oxalylchlorid (4,5057 mmol; 3 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird 2 h bei RT gerührt, bis keine Gasbildung mehr ersichtlich ist (Blasenzähler). Das Lösemittel wird abgenommen und der gelbweiße FS wird direkt in Schritt 2 weiterverwendet.

Schritt 2: Zur aktivierten Carbonsäure aus Schritt 1 wird 268 mg S-11 (1,5019 mmol; 1 eq.) gewogen. Unter Eis-Kühlung werden die Edukte in trockenem Pyridin gelöst. Der Ansatz wird verschlossen, auf 80°C erhitzt und 7h gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird der Ansatz mit H₂O versetzt. Hierbei fällt ein weiß-gelber FS aus. Der FS wird abgesaugt und mit 10 % HCl und Wasser gewaschen. Weiterhin wird der FS mit EtOAc und wenig DCM gewaschen. Man erhält eine erste Produktfraktion (F1 = 276 mg). Das Filtrat wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und eingeeengt. Der entstehende FS wird erneut in wenig EtOAc aufgenommen und filtriert um die zweite Produktfraktion zu erhalten (F2 = 46 mg). (Ausbeute: 322 mg (54 %); Reinheit: 85,6 % (254,4 nm); 91,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.86 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.52 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.25 – 8.19 (m, 1H), 8.00 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.76 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 2.68 – 2.59 (m, 2H), 2.60 – 2.52 (m, 2H), 1.82 – 1.75 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.1, 145.9, 138.3, 137.2, 137.0, 133.9, 131.6, 130.0, 129.0, 128.5, 128.0, 123.1, 119.3, 114.1, 96.3, 23.6, 23.5, 22.6, 21.7; DC-MS (ESI) *m/z*: 392.1 [M-H].

3-(4-Amino-1H-pyrazol-1-yl)-N-(3-cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophen-2-yl)benzamid (**S-21**)



Summenformel: C₁₉H₁₇N₅OS

Exakte Masse: 363,12

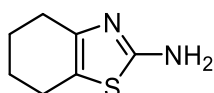
Molekulargewicht: 363,44

Der Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

150 mg von S-20 (0,3813 mmol; 1 eq.) sowie 213 mg Fe(0)-Pulver (3,8127 mmol; 10 eq.) und 204 mg NH₄Cl (3,8127 mmol; 10 eq.) werden vorgelegt. Der Ansatz wird in 20 ml EtOH:H₂O (3:1) suspendiert und 1h auf 65-70°C erhitzt. Folgend wird der Ansatz auf 75-80°C für 4 weitere h erhitzt und dann über Nacht bei RT weitergerührt. Der Ansatz wird über Celite filtriert und mit MeOH nachgewaschen. Die alkoholischen Komponenten werden abgenommen und der feste Rückstand mit EtOAc wieder aufgenommen. Die organische Phase wird 1x gegen 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen und 1x gegen ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die entstandenen wässrigen Phase wird 1x gegen EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt, bleibt aber *crude* (MeOH/DCM: 1,5/98,5 – 10/90). Man erhält das Produkt als gelb-brauner FS (Ausbeute: 109 mg; Das Produkt wird *crude* im nächsten Schritt eingesetzt).

DC-MS (ESI) *m/z*: 386.2 [M+Na]⁺; 362.1 [M-H]⁻.

4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-amin (**S-22**)



Summenformel: C₇H₁₀N₂S

Exakte Masse: 154,06

Molekulargewicht: 154,23

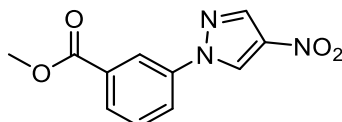
0,527 mL Cyclohexanon (5,0942 mmol; 1 eq.) sowie 776 mg Thioharnstoff (10,1885 mmol; 2 eq.) und 646 mg I₂ (5,0942 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Der Ansatz wird lösemittelfrei auf 105 °C über Nacht erhitzt (ab ca. 70 °C verflüssigt sich der Ansatz). Der abgekühlte Ansatz wird mit 6 M NaOH (aq.)-Lösung versetzt sowie mit gleicher Menge DCM und für mehrere Stunden rühren gelassen, bis sich der gesamte Rückstand auflöst. Der Ansatz

wird 3x mit DCM extrahiert. Man erhält das *crude* Produkt als FS (Ausbeute: 550 mg; Das Produkt wird *crude* im nächsten Schritt eingesetzt).

DC-MS (ESI) m/z : 155.2 $[M+H]^+$.

7.4.4 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.4.1

Methyl-3-(4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-23**)



Summenformel: $C_{11}H_9N_3O_4$

Exakte Masse: 247,06

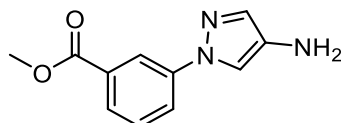
Molekulargewicht: 247,21

Die Synthese wird nach ASV-4 durchgeführt.

500 mg S-1 (2,144 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 25 mL MeOH suspendiert werden. Es werden 3 Tropfen H_2SO_4 werden zugesetzt. Der Ansatz wird auf Reflux für 20 h erhitzt. Nachdem der Ansatz abgekühlt ist, wird das präzipitierte Produkt abfiltriert und mit wenig kaltem MeOH gewaschen. Man erhält das Produkt als weiße Nadeln (Ausbeute: 403 mg (76 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 99,8 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.76 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.71 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 165.3, 138.6, 137.2, 137.0, 131.2, 130.4, 128.6, 128.6, 123.8, 119.9, 52.5; DC-MS (ESI) m/z : 248.5 $[M+H]^+$.

Methyl-3-(4-amino-1H-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-24**)



Summenformel: $C_{11}H_{11}N_3O_2$

Exakte Masse: 217,09

Molekulargewicht: 217,23

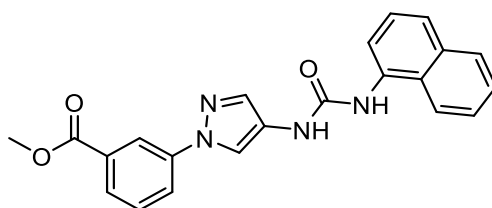
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

6000 mg S-23 (24,27 mmol; 1 eq.) sowie 6778 mg Fe(0)-Pulver (121,35 mmol; 5 eq.) und 6491 mg NH_4Cl (121,35 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 500 ml EtOH:H₂O (3:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 1,25 h bei 60 °C erhitzt. Folgend wird der Ansatz weitere 3,75 h bei 65 °C rühren gelassen. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 1x

 Experimenteller Teil

mit ges. NaCl (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Lösung wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als braunroten FS (Ausbeute: 4797 mg (91 %); Reinheit: 94,2 % (254,4 nm); 89,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.28 – 8.21 (m, 1H), 7.92 (ddd, J = 8.2, 2.3, 0.9 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.76 – 7.72 (m, J = 7.8 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.25 (br s, 2H), 3.88 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 140.3, 134.0, 133.4, 130.8, 129.9, 125.1, 121.2, 117.3, 112.0, 52.3; DC-MS (ESI) *m/z*: 218.0 [M+H]⁺.

 Methyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-25**)


Summenformel: C₂₂H₁₈N₄O₃

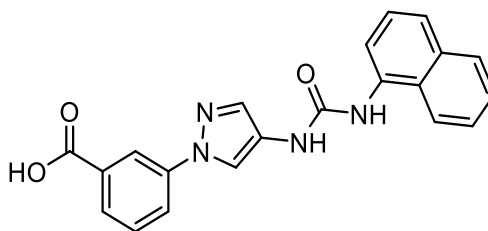
Exakte Masse: 386,14

Molekulargewicht: 386,41

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

5290 mg S-24 (24,35 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 400 mL trockenem DCM gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 3,5 mL 1-Naphthylisocyanat (24,35 mmol; 1 eq.) wird langsam zugegeben. Die Reaktion wird bei RT für 20 h rühren gelassen. Folgend wird MeOH zugesetzt und DCM wird abgenommen. Das präzipitierende Produkt wird abgesaugt und mit *i*-PrOH, Et₂O und Pentan gewaschen. Man erhält das Produkt als pinken FS (Ausbeute: 8171 mg (87 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.98 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.39 – 8.31 (m, 1H), 8.16 – 8.06 (m, J = 12.9, 4.9 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.69 – 7.51 (m, 4H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 152.8, 140.0, 134.4, 133.8, 133.5, 131.0, 130.2, 128.4, 126.1, 126.1, 125.9, 125.9, 125.7, 124.9, 123.1, 122.1, 121.4, 118.0, 117.5, 116.4, 52.4; DC-MS (ESI) *m/z*: 409.2 [M+Na]⁺; 385.1 [M-H]⁻; 421.0 [M+Cl]⁻.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**P-35**)Summenformel: C₂₁H₁₆N₄O₃

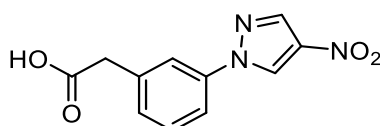
Exakte Masse: 372,12

Molekulargewicht: 372,38

Die Synthese wird nach ASV-5a durchgeführt.

3000 mg S-25 (7,76 mmol; 1 eq.) sowie 3267 mg KOH (58,23 mmol; 7,5 eq.) werden vorgelegt und in 262,5 mL MeOH:H₂O (20:1) suspendiert. Die Reaktion wird für 20 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Reaktion wird die Suspension abfiltriert und mit Et₂O gewaschen. Das Produkt wird getrocknet und folgend in einem Becherglas mit 400 mL demin H₂O versetzt. Es wird 40 mL 10% HCl (aq.)-Lösung zugegeben. Die Suspension wird 10 min stark gerührt und abfiltriert. Das Produkt wird bis zu Massenkonstanz im Umluftofen getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 2500 mg (86 %); Reinheit: 99,2 % (254,4 nm); 98,7 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.23 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.37 – 8.29 (m, 1H), 8.13 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 2H), 7.95 – 7.89 (m, 2H), 7.84 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.66 – 7.52 (m, 4H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8, 152.9, 139.9, 134.4, 133.8, 133.4, 132.2, 130.0, 128.4, 126.4, 126.1, 125.9, 125.9, 125.7, 124.9, 123.0, 121.8, 121.4, 118.3, 117.5, 116.4; DC-MS (ESI) *m/z*: 371.1 [M-H]⁻.

2-(3-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (**S-26**)Summenformel: C₁₁H₉N₃O₄

Exakte Masse: 247,06

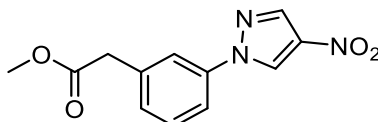
Molekulargewicht: 247,21

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

2000 mg 4-Nitropyrazol (17,69 mmol; 1 eq.) sowie 3804 mg 3-Brom-phenylessigsäure (17,69 mmol; 1 eq.) und 7333 mg K₂CO₃ (53,06 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon

Experimenteller Teil

Gegenstrom wird 337 mg Cu(I)I (1,77 mmol; 0,1 eq.) sowie 0,558 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (3,54 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 95 °C erhitzt und für 22 h gerührt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Wasser und Et₂O gewaschen. Der FS wird im Umluftofen getrocknet, wodurch man das *crude* Produkt als grau-grünes Pulver erhält. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

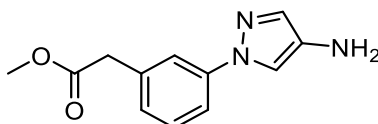
Methyl-2-(3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (**S-27**)

Summenformel: C₁₂H₁₁N₃O₄
 Exakte Masse: 261,07
 Molekulargewicht: 261,24

Die Synthese wird nach ASV-4 durchgeführt.

4372 mg S-26 (17,687 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 50 mL MeOH suspendiert. Es werden 2 mL H₂SO₄ zugesetzt. Der Ansatz wird auf 65 °C für 20 h erhitzt. Nachdem der Ansatz abgekühlt ist, wird das präzipitierte Produkt abfiltriert und mit wenig kaltem MeOH gewaschen. Man erhält das Produkt als braun-weißen FS (Ausbeute: 1665 mg (36 %, über 2 Schritte); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.63 – 9.59 (m, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.93 – 7.88 (m, 1H), 7.88 – 7.83 (m, 1H), 7.52 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.64 (s, 3H);
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.2, 138.3, 136.9, 136.8, 136.3, 129.7, 129.4, 128.1, 120.6, 117.9, 51.8, 39.7; DC-MS (ESI) *m/z*: 284.0 [M+Na]⁺; 260.6 [M-H]⁻.

Methyl-2-(3-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (**S-28**)

Summenformel: C₁₂H₁₃N₃O₂
 Exakte Masse: 231,10
 Molekulargewicht: 231,26

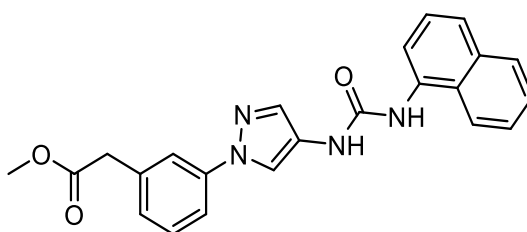
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

500 mg S-27 (1,914 mmol; 1 eq.) sowie 534 mg Fe(0)-Pulver (9,570 mmol; 5 eq.) und 512 mg NH₄Cl (9,570 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 30 ml EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 1,5 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird

abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 3x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als viskoses rote Öl (Ausbeute: 415 mg (94 %); Reinheit: 98,2 % (254,4 nm); 95,3 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.67 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.62 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.55 (ddd, J = 8.2, 2.2, 0.8 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.19 (br s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.63 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.4, 140.1, 135.7, 133.5, 132.7, 129.3, 125.7, 118.1, 115.4, 112.1, 51.7, 40.0; DC-MS (ESI) *m/z*: 254.0 [M+Na]⁺.

Methyl-2-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetat (**S-29**)



Summenformel: C₂₃H₂₀N₄O₃

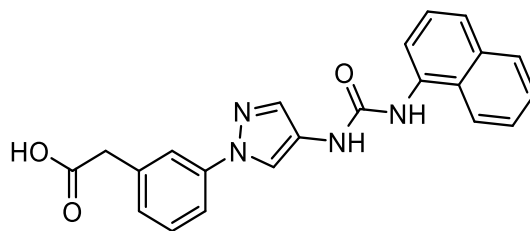
Exakte Masse: 400,15

Molekulargewicht: 400,44

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

100 mg S-28 (0,432 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM gelöst. 62 µL 1-Naphthylisocyanat (0,432 mmol; 1 eq.) werden zugegeben. Die Reaktion wird für 20 h bei RT rühren gelassen, wobei das Produkt ausfällt. Der Feststoff wird abfiltriert und mit einer kleinen Menge DCM sowie Pentan gewaschen. Man erhält das Produkt als weiß-pinken FS (Ausbeute: 144 mg (83 %); Reinheit: 98,2 % (254,4 nm); 97,4 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.94 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.47 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 7.96 – 7.91 (m, 1H), 7.85 – 7.81 (m, 1H), 7.75 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.70 (ddd, J = 8.1, 2.2, 0.8 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.57 (dddd, J = 19.8, 7.9, 6.8, 1.2 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.79 (s, 2H), 3.64 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.4, 152.8, 139.8, 135.9, 134.4, 133.7, 132.8, 129.4, 128.4, 126.7, 126.0, 125.9, 125.8, 125.7, 124.5, 122.9, 121.4, 118.8, 117.3, 116.2, 116.2, 51.7, 39.9.

2-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)essigsäure (**S-30**)Summenformel: C₂₂H₁₈N₄O₃

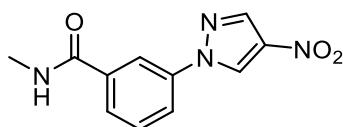
Exakte Masse: 386,14

Molekulargewicht: 386,41

Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

125 mg S-29 (0,312 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL MeOH:H₂O (1:1) suspendiert. Folgend wird 1,561 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (1,561 mmol; 5 eq.) zugegeben. Die Reaktion wurde für 24 h bei RT rühren gelassen. Die Lösung wird mit (10 %) HCl (aq.)-Lösung angesäuert, wobei das Produkt ausfällt. Der FS wird abgefiltert, wodurch man das Produkt als weißen FS erhält (Ausbeute: 111 mg (92 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 98,5 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.07 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 7.6, 0.9 Hz, 1H), 7.95 – 7.91 (m, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.74 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.70 – 7.66 (m, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.61 – 7.52 (m, 2H), 7.47 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.67 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.5, 152.9, 139.7, 136.6, 134.5, 133.7, 132.8, 129.4, 128.4, 126.8, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.6, 122.9, 121.5, 118.9, 117.3, 116.2, 116.0, 40.5.

N-Methyl-3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**S-31**)Summenformel: C₁₁H₁₀N₄O₃

Exakte Masse: 246,08

Molekulargewicht: 246,23

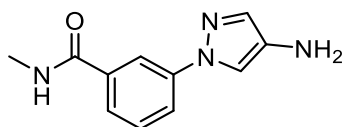
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

520 mg S-1 (2,230 mmol; 1 eq.) sowie 855 mg EDC·HCl (4,460 mmol; 2 eq.) und 794 mg HOBt Monohydrat (4,460 mmol; 2 eq.) (enthält 14 wt.% Wasser) werden vorgelegt und in 50 mL trockenem DCM suspendiert, während der Ansatz via Eis-Wasserbad gekühlt wird. Folgend werden 1,138 mL DIPEA (6,690 mmol; 3 eq.) zugegeben. Nach 5 min. wird 1,115 mL 2 M Methylamin (THF)-Lösung (2,230 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Kühlung wird

entfernt und die Reaktion wird für 24 h bei RT gerührt. Folgend wird die Lösung mit demin. Wasser und 2 M NaOH (aq.)-Lösung versetzt. Der Ansatz wird 2x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 1x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen, werden über Na₂SO₄, filtriert und eingeeengt. Man erhält das Produkt als gelb-orangen FS (Ausbeute: 502 mg (91 %); Reinheit: 91,2 % (254,4 nm); 92,5 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.65 (s, 1H), 8.64 – 8.55 (m, 2H), 8.38 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.09 (ddd, J = 8.1, 2.2, 0.8 Hz, 1H), 7.91 – 7.88 (m, 1H), 7.66 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 2.83 (d, J = 4.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.4, 138.3, 137.1, 136.9, 136.0, 129.9, 128.3, 126.8, 121.8, 118.2, 26.3; DC-MS (ESI) *m/z*: 269.2 [M+Na]⁺; 301.4 [M+Na+MeOH]⁺; 245.2 [M-H]⁻.

3-(4-Amino-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-methylbenzamid (**S-32**)



Summenformel: C₁₁H₁₂N₄O

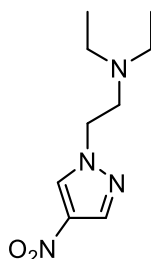
Exakte Masse: 216,10

Molekulargewicht: 216,24

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

420 mg S-31 (1,914 mmol; 1 eq.) sowie 534 mg Fe(0)-Pulver (9,570 mmol; 5 eq.) und 512 mg NH₄Cl (9,570 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 30 ml EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 1,5 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 3x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Man erhält das Produkt als viskoses rote Öl. Der Ansatz wird ohne weiter Aufreinigung weiter verwendet.

DC-MS (ESI) *m/z*: 239.0 [M+Na]⁺; 271.0 [M+Na+MeOH]⁺.

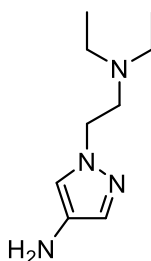
N,N-Diethyl-2-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)ethan-1-amin (**S-33**)Summenformel: C₉H₁₆N₄O₂

Exakte Masse: 212,13

Molekulargewicht: 212,25

500 mg 4-Nitropyrazol (4,4216 mmol; 1 eq.) sowie 1731 mg 2-Brom-*N,N*-diethylethan-1-amin·HBr (6,6325 mmol; 1,5 eq.) und 1833 mg K₂CO₃ (13,2649 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL trockenem ACN suspendiert. Der Ansatz wird über Nacht zum Rückfluss erhitzt für 18 h. Der Ansatz wird dekantiert und übrig gebliebener FS wird 3x mit ACN versetzt und wieder dekantiert. Das ACN wird abgenommen. Übriger FS wird in EtOAc wieder aufgenommen und 3x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird mit NaOH alkalisiert und mit EtOAc wieder extrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Man erhält das Produkt als gelb orangene Flüssigkeit (Ausbeute: 850 mg (91 %); Reinheit: 98,9 % (254,4 nm); 97,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.82 (s, 1H), 8.23 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 4.20 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.77 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.45 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 0.85 (t, J = 7.1 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 135.4, 134.5, 130.9, 51.5, 51.1, 46.5, 11.8; DC-MS (ESI) *m/z*: 213.1 [M+H]⁺.

1-(2-(Diethylamino)ethyl)-1*H*-pyrazol-4-amin (**S-34**)Summenformel: C₉H₁₈N₄

Exakte Masse: 182,15

Molekulargewicht: 182,27

Die Synthese wird nach ASV-3b durchgeführt.

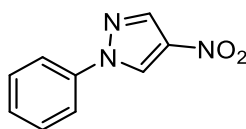
824 mg S-33 (3,8822 mmol; 1 eq.) wird innerhalb eines miniclave[®] Glasreaktors (Büchi) vorgelegt. Der Reaktor wurde 3x alternierend evakuiert und mit Argon begast. Im Argon-

Gegenstrom wird 413 mg (5 %) Pd/C (0,1941 mmol (Pd); 0,05 eq.) zugegeben. Der Reaktor wird mit 7 bar H₂ beladen und via Wasserbad auf 40 °C über Nacht erwärmt. Der Ansatz wird über Celite filtriert und zur Trockene eingeeengt. Man erhält das Produkt als rot-violette Flüssigkeit (Ausbeute: quant.; Reinheit: 89,4 % (254,4 nm); 94,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.03 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 3.95 – 3.90 (m, 2H), 3.43 (br s, 2H) (Signal liegt unter Wasserpeak), 2.68 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.45 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 0.91 (t, J = 7.1 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 130.5, 129.1, 116.9, 52.6, 49.8, 46.6, 11.9.

7.4.5 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.1

4-Nitro-1-phenyl-1*H*-pyrazol (**S-35**)



Summenformel: C₉H₇N₃O₂

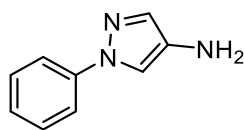
Exakte Masse: 189,05

Molekulargewicht: 189,17

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

4000 mg 4-Nitropyrazol (35,4 mmol; 1 eq.) sowie 6665 mg Bombenzol (42,4; 1,2 eq.) und 14666 mg K₂CO₃ (106,1 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 674 mg Cu(I)I (3,54 mmol; 0,1 eq.) sowie 1,12 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (7,07 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 95 °C erhitzt und für 20 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H₂O versetzt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Produkt wird im Umluftofen getrocknet, wodurch man ein grün-gelbes Pulver erhält (Ausbeute: 6671 mg (100 %); Reinheit: 96,1 % (254,4 nm); 97,3 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.64 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.95 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.57 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.45 (t, J = 7.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 138.4, 136.9, 136.8, 129.7, 128.3, 128.1, 119.4.

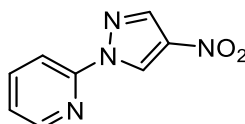
1-Phenyl-1*H*-pyrazol-4-amin (**S-36**)

Summenformel: C₉H₉N₃
 Exakte Masse: 159,08
 Molekulargewicht: 159,19

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

500 mg S-35 (2,64 mmol; 1 eq.) sowie 738 mg Fe(0)-Pulver (13,22 mmol; 5 eq.) und 707 mg NH₄Cl (13,22 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 30 mL EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Die Reaktion wird für 2 h auf 60°C erwärmt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert. Die alkoholische Lösemittelkomponente wird abgenommen und der verbleibende wässrige Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 3x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Lösung wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als dunkel-roter FS (Ausbeute: quantitativ; Reinheit: 96,1 % (254,4 nm); 93,2 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.70 – 7.65 (m, 3H), 7.44 – 7.39 (m, 2H), 7.27 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.20 – 7.15 (m, 1H), 4.17 (br s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 140.1, 133.5, 132.7, 129.3, 124.7, 117.0, 112.1.

2-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin (**S-37**)

Summenformel: C₈H₆N₄O₂
 Exakte Masse: 190,05
 Molekulargewicht: 190,16

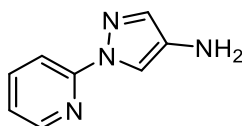
Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

2000 mg 4-Nitropyrazol (17,69 mmol; 1 eq.) sowie 2794 mg 2-Brompyridin (17,69; 1 eq.) und 7333 mg K₂CO₃ (53,06 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL DMF suspendier. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 337 mg Cu(I)I (1,77 mmol; 0,1 eq.) sowie 0,558 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (3,54 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 95 °C erhitzt und für 18 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H₂O versetzt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Wasser und Et₂O gewaschen. Das Produkt wird im Umluftofen

getrocknet, wodurch man ein grau-braunes FS erhält (Ausbeute: 2899 mg (86 %); Reinheit: 99,6 % (254,4 nm); 99,8 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.43 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.57 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.10 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.57 – 7.48 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 149.4, 148.8, 140.2, 137.7, 136.9, 126.6, 124.1, 113.0.

1-(Pyridin-2-yl)-1*H*-pyrazol-4-amin (**S-38**)



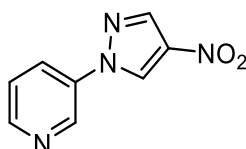
Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4$
Exakte Masse: 160,07
Molekulargewicht: 160,18

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

500 mg S-37 (2,63 mmol; 1 eq.) sowie 734 mg Fe(0)-Pulver (13,15 mmol; 5 eq.) und 703 mg NH_4Cl (13,15 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 30 ml EtOH:H $_2$ O (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 2 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 2x 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Man erhält das Produkt als dunkel roten FS (Ausbeute: 393 mg (93 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 98,7 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.37 (ddd, J = 4.9, 1.8, 0.9 Hz, 1H), 7.90 – 7.83 (m, 2H), 7.81 – 7.76 (m, 1H), 7.35 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.19 (ddd, J = 7.2, 4.9, 1.1 Hz, 1H), 4.30 (br s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 151.2, 148.0, 138.8, 134.4, 133.6, 120.3, 110.9, 110.7.

3-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin (**S-39**)



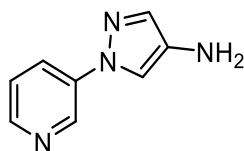
Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_2$
Exakte Masse: 190,05
Molekulargewicht: 190,16

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

Experimenteller Teil

2000 mg 4-Nitropyrazol (17,69 mmol; 1 eq.) sowie 2794 mg 3-Brompyridin (17,69; 1 eq.) und 7333 mg K_2CO_3 (53,06 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 337 mg Cu(I)I (1,77 mmol; 0,1 eq.) sowie 0,558 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (3,54 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 95 °C erhitzt und für 18 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H_2O versetzt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Wasser und Et_2O gewaschen. Das Produkt wird im Umluftofen getrocknet, wodurch man ein grau-braunes FS erhält (Ausbeute: 1640 mg (49 %); Reinheit: 97,0 % (254,4 nm); 98,9 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.74 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.35 (ddd, $J = 8.4, 2.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.63 (dd, $J = 8.2, 4.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 149.2, 140.9, 137.5, 137.1, 135.1, 128.8, 127.3, 124.4.

1-(Pyridin-3-yl)-1*H*-pyrazol-4-amin (**S-40**)

Summenformel: $C_8H_8N_4$

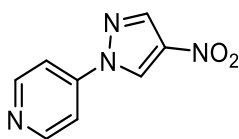
Exakte Masse: 160,07

Molekulargewicht: 160,18

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

500 mg S-39 (2,63 mmol; 1 eq.) sowie 734 mg Fe(0)-Pulver (13,15 mmol; 5 eq.) und 703 mg NH_4Cl (13,15 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 30 ml $EtOH:H_2O$ (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 2 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 2x 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert Die vereinten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als schwarz-violetten FS (Ausbeute: 300 mg (71 %); Reinheit: 98,4 % (254,4 nm); 96,9 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.96 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.39 (dd, $J = 4.7, 1.3$ Hz, 1H), 8.06 (ddd, $J = 8.4, 2.6, 1.4$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.45 (dd, $J = 8.3, 4.7$ Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 4.26 (br s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 145.7, 138.6, 136.3, 134.0, 133.7, 124.1, 124.0, 112.0.

4-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)pyridin (**S-41**)Summenformel: C₈H₆N₄O₂

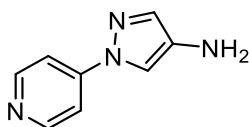
Exakte Masse: 190,05

Molekulargewicht: 190,16

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

2000 mg 4-Nitropyrazol (17,69 mmol; 1 eq.) sowie 2923 mg 4-Brompyridin·HCl (15,02; 0,85 eq.) und 9777 mg K₂CO₃ (70,75 mmol; 4 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 337 mg Cu(I)I (1,77 mmol; 0,1 eq.) sowie 0,558 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (3,54 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 95 °C erhitzt und für 18 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H₂O versetzt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Produkt wird im Umluftofen getrocknet, wodurch man ein grün-braunes FS erhält (Ausbeute: 1940 mg (68 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 98,9 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.86 (s, 1H), 8.78 (s, 2H), 8.63 (s, 1H), 8.01 (d, J = 5.4 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.4, 144.5, 137.9, 137.5, 128.9, 113.2.

1-(Pyridin-4-yl)-1*H*-pyrazol-4-amin (**S-42**)Summenformel: C₈H₈N₄

Exakte Masse: 160,07

Molekulargewicht: 160,18

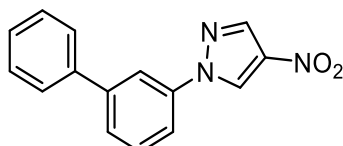
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

500 mg S-41 (2,63 mmol; 1 eq.) sowie 734 mg Fe(0)-Pulver (13,15 mmol; 5 eq.) und 703 mg NH₄Cl (13,15 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 30 ml EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 2 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 3x 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über

Experimenteller Teil

Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als pink-roten FS (Ausbeute: 243 mg (58 %); Reinheit: 98,4 % (254,4 nm); 96,9 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.52 (dd, J = 4.8, 1.5 Hz, 2H), 7.81 – 7.78 (m, 1H), 7.65 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 4.37 (br s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150.8, 145.6, 135.1, 134.6, 111.2, 110.9.

1-([1,1'-Biphenyl]-3-yl)-4-nitro-1*H*-pyrazol (**S-43**)

Summenformel: C₁₅H₁₁N₃O₂

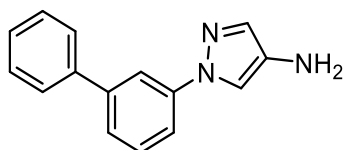
Exakte Masse: 265,09

Molekulargewicht: 265,27

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

1250 mg 4-Nitropyrazol (11,1 mmol; 1 eq.) sowie 2577 mg 3-Bromo-1,1'-biphenyl (11,1 mmol; 1 eq.) und 4583 mg K₂CO₃ (33,16 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 211 mg Cu(I)I (1,1054 mmol; 0,1 eq.) sowie 0,349 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (2,2108 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 95 °C erhitzt und für 24 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H₂O versetzt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das Produkt wird in EtOH/Hexan umkristallisiert. Man erhält das Produkt als gold-braunen FS (Ausbeute: 1915 mg (65 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 99,1 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.82 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.24 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 7.97 – 7.89 (m, 1H), 7.84 – 7.78 (m, 2H), 7.77 – 7.73 (m, 1H), 7.64 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 2H), 7.45 – 7.40 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 141.7, 139.0, 138.8, 137.0, 136.9, 130.3, 129.0, 128.4, 128.2, 127.0, 126.4, 118.5, 117.5.

1-([1,1'-Biphenyl]-3-yl)-1*H*-pyrazol-4-amin (**S-44**)

Summenformel: C₁₅H₁₃N₃

Exakte Masse: 235,11

Molekulargewicht: 235,29

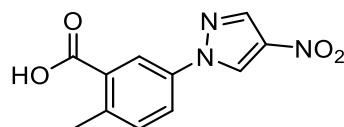
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

500 mg S-43 (1,8849 mmol; 1 eq.) sowie 526 mg Fe(0)-Pulver (9,4244 mmol; 5 eq.) und 504 mg NH₄Cl (9,4244 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 30 mL EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Die Reaktion wird für 2 h auf 60 °C erwärmt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert. Die alkoholische Lösemittelkomponente wird abgenommen und der verbleibende wässrige Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 3x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Lösung wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Man erhält das Produkt als orange-rote Flüssigkeit (Ausbeute: quantitativ; Reinheit: 98,3 % (254,4 nm); 96,3 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.94 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.76 – 7.71 (m, 2H), 7.70 – 7.67 (m, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 4H), 7.42 – 7.37 (m, 1H), 7.31 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 4.21 (br s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 141.4, 140.7, 139.6, 133.5, 132.8, 129.9, 128.9, 127.8, 126.8, 123.1, 116.1, 115.1, 112.4.

7.4.6 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.2

2-Methyl-5-(4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-45**)



Summenformel: C₁₁H₉N₃O₄

Exakte Masse: 247,06

Molekulargewicht: 247,21

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

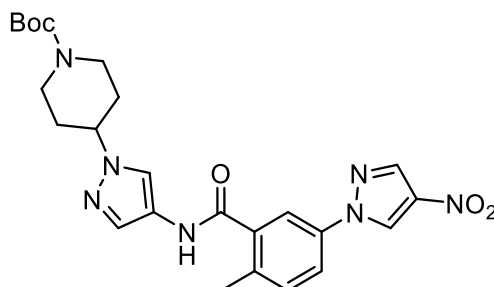
700 mg 4-Nitropyrazole (6,19 mmol; 1 eq.), 1704 mg 5-Brom-2-methylbenzoesäure (7,92 mmol; 1,28 eq.) und 6051 mg Cs₂CO₃ (18,57 mmol; 3 eq.) werden in 40 mL trockenem DMF suspendiert. Es wird eine Argon-Atmosphäre aufgebaut und im Argon-Gegenstrom wird 354 mg Cu(I)I (mmol; 0,3 eq.) sowie 0,293 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (1,86 mmol; 0,3 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen und für 18 h bei 100 °C gerührt. Der Ansatz wird mit demin. H₂O und 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Die Lösung wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organische Phasen werden 2x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der erhaltene FS wird in MeOH umkristallisiert und abgesaugt. In der Mutterlauge fällt nach leichtem Einengen eine weitere Produktfraktion aus. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 1062 mg (69 %); Reinheit: 97,1 % (254,4 nm); 97,4 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.22 (br s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.34 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.02 (dd, J = 8.3, 2.5 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 2.56 (s, 3H); ¹³C NMR (101

Experimenteller Teil

MHz, DMSO- d_6) δ 167.7, 139.1, 137.0, 136.9, 136.3, 132.9, 131.7, 128.2, 122.2, 121.0, 20.7; DC-MS (ESI) m/z : 246.0 [M-H]⁻.

tert-Butyl-4-(4-(2-methyl-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-46**)



Summenformel: C₂₄H₂₉N₇O₅

Exakte Masse: 495,22

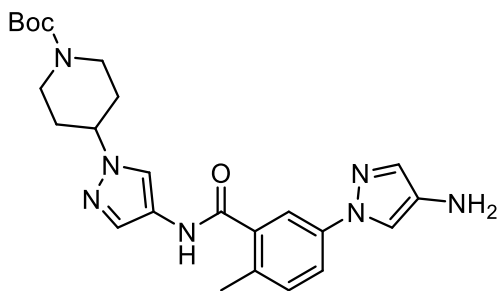
Molekulargewicht: 495,54

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

300 mg S-45 (1,2135 mmol; 1 eq.) sowie 465 mg EDC·HCl (2,4271 mmol; 2 eq.) und 432 mg HOBt Monohydrat (2,4271 mmol; 2 eq.) (enthält 14 wt.% Wasser) werden vorgelegt. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt. Die Edukte werden in trockenem DCM suspendiert und 0,634 mL DIPEA (3,6406 mmol; 3 eq.) wird zugesetzt. Die Reaktion wird 5 min. rühren gelassen. Folgend wird 323 mg S-4 (1,2135 mmol; 1 eq.) zugesetzt und die Kühlung entfernt. Die Reaktion wird 22 h bei RT rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O und 2 M NaOH (aq.)-Lösung versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90). Man erhält das Produkt als pink-weißen FS (Ausbeute: 58 mg (10 %); Reinheit: 99,0 % (254,4 nm); 97,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.49 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.12 – 8.01 (m, J = 5.0 Hz, 2H), 7.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.49 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.36 (t, J = 11.2 Hz, 1H), 4.04 (d, J = 11.1 Hz, 2H), 2.89 (br s, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.04 – 1.94 (m, J = 11.0 Hz, 2H), 1.84 – 1.71 (m, J = 20.1, 11.6 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.7, 153.9, 137.4, 137.0, 136.9, 136.0, 136.0, 132.0, 130.0, 128.1, 121.2, 120.3, 119.0, 118.3, 78.8, 58.1, 42.5, 31.9, 28.1, 19.0; DC-MS (ESI) m/z : 518.5 [M+Na]⁺; 494.4 [M-H]⁻; 530.5 [M+Cl]⁻.

tert-Butyl-4-(4-(5-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)-2-methylbenzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-47**)



Summenformel: C₂₄H₃₁N₇O₃

Exakte Masse: 465,25

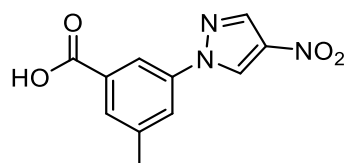
Molekulargewicht: 465,56

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

140 mg S-46 (0,283 mmol; 1 eq.), 151 mg Fe(0)-Pulver (2,825 mmol; 10 eq.) sowie 158 mg NH₄Cl (2,825 mmol; 10 eq.) werden vorgelegt und in 20 mL einer EtOH:H₂O-Mischung (3:1) suspendiert. Der Ansatz wird auf 60 °C erhitzt und für 90 min. gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Suspension über Celite filtriert. Die alkoholische Komponente wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der wässrige Rest wird mit EtOAc wieder aufgenommen und 2x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und zur Trockene eingengt. Der *crude* FS wird über Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90). Man erhält das Produkt als roten FS (Ausbeute: 114 mg (87 %); Reinheit: 96,0 % (254,4 nm); 93,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.43 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.73 (s, 2H), 7.67 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 4.35 (tt, J = 11.4, 3.9 Hz, 1H), 4.20 (br s, 2H), 4.04 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 2.89 (br s, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.01 – 1.95 (m, 2H), 1.82 – 1.72 (m, 2H), 1.42 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.4, 153.9, 137.8, 137.1, 133.6, 132.6, 131.9, 131.6, 129.9, 121.3, 118.9, 117.9, 115.9, 112.2, 78.8, 58.0, 42.4, 31.9, 28.1, 18.8.

3-Methyl-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-48**)



Summenformel: C₁₁H₉N₃O₄

Exakte Masse: 247,06

Molekulargewicht: 247,21

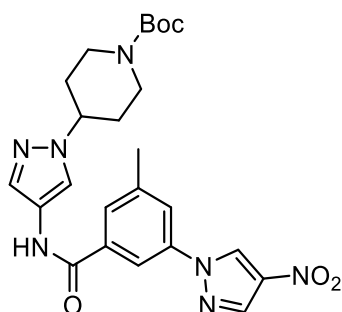
Experimenteller Teil

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

250 mg 4-Nitropyrazol (2,21 mmol; 1 eq.), 571 mg 5-Brom-3-methylbenzoesäure (2,65 mmol; 1,2 eq.) und 2161 mg Cs_2CO_3 (6,63 mmol; 3 eq.) werden in 15 mL trockenem DMF suspendiert. Es wird eine Argon-Atmosphäre aufgebaut und im Argon-Gegenstrom wird 126 mg Cu(I)I (0,66 mmol; 0,3 eq.) sowie 0,105 mL *trans-N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (0,66 mmol; 0,3 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen und für 16 h bei 100 °C gerührt. Der Ansatz wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Die Lösung wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Der so erhaltene FS wird mit Et_2O gewaschen, wodurch man die erste reine Produktfraktion erhält. Das Filtrat wird eingengt, in MeOH wieder suspendiert und erneut gefiltert um die zweite Produktfraktion zu erhalten. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 330 mg (60 %) Reinheit: 98,9 % (254,4 nm); 96,8 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.27 (br s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 2.44 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.4, 140.1, 138.4, 137.0, 136.9, 132.2, 129.4, 128.3, 123.9, 117.4, 20.7; DC-MS (ESI) m/z : 245.9 [M-H] $^-$.

tert-Butyl-4-(4-(3-methyl-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-49**)



Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_5$

Exakte Masse: 495,22

Molekulargewicht: 495,54

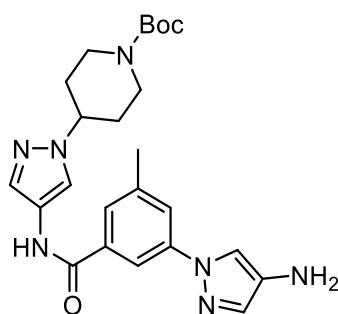
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

300 mg S-48 (1,214 mmol; 1 eq.) sowie 465 mg EDC·HCl (2,427 mmol; 2 eq.) und 464 mg HOBT Monohydrat (2,427 mmol; 2 eq.) (enthält 20 wt. % Wasser) werden vorgelegt und unter Eis-Wasserbadkühlung in 15 mL trockenem DCM suspendiert. 0,634 mL DIPEA (3,641 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird 5 min. rühren gelassen. Folgend wird 323 mg S-4 (1,214 mmol; 1 eq.) zugegeben und die Kühlung wird entfernt. Nach 22 h Rühren bei RT wird der Ansatz mit demin. Wasser und 2 M NaOH (aq.)-Lösung versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet,

gefiltriert und zur Trockene eingengt. Das *crude* Produkt wurde dann via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90). Man erhält das Produkt als bernsteinfarbener FS (Ausbeute: 413 mg (69 %); Reinheit: 97,3 % (254,4 nm); 94,8 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.55 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 4.41 – 4.32 (m, $J = 7.3, 3.9$ Hz, 1H), 4.04 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 2.89 (br s, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.99 (dd, $J = 12.3, 2.3$ Hz, 2H), 1.78 (qd, $J = 12.4, 4.3$ Hz, 2H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.4, 153.9, 140.0, 138.4, 137.1, 136.9, 135.6, 130.3, 128.3, 127.7, 122.6, 121.3, 119.2, 115.8, 78.8, 58.1, 42.3 (Signal unterdrückt), 31.9, 28.1, 21.0; DC-MS (ESI) m/z : 518.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 494.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 530.1 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

tert-Butyl-4-(4-(3-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)-5-methylbenzamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**S-50**)



Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_3$

Exakte Masse: 465,25

Molekulargewicht: 465,56

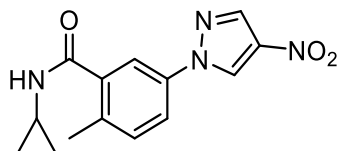
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

380 mg S-49 (0,767 mmol; 1 eq.), 429 mg Fe(0)-Pulver (7,673 mmol; 10 eq.) sowie 410 mg NH_4Cl (7,673 mmol; 10 eq.) werden vorgelegt und in 45 mL einer EtOH:H₂O-Mischung (2:1) suspendiert. Der Ansatz wird auf 65 °C erhitzt und für 45 min. gerührt. Nach dem der Ansatz wieder auf RT abgekühlt ist, wird die Suspension über Celite filtriert. Die alkoholische Komponente wird am Rotationsverdampfer entfernt und der wässrige Rest wird mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung wieder aufgenommen. Die Mischung wird 2x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als roter FS (Ausbeute: quantitativ; Reinheit: 94,3 % (254,4 nm); 93,3 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.48 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.74 (s, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 4.47 – 4.11 (m, 3H) (Signal überlagert), 4.04 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 2.90 (br s, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.99 (d, $J = 10.6$ Hz,

Experimenteller Teil

2H), 1.83 – 1.73 (m, 2H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 163.1, 153.9, 140.1, 139.2, 135.3, 133.8, 133.0, 130.2, 124.3, 121.4, 120.2, 119.2, 113.2, 112.2, 78.8, 58.0, 42.4 (Signal unterdrückt), 31.9, 28.1, 21.1; DC-MS (ESI) m/z : . 488.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 464.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 500.3 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

N-cyclopropyl-2-methyl-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**S-51**)

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$

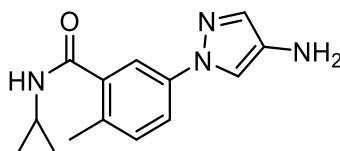
Exakte Masse: 286,11

Molekulargewicht: 286,29

Die Synthes wird nach ASV-2d durchgeführt.

190 mg S-45 (0,769 mmol; 1 eq.) sowie 584 mg HATU (1,537 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt. Die Ausgangstoffe werden in 16 mL trockenem DMF gelöst. Folgend wird 0,392 mL DIPEA zum Ansatz gegeben (2,306 mmol; 3 eq.). Die Reaktion wird für 1 h bei RT rühren gelassen. Nachdem eine Reaktionskontrolle komplette Aktivierung der Carbonsäure aufzeigte wird 107 μL Cycloproylamin (1,537 mmol; 2 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird für 23 h bei RT rühren gelassen. Es wird demin. H_2O zum Ansatz gegeben wodurch das Produkt präzipitiert. Der FS wird abgesaugt. Man erhält das Produkt als gelblichen FS (Ausbeute: 175 mg (80 %); Reinheit: 99,4 % (254,4 nm); 99,3 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.65 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.91 – 7.86 (m, 2H), 7.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 2.88 – 2.81 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 0.74 – 0.67 (m, 2H), 0.59 – 0.52 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 168.9, 138.0, 136.9, 136.8, 135.9, 135.6, 131.7, 128.0, 119.9, 118.1, 22.7, 18.9, 5.8; DC-MS (ESI) m/z : 285.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

5-(4-Amino-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-cyclopropyl-2-methylbenzamid (**S-52**)

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$

Exakte Masse: 256,13

Molekulargewicht: 256,31

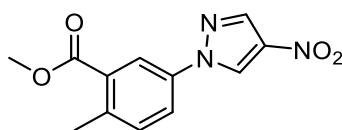
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

160 mg von S-51 (0,559 mmol; 1 eq.) sowie 156 mg Fe(0)-Pulver (2,794 mmol; 5 eq.) und 149 mg NH_4Cl (2,794 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt. Die Reagenzien werden in 25 mL

EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Die Reaktion wird für 5 h auf 60 °C erhitzt. Nach Abkühlen des Ansatzes auf RT wird die Suspension über Celite filtriert. Die alkoholische Komponente wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der wässrige Rest wird mit EtOAc wieder aufgenommen und 2x mit ges. NaHCO₃(aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und zur Trockene eingedunstet. Man erhält das *crude* Produkt als roten FS (Ausbeute: 140 mg; Reinheit: 91,5 % (254,4 nm); 87,8 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) *m/z*: 279.2 [M+Na]⁺; 311.3 [M+Na+MeOH]⁺.

Methyl-2-methyl-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-53**)



Summenformel: C₁₂H₁₁N₃O₄

Exakte Masse: 261,07

Molekulargewicht: 261,24

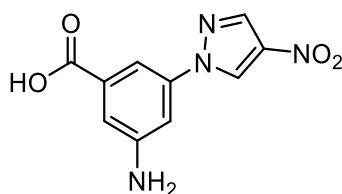
Die Synthese wird nach ASV-4 durchgeführt.

500 mg von S-45 (2,0226 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt. Der Ansatz wird mit 20 mL MeOH versetzt sowie 0,5 mL konz. H₂SO₄. Der Ansatz wird 3 h zu Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen des Ansatz wird präzipitiertes Produkt abgesaugt. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 422 mg (80 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 97,5 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.67 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.33 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.54 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.3, 139.1, 137.0, 136.8, 136.3, 132.9, 130.4, 128.2, 122.5, 120.7, 52.2, 20.5.

7.4.7 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.3

3-Amino-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-54**)



Summenformel: C₁₀H₈N₄O₄

Exakte Masse: 248,05

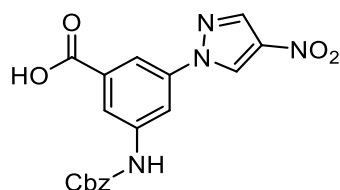
Molekulargewicht: 248,20

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

Experimenteller Teil

5000 mg 4-Nitropyrazol (44,22 mmol; 1 eq.) sowie 9552 mg 3-Amino-5-brombenzoesäure (44,22 mmol; 1 eq.) und 18332 mg K_2CO_3 (132,65 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 250 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 842 mg Cu(I)I (4,42 mmol; 0,1 eq.) sowie 1,395 mL *trans-N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (8,84 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 100 °C erhitzt und für 20 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H_2O versetzt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt. Das Produkt wird im Umluftofen getrocknet, wodurch man einen gelb-grünen FS erhält (Ausbeute: 6178 mg (56 %); Reinheit: 96,5 % (254,4 nm); 96,9 % (230,0 nm)).

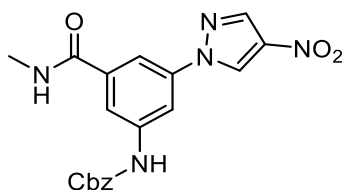
1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 13.01 (br s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 5.77 (br s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 167.0, 150.1, 139.4, 136.8, 136.7, 132.9, 128.2, 114.3, 108.2, 107.2; DC-MS (ESI) m/z : 246.8 [M-H] $^-$.

3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-55**)

Summenformel: $C_{18}H_{14}N_4O_6$
 Exakte Masse: 382,09
 Molekulargewicht: 382,33

4000 mg S-54 (16,116 mmol; 1 eq.) sowie 6770 mg $NaHCO_3$ (80,580 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 320 mL Dioxan: H_2O (1:1) suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 2,254 mL Chlorameisensäurebenzylester (16,116 mmol, 1 eq.) wird tropfenweise zugesetzt. Nach 10 min. wird die Kühlung entfernt und die Reaktion wird für 72 h gerührt. Die Reaktion wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung angesäuert. Präzipitierendes Produkt wird abfiltriert und im Umluftofen getrocknet. Man erhält das Produkt als gelblichen FS (Ausbeute: 4830 mg (78 %); Reinheit: 96,7 % (254,4 nm); 95,5 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 13.36 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.48 – 7.32 (m, 5H), 5.20 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 166.2, 153.4, 140.7, 139.0, 137.1, 137.0, 136.3, 133.0, 128.7, 128.5, 128.2, 128.2, 118.4, 114.0, 113.2, 66.2; DC-MS (ESI) m/z : 426.9 [M+2Na-H] $^+$, 381.1 [M-H] $^-$.

Benzyl-(3-(methylcarbamoyl)-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)carbammat (**S-56**)Summenformel: C₁₉H₁₇N₅O₅

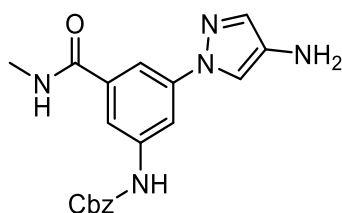
Exakte Masse: 395,12

Molekulargewicht: 395,38

Die Synthese wird nach ASV-2c durchgeführt.

3000 mg S-55 (7,847 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 125 mL trockenem THF gelöst. Folgend wird 1909 mg CDI (11,770 mmol; 1,5 eq.) gelöst in 2x 75 mL trockenem THF zugegeben. Die Reaktion wird 20 h bei RT rühren gelassen. Nachdem Monitoring via DC die quantitative Aktivierung der Säurekomponente bestätigt, wird 1,359 mL 40 % Methylamin (aq.)-Lösung (15,693 mmol; 2,5 eq.) zugegeben und die Reaktion wird weitere 6 h bei RT gerührt. Das präzipitierte Produkt wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält das Produkt als hell-beigen FS (Ausbeute: 2133 mg (69 %); Reinheit: 96,7 % (254,4 nm); 95,5 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.24 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.51 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.98 (d, J = 18.4 Hz, 2H), 7.46 – 7.33 (m, 5H), 5.20 (s, 2H), 2.82 (d, J = 4.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.4, 153.4, 140.6, 138.6, 137.1, 136.9, 136.6, 136.4, 128.5, 128.2, 128.1, 116.9, 111.5, 66.1, 26.3; DC-MS (ESI) *m/z*: 417.7 [M+Na]⁺, 393.9 [M-H]⁻.

Benzyl-(3-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)-5-(methylcarbamoyl)phenyl)carbammat (**S-57**)Summenformel: C₁₉H₁₉N₅O₃

Exakte Masse: 365,15

Molekulargewicht: 365,39

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

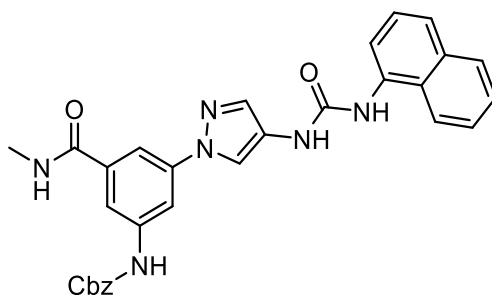
2000 mg S-56 (5,058 mmol; 1 eq.) sowie 1413 mg Fe(0)-Pulver (25,292 mmol; 5 eq.) und 1353 mg NH₄Cl (25,292 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 250 ml EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 1,5 h bei 60 °C erhitzt. Folgend wurden weitere 100 mL EtOH zugegeben und der Ansatz wird weitere 3,5 h bei 60°C gerührt. Nach dem Erkalten

Experimenteller Teil

der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 2x 1 M NaOH (aq.)-Lösung sowie 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM). Man erhält das Produkt als braun-roten FS (Ausbeute: 1752 mg (95 %); Reinheit: 92,0 % (254,4 nm); 89,2 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.02 (s, 1H), 8.48 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.03 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.68 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.46 – 7.34 (m, 5H), 7.29 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 2.79 (d, J = 4.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.1, 153.4, 140.4, 140.1, 136.5, 136.4, 133.8, 133.0, 128.4, 128.1, 128.1, 113.8, 112.0, 109.3, 109.3, 65.9, 26.3; DC-MS (ESI) *m/z*: 387.9 [M+Na]⁺, 364.4 [M-H]⁻.

Benzyl-(3-(methylcarbamoyl)-5-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)carbammat (**S-58**)



Summenformel: C₃₀H₂₆N₆O₄

Exakte Masse: 534,20

Molekulargewicht: 534,58

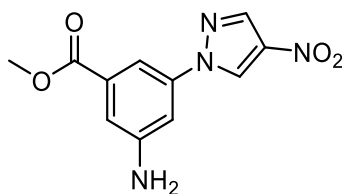
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

1600 mg S-57 (4,379 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt und in 150 mL trockenem THF gelöst. Folgend wird 0,629 mL 1-Naphthylisocyanat (4,379 mmol; 1 eq.) zugetropft. Die Reaktion wird 66 h bei RT gerührt, wobei FS präzipitiert. Der FS wird abfiltriert und mit Pentan gewaschen um das Produkt als weißen FS zu erhalten (Ausbeute: 1691 mg (72 %); Reinheit: 99,5 % (254,4 nm); 98,4 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.10 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.60 (dd, J = 8.7, 4.2 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.22 – 8.17 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.86 – 7.80 (m, J = 4.6, 2.8 Hz, 3H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 2H), 7.50 – 7.33 (m, 6H), 5.20 (s, 2H), 2.81 (d, J = 4.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 153.4, 152.7, 140.3, 140.1, 136.5, 136.4, 134.4, 133.7,

132.8, 128.5, 128.4, 128.1, 128.1, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.0, 121.4, 117.4, 116.3, 114.7, 109.9, 109.7, 65.9, 26.3; DC-MS (ESI) m/z : 557.0 $[M+Na]^+$, 533.2 $[M-H]^-$.

Methyl-3-amino-5-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-59**)



Summenformel: $C_{11}H_{10}N_4O_4$

Exakte Masse: 262,07

Molekulargewicht: 262,22

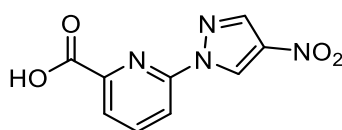
Die Synthese wird nach ASV-4 durchgeführt.

Vorgelegt wird *crudes* S-54, welches in 40 mL MeOH gelöst wird. Folgend wird 0,5 mL konz. H_2SO_4 zugesetzt. Der Ansatz wird 48 h zum Rückfluss erhitzt. Das präzipitierte Produkt wird abgesaugt und mit Wasser, basisch gewaschen sowie mit Pentan. Man erhält das Produkt als gelben FS (Ausbeute: 1283 mg (55 % über 2 Schritte); Reinheit: 99,2 % (254,4 nm); 99,3 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.58 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 5.85 (s, 2H), 3.85 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 165.9, 150.3, 139.4, 136.8, 136.7, 131.6, 128.2, 113.9, 108.5, 106.8, 52.3.

7.4.8 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.4

6-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)picolinsäure (**S-60**)



Summenformel: $C_9H_6N_4O_4$

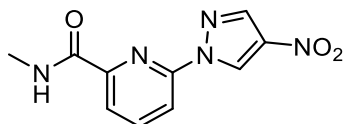
Exakte Masse: 234,04

Molekulargewicht: 234,17

500 mg 4-Nitropyrazol (4,422 mmol; 1 eq.) sowie 624 mg 6-Fluorpicolinsäure (4,422 mmol; 1 eq.) werden in 25 ml Dioxan suspendiert. Folgend wird 1,436 mL Methansulfonsäure (22,108 mmol; 5 eq.) langsam zur Lösung gegeben. Die Reaktion wird 20 h zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird auf Eis gegossen. Der präzipitierte FS wird abgesaugt und getrocknet, wodurch man das Produkt als beige-weißen FS erhält (Ausbeute: 680 mg (66 %); Reinheit: 96,9 % (254,4 nm); 97,0 % (230,0 nm)).

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.31 (br s, 1H), 9.82 (s, 1H), 8.64 – 8.60 (m, $J = 0.5$ Hz, 1H), 8.30 – 8.25 (m, 1H), 8.21 (dd, $J = 8.2, 0.9$ Hz, 1H), 8.13 (dd, $J = 7.4, 0.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.6, 148.9, 146.7, 141.9, 137.9, 137.2, 127.6, 124.2, 116.3.

N-Methyl-6-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)picolinamid (**S-61**)

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_3$

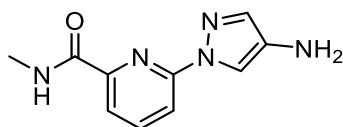
Exakte Masse: 247,07

Molekulargewicht: 247,21

Die Synthese wird nach ASV-2c durchgeführt.

500 mg S-60 (2,135 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt und in 12,5 mL trockenem THF gelöst. Folgend werden 433 mg CDI (2,669 mmol; 1,25 eq.) gelöst in 12,5 mL trockenem THF zugegeben. Der Ansatz wird 1,5 h bei 50°C rühren gelassen. Nachdem Monitoring via DC die quantitative Aktivierung der Säurekomponente bestätigt, wird 555 μL 40 % Methylamin (aq.)-Lösung (6,406 mmol; 3 eq.) zugegeben und die Reaktion wird weitere 22 h bei RT gerührt. Das präzipitierte Produkt wird abfiltriert und mit Et_2O nachgewaschen. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 283 mg (54 %); Reinheit: 99,5 % (254,4 nm); 99,3 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.25 (s, 1H), 9.23 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.24 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 2.90 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.9, 148.9, 148.3, 141.7, 137.9, 137.3, 128.1, 121.3, 114.8, 25.9.

6-(4-Amino-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-methylpicolinamid (**S-62**)

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$

Exakte Masse: 217,10

Molekulargewicht: 217,23

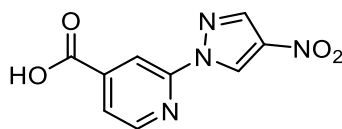
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

250 mg S-61 (1,011 mmol; 1 eq.) sowie 282 mg Fe(0)-Pulver (5,056 mmol; 5 eq.) und 270 mg NH_4Cl (5,056 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 20 ml $\text{EtOH:H}_2\text{O}$ (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 1,5 h bei 60°C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird

abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 2x 1 M NaOH (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als gelb-braunen FS (Ausbeute: 165 mg (75 %); Reinheit: 97,1 % (254,4 nm); 93,1 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.90 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.01 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 4.30 (br s, 2H), 2.86 (d, J = 4.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.7, 150.1, 148.5, 140.1, 135.2, 133.7, 117.9, 113.2, 112.2, 26.0; DC-MS (ESI) *m/z*: 239.9 [M+Na]⁺; 216.0 [M-H]⁻.

2-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)isonicotinsäure (**S-63**)



Summenformel: C₉H₆N₄O₄

Exakte Masse: 234,04

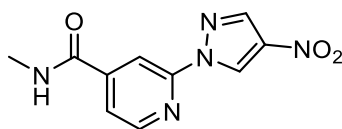
Molekulargewicht: 234,17

Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

1500 mg 4-Nitropyrazol (13,265 mmol; 1 eq.) sowie 2680 mg 2-Bromisonicotinsäure (13,265 mmol; 1 eq.) und 5500 mg K₂CO₃ (39,795 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 50 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 253 mg Cu(I)I (1,327 mmol; 0,1 eq.) sowie 0,418 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (1,327 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 95 °C erhitzt und für 20 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H₂O versetzt und mit 10 % HCl (aq.)-Lösung angesäuert. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt. Das Produkt wird im Umluftofen getrocknet, wodurch man einen weißen FS erhält (Ausbeute: 2950 mg (95 %); Reinheit: 99,9 % (254,4nm); 99,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.10 (br s, 1H), 9.46 (s, 1H), 8.65 (s, 2H), 8.31 (s, 1H), 7.91 (s, 1H).

N-Methyl-2-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)isonicotinamid (**S-64**)



Summenformel: C₁₀H₉N₅O₃

Exakte Masse: 247,07

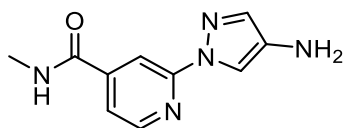
Molekulargewicht: 247,21

Die Synthese wird nach ASV-2c durchgeführt.

500 mg S-63 (2,135 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt und in 12,5 mL trockenem THF gelöst. Folgend werden 381 mg CDI (2,349 mmol; 1,1 eq.) gelöst in 2x 7,5 mL trockenem THF zugegeben. Der Ansatz wird 1,5 h bei RT rühren gelassen. Nachdem Monitoring via DC die quantitative Aktivierung der Säurekomponente bestätigt, wird 370 μ L 40 % Methylamin (aq.)-Lösung (4,270 mmol; 2,5 eq.) zugegeben und die Reaktion wird weitere 2 h bei RT gerührt. Danach wird die Reaktion mit demin. H₂O und 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Die Mischung wird 2x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 415 mg (79 %); Reinheit: 95,7 % (254,4 nm); 95,2 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.45 (s, 1H), 8.97 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.71 – 8.64 (m, 2H), 8.35 (s, 1H), 7.86 (dd, J = 5.0, 1.2 Hz, 1H), 2.83 (d, J = 4.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.7, 150.1, 149.6, 145.1, 137.8, 137.1, 126.9, 121.3, 110.6, 26.4; DC-MS (ESI) *m/z*: 246.2 [M-H]⁻.

2-(4-Amino-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-methylisonicotinamid (**S-65**)



Summenformel: C₁₀H₁₁N₅O

Exakte Masse: 217,10

Molekulargewicht: 217,23

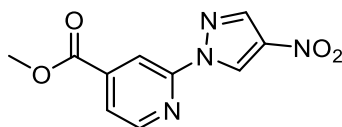
Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

350 mg S-64 (1,416 mmol; 1 eq.) sowie 395 mg Fe(0)-Pulver (7,079 mmol; 5 eq.) und 379 mg NH₄Cl (7,079 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 20 ml EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 1,5 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 2x 1 M NaOH (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als rot-braunen FS (Ausbeute: 200 mg (65 %); Reinheit: zu polar, HPLC-Methode ungeeignet für Reinheitsbestimmung).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.83 (s, 1H), 8.48 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.53 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 4.36 (s, 2H), 2.81 (d, J = 3.8 Hz, 3H); ¹³C NMR

(101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.5, 151.8, 148.8, 144.2, 134.8, 134.0, 117.6, 110.9, 108.5, 26.3;
DC-MS (ESI) m/z : 240.4 $[M+Na]^+$; 272.5 $[M+Na+MeOH]^+$.

Methyl-2-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)isonicotinat (**S-66**)



Summenformel: C₁₀H₈N₄O₄

Exakte Masse: 248,05

Molekulargewicht: 248,20

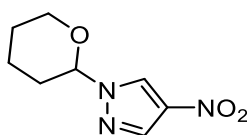
Die Synthese wird nach ASV-4 durchgeführt.

500 mg von S-63 (2,135 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt und in 25 mL MeOH gelöst. Es werden katalytische Mengen (Tropfen) konz. H₂SO₄ zugegeben. Der Ansatz wird 24 h zum Rückfluss erhitzt. Das präzipitierte Produkt wird abgesaugt und im Umluftofen getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen fluffigen FS (Ausbeute: 430 mg (82 %); Reinheit: 98,8 % (254,4 nm); 98,9 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.47 (s, 1H), 8.76 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.92 (dd, J = 5.0, 1.3 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.0, 150.3, 150.2, 140.5, 138.0, 137.2, 126.9, 122.6, 111.8, 53.1; DC-MS (ESI) m/z : 249.4 $[M+H]^+$.

7.4.9 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.5.5

4-Nitro-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-pyrazol (**S-67**)



Summenformel: C₈H₁₁N₃O₃

Exakte Masse: 197,08

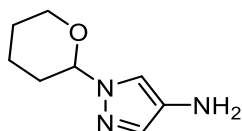
Molekulargewicht: 197,19

2000 mg 4-Nitropyrazol (17,6866 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt. Diese werden in 6 mL trockenem THF gelöst. 4,815 mL 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (53,0598 mmol; 3 eq.), wird via Spritze dazu gegeben sowie 168 mg p-Toluolsulfonsäure (Monohydrat) (0,8843 mmol; 0,05 eq.). Der Ansatz wird 16 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung versetzt und 2x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Restliches 3,4-Dihydro-2*H*-pyran wird an der Hochvakuumpumpe abgenommen. Das *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie

Experimenteller Teil

aufgereinigt (EtOAc/Pe: 10/90 – 35/65). Man erhält das Produkt als gelbes Öl (Ausbeute: 3170 mg (91 %); Reinheit: 92,7 % (254,4 nm); 88,2 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.38 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 5.42 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 4.13 – 4.06 (m, 1H), 3.78 – 3.71 (m, 1H), 2.21 – 2.14 (m, 1H), 2.05 – 1.92 (m, 2H), 1.74 – 1.64 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 135.6, 127.1, 88.5, 67.9, 30.8, 24.8, 21.7; DC-MS (ESI) m/z : 195.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

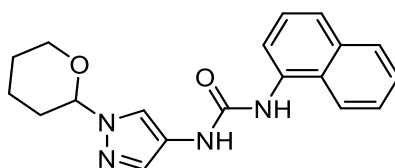
1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol-4-amin (**S-68**)

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$
Exakte Masse: 167,11
Molekulargewicht: 167,21

Die Synthese wird nach ASV-3b durchgeführt.

2500 mg S-67 (12,6852 mmol; 1 eq.) wird innerhalb eines miniclave[®] Glasreaktors (Büchi) vorgelegt und in 80 mL EtOH suspendiert. Der Reaktor wurde 3x alternierend evakuiert und mit Argon begast. Im Argon-Gegenstrom wird 202 mg (10 %) Pd/C (0,1903 mmol (Pd), 0,0015 eq.) zugegeben. Der Reaktor wird mit 7 bar H_2 beladen und für 16 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wird der Ansatz über Celite filtriert, eingeeengt und via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 1/99 – 10/90). Man erhält das Produkt als rotes Öl (Ausbeute: 1517 mg (72 %); Reinheit: HPLC-Methode ungeeignet für Reinheitsbestimmung).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.10 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 5.16 (dd, $J = 9.9, 2.5$ Hz, 1H), 3.92 – 3.82 (m, 3H), 3.60 – 3.51 (m, 1H), 2.01 – 1.85 (m, 2H), 1.83 – 1.75 (m, 1H), 1.67 – 1.55 (m, $J = 12.6, 11.8, 7.0, 3.7$ Hz, 1H), 1.52 – 1.44 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 131.3, 123.0, 114.4, 86.7, 66.6, 29.7, 24.7, 22.2; DC-MS (ESI) m/z : 190.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 222.1 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$.

1-(Naphthalen-1-yl)-3-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)harnstoff (**S-69**)

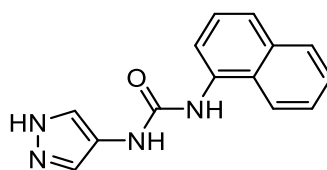
Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$
Exakte Masse: 336,16
Molekulargewicht: 336,40

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

Vorgelegt wird 1500 mg S-68 (8,9708 mmol; 1 eq.). Das Edukt wird in 80 mL DCM gelöst und im Eis-Wasserbad gekühlt. 1,289 mL 1-Naphthylisocyanat (8,9708 mmol; 1 eq.) wird via Spritze hinzugegeben. Der Ansatz wird 10 min. gekühlt, dann wird die Kühlung entfernt. Der Ansatz wird 6 h rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit MeOH versetzt und komplett gelöst. Am Rotationsverdampfer wird das DCM abgenommen wodurch das Produkt wieder ausfällt. Das rosa Produkt wird abgesaugt und mit MeOH:Et₂O (1:1) gewaschen. Man erhält das Produkt als rosa-weißes Pulver (Ausbeute: 1957 mg (65 %); Reinheit: 99,6 % (254,4 nm); 97,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.75 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 8.09 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.95 – 7.90 (m, 2H), 7.65 – 7.51 (m, 4H), 7.46 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 5.33 (dd, J = 9.9, 2.1 Hz, 1H), 3.97 – 3.85 (m, J = 12.2 Hz, 1H), 3.68 – 3.55 (m, 1H), 2.15 – 2.00 (m, 1H), 1.99 – 1.83 (m, J = 9.2, 7.1, 3.3 Hz, 2H), 1.71 – 1.47 (m, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.9, 134.6, 133.7, 130.3, 128.4, 125.9, 125.9, 125.7, 122.8, 122.5, 121.4, 118.1, 117.2, 86.9, 66.7, 29.8, 24.7, 22.1; DC-MS (ESI) *m/z*: 359.2 [M+Na]⁺; 335.1 [M-H]⁻.

1-(Naphthalen-1-yl)-3-(1*H*-pyrazol-4-yl)harnstoff (**S-70**)



Summenformel: C₁₄H₁₂N₄O

Exakte Masse: 252,10

Molekulargewicht: 252,28

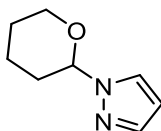
Schritt 1: Vorgelegt wird 1500 mg S-69 (4,4590 mmol; 1 eq.). Das Edukt wird in 50 mL MeOH suspendiert. Es werden 1 mL konz. HCl (aq.)-Lösung zugegeben und der Ansatz wird über Nacht bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen, wobei weißer FS auskristallisiert. Der FS wird in Et₂O geschallt und abgesaugt. Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: 1323 mg (quant.) Reinheit: 98,5 % (254,4 nm); 97,7 % (230,0 nm)).

Schritt 2 (Verarbeitung zur freien Base): 300 mg Produkt aus Schritt 1 wird in 20 mL MeOH und 20 mL 0,5 M NaOH (aq.)-Lösung für 30 min rühren gelassen (Suspension). Der FS wird abgesaugt und mit demin. H₂O sowie Et₂O gewaschen. Das Produkt wird bis zur Massenkonstanz im Trockenschrank getrocknet (Ausbeute: 215 mg (82 %)).

(Freie Base:) ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.54 (br s, 1H), 8.72 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.10 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.06 – 8.00 (m, 1H), 7.95 – 7.89 (m, 1H), 7.79 (br s, 1H), 7.63 – 7.50 (m, 4H), 7.46 (t, J = 7.9 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.9, 134.7, 133.8,

Experimenteller Teil

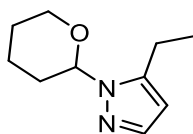
130.3, 128.4, 125.9, 125.9, 125.8, 125.6, 122.6, 121.6, 121.3, 118.0, 116.9; DC-MS (ESI) m/z : 275.1 $[M+Na]^+$; 307.4 $[M+Na+MeOH]^+$.

1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol (**S-71**)

Summenformel: $C_8H_{12}N_2O$
 Exakte Masse: 152,09
 Molekulargewicht: 152,20

Vorgelegt werden 8683 mg Pyrazol (127,5411 mmol; 1 eq.) sowie 17,361 mL 3,4-Dihydro-2H-pyran (191,3117 mmol; 1,5 eq.) und 98 μ L Trifluoressigsäure (1,2754 mmol; 0,01 eq.). Der Ansatz wird 5 h zu Rückfluss erhitzt. Danach wird der Ansatz abkühlen gelassen und o.n. bei RT gerührt. Am Folgetag wird 204 mg (60 wt.% in Silikonöl) NaH (5,1017 mmol; 0,04 eq.) zum Ansatz gegeben. Überschüssiges 3,4-Dihydro-2H-pyran wird am Rotationsverdampfer abgenommen. Das *crude* Produkt wird 2x fraktioniert destilliert (1-2 mBar, 105-110 °C). Man erhält das Produkt als klare viskose Flüssigkeit (Ausbeute: 15139 mg (78 %) Reinheit: HPLC-Methode ungeeignet für Reinheitsbestimmung).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.13 – 7.68 (m, 1H), 7.48 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 6.29 (dd, J = 2.3, 1.9 Hz, 1H), 5.40 (dd, J = 10.1, 2.3 Hz, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 1H), 3.65 – 3.57 (m, 1H), 2.13 – 2.03 (m, 1H), 1.96 – 1.85 (m, 2H), 1.71 – 1.50 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 138.7, 128.6, 105.6, 86.6, 66.9, 29.9, 24.6, 22.1.

5-Ethyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol (**S-72**)

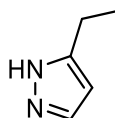
Summenformel: $C_{10}H_{16}N_2O$
 Exakte Masse: 180,13
 Molekulargewicht: 180,25

500 mg S-71 (3,2852 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL trockenem THF gelöst. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Aceton- N_2 -Bad wird der Ansatz auf -78 °C gekühlt und 15 min gerührt. Mit einer mit Argon gespülten Spritze wird tropfenweise 1,313 mL (2,5 M) *n*-BuLi (3,2852 mmol; 1 eq.) über 10 min. zugegeben. Der Ansatz wird unter beständiger Kühlung für 30 min. gerührt. Folgend wird über 10 min. mit einer mit Argon gespülten Spritze 0,240 mL Iodethan (3,2852 mmol; 1 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird 3 h gerührt wobei die Kühlbadtemperatur nicht > -70 °C erreicht. Nach Abschluss der 3 h wird der Ansatz auf RT aufgewärmt und mit 1 mL demin. H_2O versetzt.

Der Ansatz wird mit weiterem demin. H₂O aufgenommen und 3x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 1x mit ges. S₂O₃ (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und eingeeengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Pe: 25/75 – 80/20). Man erhält das Produkt als gelbliches Öl (Ausbeute: 498 mg (84 %); Reinheit: HPLC-Methode ungeeignet für Reinheitsbestimmung).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.46 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.08 – 6.04 (m, 1H), 5.25 (dd, J = 9.9, 2.6 Hz, 1H), 4.07 – 4.00 (m, J = 11.7, 4.2, 2.1 Hz, 1H), 3.67 – 3.60 (m, J = 11.3, 8.6, 2.8 Hz, 1H), 2.79 – 2.62 (m, 2H), 2.56 – 2.44 (m, J = 14.2, 12.2, 10.0, 4.2 Hz, 1H), 2.15 – 2.06 (m, 1H), 1.98 – 1.92 (m, 1H), 1.72 – 1.55 (m, 3H), 1.28 (t, J = 7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 145.4, 139.2, 104.4, 84.3, 67.9, 29.6, 25.2, 23.1, 18.7, 12.9.

5-Ethyl-1*H*-pyrazol (**S-73**)



Summenformel: C₅H₈N₂

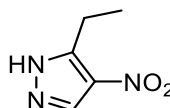
Exakte Masse: 96,07

Molekulargewicht: 96,13

Vorgelegt wird 480 mg S-72 (2,6623 mmol; 1 eq.) und mit 50 mL MeOH versetzt. Der Ansatz wird mit 1 mL konz. HCl (aq.)-Lösung versetzt und bei RT über Nacht rühren gelassen. Das Lösemittel wird am Rotationverdampfer abgenommen. Die verbleibende wässrige Phase wird mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und eingeeengt. Das Produkt wird in DCM gelöst und filtriert. Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: quant.; Reinheit: HPLC-Methode ungeeignet für Reinheitsbestimmung).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.43 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.01 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 2.58 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.17 (t, J = 7.6 Hz, 3H).

5-Ethyl-4-nitro-1*H*-pyrazol (**S-74**)



Summenformel: C₅H₇N₃O₂

Exakte Masse: 141,05

Molekulargewicht: 141,13

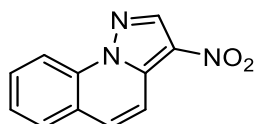
258 mg S-73 (2,6839 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 2,5 mL konz. H₂SO₄ dispergiert. Folgend wird der Ansatz auf 60-65 °C erhitzt und tropfenweise 123 µL rauchende (>90 %)

Experimenteller Teil

Salpetersäure (2,6839 mmol; 1 eq. (bezogen auf reine HNO_3)) via Spritze hinzugegeben. Die Reaktion wird 2 h bei 60 °C gerührt. Folgend wird der Ansatz auf 50 g Eis gekippt. Der Ansatz wird mit ges. NH_4Cl -Lösung und 2 M NaOH -Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Das *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM : 1/99 – 8/92) aufgereinigt. Im Tiefkühler wird das Produkt fest als weiß-gelblicher FS (Ausbeute: 267 mg (71 %) (Reinheit: 93,9 % (254,4 nm); 94,6 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.67 (s, 1H), 8.48 (d, $J = 238.7$ Hz, 1H), 2.94 (bs, 2H), 1.22 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

7.4.10 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.6

3-Nitropyrazolo[1,5-a]chinolin (**S-75**)

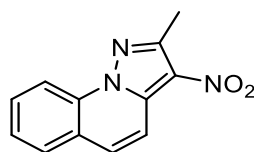
Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$

Exakte Masse: 213,05

Molekulargewicht: 213,20

1500 mg 3-Methyl-4-nitropyrazol (11,8017 mmol; 1 eq.) sowie 4893 mg K_2CO_3 (35,4052 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in 70 mL DMSO suspendiert und 1,378 mL 2-Brombenzaldehyd (11,8017 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Der Ansatz wird 3x evakuiert und mit Argon wieder begast. Im Argon-Gegenstrom wird 491 mg 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline (2,3603 mmol; 0,2 eq.) sowie 225 mg Cu(I) (1,1802 mmol; 0,1 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen und für 72 h bei 120-125 °C gerührt. Der Ansatz wird auf RT abkühlen gelassen und mit demin. H_2O versetzt. Präzipitat wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und getrocknet. Der FS wird via Flash-Chromatographie (DMC/PE : 20/80 – 100/0) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als gelbe kristalline Nadeln (Ausbeute: 500 mg (20 %); Reinheit: 99,3 % (254,4 nm); 97,7 % (230,0 nm)).

Keine ausreichende Löslichkeit für NMR in CDCl_3 oder $\text{DMSO}-d_6$.

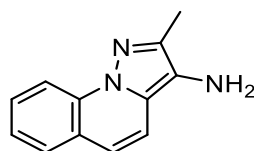
2-Methyl-3-nitropirazolo[1,5-a]chinoline (**S-76**)Summenformel: C₁₂H₉N₃O₂

Exakte Masse: 227,07

Molekulargewicht: 227,22

1500 mg 3,5-Dimethyl-4-nitropirazol (10,6285 mmol; 1 eq.) sowie 4407 mg K₂CO₃ (31,8855 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in 50 mL DMSO suspendiert und 1,241 mL 2-Brombenzaldehyd (10,6285 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Der Ansatz wird 3x evakuiert und mit Argon wieder begast. Im Argon-Gegenstrom wird 443 mg 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline (2,1257 mmol; 0,2 eq.) sowie 202 mg Cu(I)I (1,0628 mmol; 0,1 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen und für 24 h bei 120-125 °C gerührt. Der Ansatz wird auf RT abkühlen gelassen und mit demin. H₂O versetzt. Präzipitat wird abgesaugt und getrocknet. Der FS wird in EtOH aufgenommen, heißfiltriert und via Flash-Chromatographie (DMC/PE: 10/90 – 100/0) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als weiß-gelblichen FS (Ausbeute: 530 mg (22 %); Reinheit: 99,9 % (254,4 nm); 98,8 % (230,0 nm)).

Keine ausreichende Löslichkeit in CDCl₃ oder DMSO-*d*₆; ASAP-MS (APCI) *m/z*: 228.1 [M+H]⁺.

2-Methylpyrazolo[1,5-a]chinolin-3-amin (**S-77**)Summenformel: C₁₂H₁₁N₃

Exakte Masse: 197,10

Molekulargewicht: 197,24

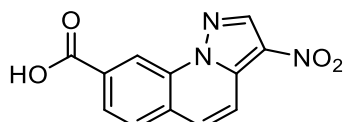
Der Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

300 mg S-76 (1,3203 mmol; 1 eq.) sowie 369 mg Fe(0)-Pulver (6,6015 mmol; 5 eq.) und 353mg NH₄Cl (6,6015 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt. Die Reagenzien werden in 30 mL EtOH:H₂O (4:1) suspendiert und 2h auf 55-60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit großen Mengen EtOH nachgespült. Der Ansatz wird zur Trockene eingeeengt und mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 2x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Lösung wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄

Experimenteller Teil

getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als braun-gelben FS (Ausbeute: 209 mg (80 %); Reinheit: 99,4 % (254,4 nm); 98,0 % (230,0 nm)).

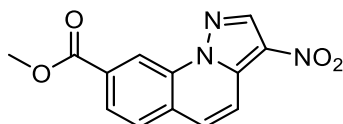
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.19 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 1H), 7.48 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 7.16 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 4.33 (br s, 2H), 2.33 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 139.2, 134.3, 128.7, 128.2, 125.8, 123.4, 122.7, 122.1, 119.3, 116.0, 113.4, 11.2; DC-MS (ESI) m/z : 198.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-Nitropirazolo[1,5-*a*]chinolin-8-carbonsäure (**S-78**)

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_4$
Exakte Masse: 257,04
Molekulargewicht: 257,21

1300 mg 3-Methyl-4-nitropirazol (10,2282 mmol; 1 eq.) sowie 5654 mg K_2CO_3 (40,9127 mmol; 4 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in 70 mL DMSO suspendiert und 2343 mg 3-Brom-4-formylbenzoesäure (10,2282 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Der Ansatz wird 3x evakuiert und mit Argon wieder begast. Im Argon-Gegenstrom wird 426 mg 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline (2,0456 mmol; 0,2 eq.) sowie 195 mg Cu(I)I (1,0228 mmol; 0,1 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen und für 72 h bei 120-125 °C gerührt. Der Ansatz wird auf RT abkühlen gelassen und mit demin. H_2O versetzt und mit 10 % HCl (aq.)-Lösung angesäuert. Der Ansatz wird mit größeren Mengen DCM extrahiert. Die organische Phase wird 1x mit salzsaurer ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen und folgend mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird mit HCl (aq.)-Lösung wieder angesäuert, wodurch ein gelblicher FS ausfällt. Das grüngelbe Präzipitat wird abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und getrocknet (Ausbeute: 1936 mg; Das Produkt wird *crude* im nächsten Schritt eingesetzt).

ASAP-MS (APCI) m/z : 258.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 256.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Methyl-3-nitropirazolo[1,5-*a*]chinolin-8-carboxylat (**S-79**)

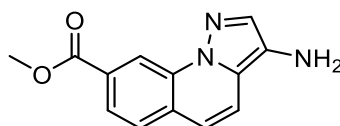
Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$
Exakte Masse: 271,06
Molekulargewicht: 271,23

Die Synthese wird nach ASV-4 durchgeführt.

Vorgelegt wird *crudes* S-78. Das Edukt wird in MeOH suspendiert und 1 mL konz. H₂SO₄ wird zugegeben. Der Ansatz wird zum Rückfluss erhitzt für 20 h. Nach dem Erkalten des Ansatzes wird der grün-bräunliche FS abgesaugt und mit Et₂O gewaschen (Ausbeute: 480 mg; Das Produkt wird *crude* im nächsten Schritt eingesetzt).

ASAP-MS (APCI) *m/z*: 272.1 [M+H]⁺; 270.0 [M-H]⁻.

Methyl-3-aminopyrazolo[1,5-*a*]chinolin-8-carboxylat (**S-80**)



Summenformel: C₁₃H₁₁N₃O₂

Exakte Masse: 241,09

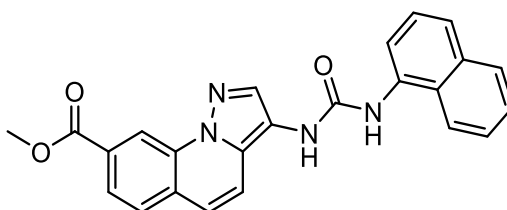
Molekulargewicht: 241,25

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

Vorgelegt wird 450 mg *crudes* S-79 (88 % rein) sowie 463 mg Fe(0) (8,2955 mmol; 5 eq.) und 444 mg NH₄Cl (8,2955 mmol; 5 eq.). Die Edukte werden in 25 mL EtOH:H₂O (5:1) suspendiert und 1,5 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit großen Mengen EtOH nachgespült. Der Ansatz wird zur Trockene eingengt und mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 3x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Lösung wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als gelb-braun-rote Flakes (Ausbeute: 275 mg (78 %); Reinheit: 96,9 % (254,4 nm); 98,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.79 (s, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.66 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.22 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.68 (br s, 2H), 3.92 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 134.2, 131.2, 129.1, 128.7, 127.0, 126.1, 124.9, 124.1, 119.0, 118.3, 114.7, 52.4; DC-MS (ESI) *m/z*: 263.8 [M+Na]⁺; 296.0 [M+Na+MeOH]⁺.

Methyl-3-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)pyrazolo[1,5-*a*]chinolin-8-carboxylat (**S-81**)



Summenformel: C₂₄H₁₈N₄O₃

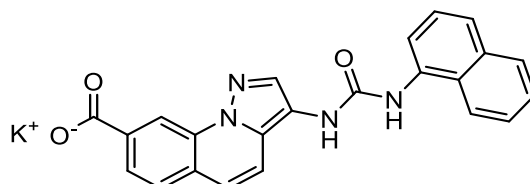
Exakte Masse: 410,14

Molekulargewicht: 410,43

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

200 mg S-80 (0,8290 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 20 mL trockenem DCM gelöst. Es wird 119 μ L 1-Naphthylisocyanat (0,8290 mmol; 1 eq.) zugegeben und 70 h bei RT gerührt. Das Produkt wird abgesaugt. (Ausbeute: quant.; Das Produkt wird *crude* direkt für den nächsten Schritt verwendet).

Kalium 3-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)pyrazolo[1,5-a]chinolin-8-carboxylat (**S-82**)



Summenformel: $C_{23}H_{15}KN_4O_3$

Exakte Masse: 434,08

Molekulargewicht: 434,50

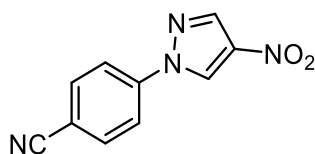
Die Synthese wird nach ASV-5a durchgeführt.

340 mg *crudes* S-81 (0,8284 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 21 mL einer LM-Mischung aus THF:MeOH:H₂O (10:10:1) suspendiert. Folgend wird 279 mg (4,9704 mmol; 6 eq.) KOH zugegeben und der Ansatz wird o.n. bei 60 °C gerührt. Nach 18h wird der Ansatz abkühlen gelassen und das feste Produkt wird abgesaugt und mit Et₂O gewaschen. Man erhält das Produkt als hell braunen amorphen Feststoff (Ausbeute: 78 mg (22 %); Reinheit: 93,0 % (254,4 nm); 92,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.06 (br s, 1H), 10.56 (br s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.51 – 8.33 (m, 2H), 8.13 – 8.02 (m, 2H), 8.00 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.58 – 7.43 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.2, 154.2, 141.4, 135.5, 133.8, 133.7, 133.5, 128.0, 127.7, 127.5, 126.9, 125.8, 125.7, 125.6, 125.4, 123.6, 122.7, 122.6, 121.8, 118.4, 116.5, 116.2, 115.0.

7.4.11 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.7

4-(4-Nitro-1H-pyrazol-1-yl)benzonnitril (**S-83**)



Summenformel: $C_{10}H_6N_4O_2$

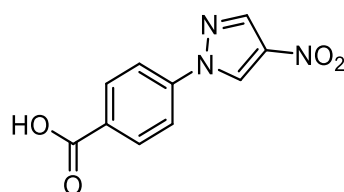
Exakte Masse: 214,05

Molekulargewicht: 214,18

1015 mg 4-Fluorbenzonnitril (8,381 mmol; 1 eq.) sowie 1042 mg 4-Nitropyrazol (9,219 mmol; 1,1 eq.) und 2896 mg K_2CO_3 (20,952 mmol; 2,5 eq.) werden vorgelegt und in 25 mL DMSO gelöst. Die Reaktion wird auf 120 °C für 4 h erhitzt. Folgend wird der Ansatz mit demin. H_2O versetzt. Das präzipitierte Produkt wird abfiltriert und mit demin. H_2O gewaschen. Nach dem Trocknen erhält man das Produkt als gelben FS (Ausbeute: quantitativ; Reinheit: 94,9 % (254,4 nm); 94,3 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.79 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.20 – 8.14 (m, 2H), 8.08 – 8.04 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 141.4, 137.8, 137.4, 134.1, 129.0, 120.0, 118.2, 110.6.

4-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-84**)



Summenformel: $C_{10}H_7N_3O_4$

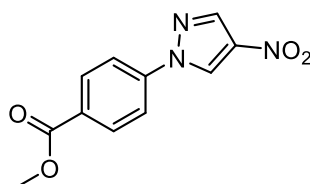
Exakte Masse: 233,04

Molekulargewicht: 233,18

1500 mg S-83 (7,003 mmol; 1 eq.) werden in 10 mL demin. H_2O und 20 mL 37 % HCl (aq.)-Lösung suspendiert. Die Reaktion wird 3 h zum Reflux erhitzt und 19 h auf 85-90 °C. Am nächsten Tag werden 20 mL zusätzliches 37 % HCl (aq.)-Lösung zugesetzt. Der Ansatz wird wieder 3 h zum Reflux und 19 h bei 85-90 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktion wird die Suspension gefiltert und getrocknet. Man erhält das Produkt als grau-weißen FS (Ausbeute: 1122 mg (69 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,3 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.22 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.12 – 8.06 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166.4, 141.3, 137.5, 137.2, 130.9, 130.2, 128.7, 119.3.

Methyl-4-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-85**)



Summenformel: $C_{11}H_9N_3O_4$

Exakte Masse: 247,06

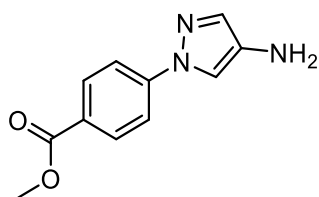
Molekulargewicht: 247,21

Die Synthese wird nach ASV-4 durchgeführt.

Experimenteller Teil

1000 mg S-84 (4,289 mmol; 1 eq.) werden in 25 mL MeOH suspendiert. 0,1 mL H₂SO₄ werden zugesetzt und die Reaktion wird 24 h zu Reflux erhitzt. Das präzipitierte Produkt wird abfiltriert und vorsichtig mit einer kleinen Menge kaltem MeOH nachgewaschen. Man erhält das Produkt als gelb-weißen FS (Ausbeute: 840 mg (79 %); Reinheit: 99,1 % (254,4 nm); 98,5 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.80 – 9.75 (m, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.14 – 8.09 (m, 4H), 3.88 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.3, 141.6, 137.5, 137.3, 130.8, 128.9, 128.7, 119.3, 52.4.

Methyl-4-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-86**)

Summenformel: C₁₁H₁₁N₃O₂

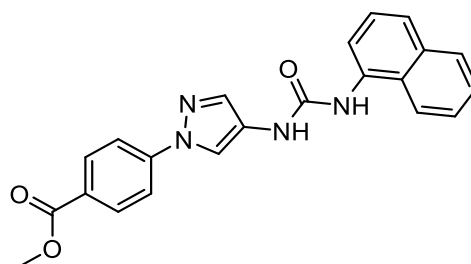
Exakte Masse: 217,09

Molekulargewicht: 217,23

Die Synthese wird nach ASV-3a durchgeführt.

800 mg S-85 (3,236 mmol; 1 eq.) sowie 1731 mg Fe(0)-Pulver (32,361 mmol; 10 eq.) und 1807 mg NH₄Cl (32,361 mmol; 10 eq.) werden vorgelegt und in 25 ml EtOH:H₂O (4:1) suspendiert. Der Ansatz wird für 2 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 3x 0,5 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Man erhält das Produkt als gelblichen FS (Ausbeute: 625 mg (89 %); Reinheit: 99,2 % (254,4 nm); 98,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.01 – 7.97 (m, 2H), 7.83 – 7.79 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 4.33 (bs, 2H), 3.84 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 143.3, 134.4, 134.3, 130.7, 125.2, 116.5, 111.7, 52.0.

Methyl-4-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-87**)Summenformel: $C_{22}H_{18}N_4O_3$

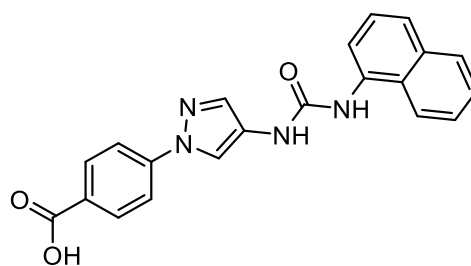
Exakte Masse: 386,14

Molekulargewicht: 386,41

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

600 mg S-86 (2,762 mmol; 1 eq.) werden in 25 mL trockenem DCM gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und mit 0,4 mL 1-Naphthylisocyanat (2,762 mmol; 1 eq.) versetzt. Folgend wird die Reaktion 19 h bei RT gerührt. Das präzipitierte Produkt wird abfiltriert, wodurch man das Produkt als weißen FS erhält. (Ausbeute: 980 mg (92 %); Reinheit: 98,9 % (254,4 nm); 97,3 % (230,0 nm)).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.02 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 3H), 7.99 – 7.92 (m, 4H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165.6, 152.8, 143.0, 134.4, 134.2, 133.7, 130.8, 128.4, 126.3, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 125.3, 123.0, 121.4, 117.4, 117.3, 116.3, 52.1.

4-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-88**)Summenformel: $C_{21}H_{16}N_4O_3$

Exakte Masse: 372,12

Molekulargewicht: 372,38

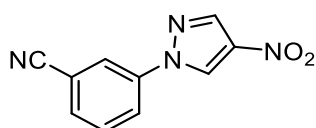
Die Synthese wird nach ASV-5a durchgeführt.

430 mg S-87 (1,113 mmol; 1 eq.) sowie 375 mg KOH (6,677 mmol; 6 eq.) werden in 26,25 mL MeOH:THF:H₂O (10:10:1) suspendiert. Die Reaktion wird für 3 d auf 60 °C erhitzt. Die organische Lösemittelkomponente wird abgenommen und 10 % HCl (aq.)-Lösung wird zugesetzt. Der Ansatz wird 30 min. rühren gelassen. Das präzipitierende Produkt wird

Experimenteller Teil

abfiltriert und mit demin. H₂O nachgewaschen. Man erhält das Produkt als cremefarbener FS (Ausbeute: 368 mg (89 %) Reinheit: 96,8 % (254,4 nm); 96,2 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.82 (br s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.04 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 7.98 – 7.91 (m, 4H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.57 (dt, J = 14.6, 7.0 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.7, 152.8, 142.8, 134.4, 134.1, 133.7, 130.9, 128.4, 127.6, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 125.2, 123.0, 121.4, 117.4, 117.2, 116.3.

3-(4-Nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)benzonnitril (**S-89**)

Summenformel: C₁₀H₆N₄O₂

Exakte Masse: 214,05

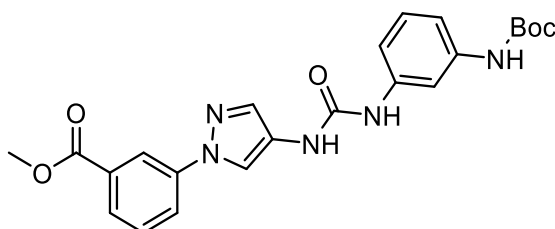
Molekulargewicht: 214,18

150 mg 3-Fluorbenzonnitril (1,2385 mmol; 1 eq.), 140 mg 4-Nitropyrazol (1,2385 mmol; 1 eq.) und 513 mg K₂CO₃ (3,7156 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3 h bei 65 °C und 16 h bei 105 °C gerührt. Folgend wird der Ansatz mit demin. H₂O und EtOAc versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und 3x mit ges. NaCl (aq.) gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/PE: 10/90 – 30/70). Man erhält das Produkt als fluffige weiße Nadeln (Ausbeute: 95 mg (36 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 100,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.75 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.50 – 8.44 (m, 1H), 8.34 – 8.26 (m, 1H), 7.92 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.78 (t, J = 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 138.79, 137.42, 137.17, 131.78, 131.15, 128.79, 124.10, 122.84, 117.83, 112.64.

7.4.12 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.8

Methyl-3-(4-(3-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat

(S-90)

Summenformel: C₂₃H₂₅N₅O₅

Exakte Masse: 451,19

Molekulargewicht: 451,48

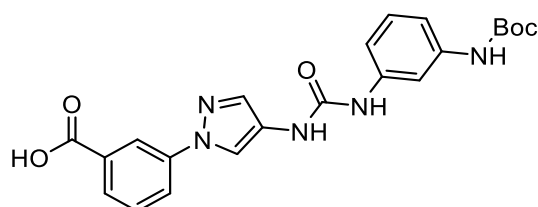
Die Synthese wird nach ASV-7b durchgeführt.

1198 mg *tert*-Butyl(3-aminophenyl)carbammat (5,7534 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 60 mL trockenem ACN gelöst. Folgend wird der Ansatz via Eis-Wasserbad gekühlt und 0,722 mL Phenylchlorformiat (5,7534 mmol; 1 eq.) sowie 0,464 mL Pyridin (5,7534 mmol; 1 eq.) werden zugegeben. Die Reaktion wird 10 min. gerührt, wonach die Kühlung entfernt wird und die Reaktion bei RT weiter rührt. Nachdem eine Reaktionskontrolle via DC (EtOAc/PE: 30/70) die vollständige Umsetzung zum intermediären Carbamat anzeigt (2 h), wird 1249 mg S-24 (5,7534 mmol; 1 eq.) hinzugegeben sowie 1,957 mL DIPEA (11,5067 mmol; 2 eq.). Der Ansatz wird bei leichtem Erhitzen (40-50 °C) für 72 h rühren gelassen. Das Lösemittel wird einrotiert und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/PE: 35/65 – 70/30). Man erhält das Produkt als rot-orangen FS (Ausbeute: 1284 mg (49 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.29 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.50 (d, J = 17.5 Hz, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.08 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.90 – 7.78 (m, 2H), 7.70 – 7.56 (m, J = 11.2 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 1.48 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 152.7, 152.2, 140.1, 140.0, 139.9, 133.5, 130.9, 130.1, 128.8, 126.1, 124.9, 122.0, 118.0, 116.3, 112.0, 108.1, 78.9, 52.4, 28.1; DC-MS (ESI) *m/z*: 474.1 [M+Na]⁺, 450.2 [M-H]⁻.

3-(4-(3-(3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)phenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure

(S-91)



Summenformel: C₂₂H₂₃N₅O₅

Exakte Masse: 437,17

Molekulargewicht: 437,46

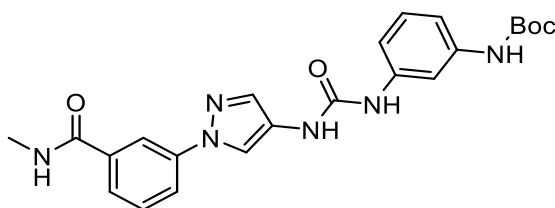
Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

775 mg S-90 (1,7166 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 25 mL MeOH und 25 mL THF gelöst. Folgend werden 12,5 mL demin. H₂O sowie 13,29 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (17,1658 mmol, 10 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird bei RT 48 h gerührt. Folgend wird er Ansatz mit 10 % HCl (aq.)-Lösung sowie demin. H₂O versetzt und 2x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wird mit DCM versetzt, wodurch ein FS sich bildet. Dieser wird abgesaugt und mit Pentan gewaschen. Man erhält das Produkt als orange-rötlichen FS (Ausbeute: 680 mg (91 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,8 % (230,0 nm)).

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.20 (br s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.68 – 7.56 (m, 2H), 7.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.12 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 1.48 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.7, 152.7, 152.2, 140.1, 139.9, 139.9, 133.5, 132.2, 129.9, 128.8, 126.3, 124.8, 121.7, 118.2, 116.4, 112.0, 112.0, 108.1, 78.9, 28.1; DC-MS (ESI) m/z : 459.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 436.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

tert-Butyl-(3-(3-(1-(3-(methylcarbamoyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)harnstoff)phenyl)carbammat
(S-92)

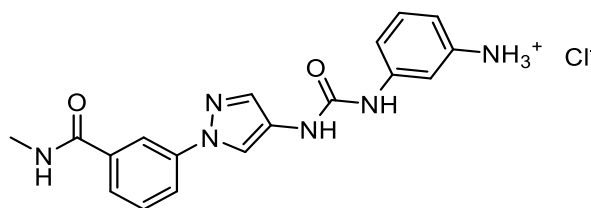


Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4$
Exakte Masse: 450,20
Molekulargewicht: 450,50

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

522 mg S-91 (1,1933 mmol; 1 eq.) sowie 907 mg HATU (2,3865 mmol; 2 eq.) in 50 mL trockenem DMF gelöst. Es wird 0,624 mL DIPEA (3,5798 mmol; 3 eq.) zugegeben und der Ansatz wird bei RT rühren gelassen. Nachdem eine Reaktionskontrolle vollständige Aktivierung der Carbonsäurefunktion aufzeigt (ca. 2 h), werdem 0,516 mL 40 % MeNH_2 (aq.)-Lösung (5,9663 mmol; 5 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird 14 h rühren gelassen und anschließend mit demin. H_2O versetzt. Man erhält das Produkt als gelb-braunen FS (Ausbeute: 471 mg (88 %); Reinheit: 94,9 % (254,4 nm); 92,8 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.30 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.67 – 8.59 (m, $J = 4.0$ Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.56 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.12 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 2.82 (d, $J = 4.2$ Hz, 3H), 1.48 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.8, 152.7, 152.2, 140.1, 139.9, 139.8, 135.8, 133.1, 129.6, 128.8, 124.7, 124.4, 120.2, 116.4, 116.1, 112.0, 108.0, 78.9, 28.1, 26.3; DC-MS (ESI) m/z : 472.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 448.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 484.9 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

3-(3-(1-(3-(Methylcarbamoyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)harnstoff)benzenaminiumchlorid**(S-93)**Summenformel: C₁₈H₁₉ClN₆O₂

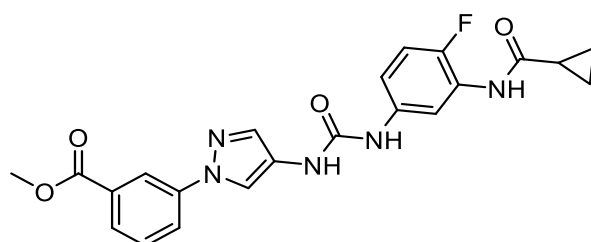
Exakte Masse: 386,13

Molekulargewicht: 386,84

Die Synthese wird nach ASV-8 durchgeführt.

425 mg S-92 (0,9434 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 50 mL EtOH gelöst. Folgend wird 7,547 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung zugegeben (9,4340 mmol; 10 eq.). Der Ansatz wird bei 60 °C 19,5 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer abgenommen. Der Rückstand wird in Et₂O suspendiert und abgesaugt um das Produkt als bräunlichen FS zu erhalten (Ausbeute: quantitativ; Reinheit: 95,4 % (254,4 nm); 94,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.33 (br s, 3H), 9.77 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 8.74 – 8.63 (m, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.95 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.77 – 7.71 (m, 2H), 7.55 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.42 – 7.35 (m, 2H), 6.97 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 2.82 (d, J = 4.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 152.4, 141.3, 139.7, 135.7, 133.1, 132.0, 130.1, 129.6, 124.5, 124.4, 120.2, 117.2, 116.5, 116.1, 116.0, 112.3, 26.3; DC-MS (ESI) *m/z*: 373.0 [M+Na]⁺, 349.1 [M-H]⁻; 385.1 [M+Cl]⁻.

Methyl-3-(4-(3-(3-(cyclopropancarboxamid)-4-fluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat **(S-94)**Summenformel: C₂₂H₂₀FN₅O₄

Exakte Masse: 437,15

Molekulargewicht: 437,43

Die Synthese wird nach ASV-7b durchgeführt.

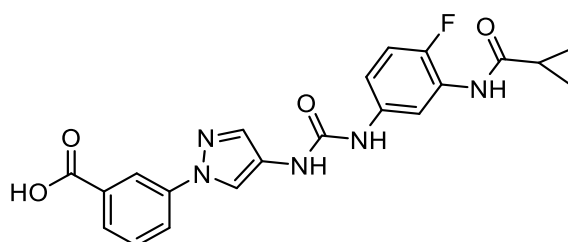
179 mg N-(5-Amino-2-fluorphenyl)cyclopropancarboxamid (0,9213 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL trockenem ACN gelöst. Folgend wird der Ansatz via Eis-Wasserbad

gekühlt und 0,116 mL Phenylchlorformiat (0,9213 mmol; 1 eq.) sowie 74 μ L Pyridin (0,9213 mmol; 1 eq.) werden zugegeben. Die Reaktion wird 30 min. gerührt, wonach die Kühlung entfernt wird und die Reaktion bei RT weiter rührt. Nachdem eine Reaktionskontrolle via DC (EtOAc/PE: 25/75) die vollständige Umsetzung zum intermediären Carbamat anzeigt (3,5 h), wird 200 mg S-24 (0,9213 mmol; 1 eq.) hinzugegeben sowie 0,313 mL DIPEA (1,8426 mmol; 2 eq.). Der Ansatz wird bei leichtem Erhitzen (55 °C) für 18 h rühren gelassen. Der präzipitierte FS wird abgesaugt und mit Et₂O nachgewaschen. Man erhält das Produkt als beigen FS (Ausbeute: 206 mg (51 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.93 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.53 (d, J = 14.1 Hz, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.07 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.14 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.01 (s, 1H), 0.81 (s, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.1, 165.7, 152.3, 148.6 (d, J = 240.4 Hz), 140.0, 135.9 (d, J = 2.3 Hz), 133.6, 130.9, 130.2, 126.2 (d, J = 13.0 Hz), 126.1, 124.8, 122.0, 118.0, 116.4, 115.1 (d, J = 20.6 Hz), 114.3 (d, J = 7.3 Hz), 113.9, 52.4, 14.0, 7.4; DC-MS (ESI) *m/z*: 459.8 [M+Na]⁺, 435.9 [M-H]⁻; 471.9 [M+Cl]⁻.

3-(4-(3-(3-(Cyclopropancarboxamid)-4-fluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure

(S-95)



Summenformel: C₂₁H₁₈FN₅O₄

Exakte Masse: 423,13

Molekulargewicht: 423,40

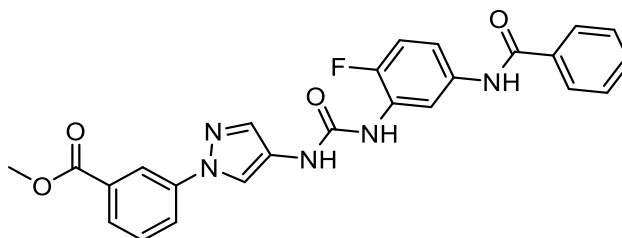
Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

150 mg S-94 (0,3429 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL MeOH und 5 mL THF gelöst. Folgend werden 0,5 mL demin. H₂O sowie 2 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (2,0575 mmol, 6 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird bei RT 20 h gerührt. MeOH sowie THF werden am Rotationsverdampfer abgenommen. Folgend wird er Ansatz mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Hierbei fällt das Produkt aus und wird abgesaugt. Man erhält das Produkt als weißgelben FS (Ausbeute: 119 mg (82 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.22 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.50 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 8.35 – 8.27 (m, 1H), 8.08 – 7.99 (m, 2H), 7.86 – 7.80 (m, 2H), 7.60 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.26 (ddd, J = 8.8, 4.2, 2.8 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 10.5, 9.0 Hz, 1H), 2.05 – 1.96 (m,

1H), 0.87 – 0.76 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.1, 166.8, 152.3, 148.6 (d, J = 239.6 Hz), 139.9, 135.9 (d, J = 1.3 Hz), 133.5, 132.2, 130.0, 126.3, 126.2 (d, J = 12.6 Hz), 124.8, 121.7, 118.2, 116.5, 115.1 (d, J = 20.5 Hz), 114.3 (d, J = 6.3 Hz), 114.0, 14.0, 7.4.

Methyl-3-(4-(3-(5-benzamid-2-fluorphenyl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-96**)



Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{O}_4$

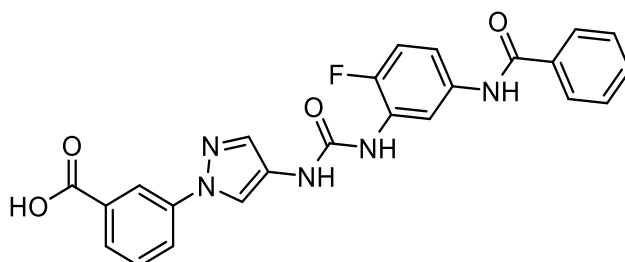
Exakte Masse: 473,15

Molekulargewicht: 473,46

Die Synthese wird nach ASV-7b durchgeführt.

133 mg *N*-(3-Amino-4-fluorphenyl)benzamid (0,5758 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem ACN gelöst. Folgend wird der Ansatz via Eis-Wasserbad gekühlt und 72 μL Phenylchlorformiat (0,5758 mmol; 1 eq.) sowie 46 μL Pyridin (0,5758 mmol; 1 eq.) werden zugegeben. Die Reaktion wird 30 min. gerührt, wonach die Kühlung entfernt wird und die Reaktion bei RT weiter rührt. Nachdem eine Reaktionskontrolle via DC (EtOAc/PE: 25/75) die vollständige Umsetzung zum intermediären Carbamat anzeigt (3,5 h), wird 125 mg S-24 (0,5758 mmol; 1 eq.) hinzugegeben sowie 0,196 mL DIPEA (1,1516 mmol; 2 eq.). Der Ansatz wird bei leichtem Erhitzen (55 °C) für 3 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H_2O versetzt wodurch das Produkt ausfällt. Der präzipitierte FS wird abgesaugt. Man erhält das Produkt als braunen FS (Ausbeute: 207 mg (76 %); Reinheit: 95,2 % (254,4 nm); 92,8 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.30 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.64 – 8.59 (m, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.09 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.66 – 7.48 (m, 5H), 7.26 – 7.17 (m, 1H), 3.90 (s, 3H); DC-MS (ESI) m/z: 495.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 527.7 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$; 471.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 507.9 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

3-(4-(3-(5-Benzamid-2-fluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-97**)Summenformel: C₂₄H₁₈FN₅O₄

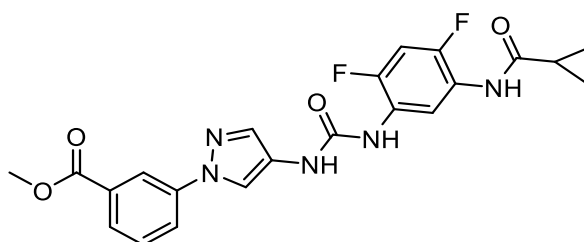
Exakte Masse: 459,13

Molekulargewicht: 459,44

Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

150 mg S-96 (0,3168 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL MeOH und 5 mL THF gelöst. Folgend werden 0,5 mL demin. H₂O sowie 1,9 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (1,9009 mmol, 6 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird bei RT 20 h gerührt. MeOH sowie THF werden am Rotationsverdampfer abgenommen. Folgend wird er Ansatz mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Hierbei fällt das Produkt aus und wird abgesaugt. Man erhält das Produkt als dunklen FS (Ausbeute: quantitativ, Reinheit: 97,1 % (254,4 nm); bei 230,0 nm nicht auswertbar).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.21 (br s, 1H), 10.30 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.67 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.60 (dd, J = 7.4, 2.5 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.05 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.83 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 15.9, 7.7 Hz, 2H), 7.56 – 7.45 (m, 3H), 7.21 (dd, J = 10.9, 9.1 Hz, 1H).

Methyl-3-(4-(3-(5-(cyclopropancarboxamid)-2,4-difluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-98**)Summenformel: C₂₂H₁₉F₂N₅O₄

Exakte Masse: 455,14

Molekulargewicht: 455,42

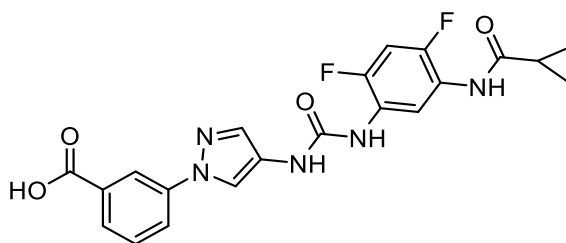
Die Synthese wird nach ASV-7b durchgeführt.

147 mg *N*-(5-Amino-2,4-difluorphenyl)cyclopropancarbamid (0,6910 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL trockenem ACN gelöst. Folgend wird der Ansatz via Eis-Wasserbad

gekühlt und 87 μL Phenylchlorformiat (0,6910 mmol; 1 eq.) sowie 56 μL Pyridin (0,6910 mmol; 1 eq.) werden zugegeben. Die Reaktion wird 30 min. gerührt, wonach die Kühlung entfernt wird und die Reaktion bei RT weiter rührt. Nachdem eine Reaktionskontrolle via DC (EtOAc/PE: 50/50) die vollständige Umsetzung zum intermediären Carbamat anzeigt (9 h), wird 150 mg S-24 (0,6910 mmol; 1 eq.) hinzugegeben sowie 0,235 mL DIPEA (1,3819 mmol; 2 eq.). Der Ansatz wird bei leichtem Erhitzen (55 $^{\circ}\text{C}$) für 14 h rühren gelassen. Das Produkt präzipitiert und wird abgesaugt und mit Et_2O gewaschen. Man erhält das Produkt als beiger FS (Ausbeute: 256 mg (81 %); Reinheit: 96,8 % (254,4 nm); 94,8 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) m/z : 478.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 454.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

3-(4-(3-(5-(Cyclopropancarboxamid)-2,4-difluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoesäure (**S-99**)



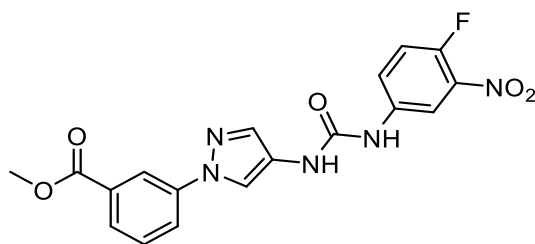
Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_4$

Exakte Masse: 441,12

Molekulargewicht: 441,39

Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

200 mg S-98 (0,4392 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL MeOH und 5 mL THF gelöst. Folgend werden 0,5 mL demin. H_2O sowie 2,635 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (2,6349 mmol, 6 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird bei RT 20 h gerührt. MeOH sowie THF werden am Rotationsverdampfer abgenommen. Folgend wird der Ansatz mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Hierbei fällt das Produkt aus und wird abgesaugt. Man erhält das Produkt welches ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wurde (Ausbeute: quant.; Reinheit: 96,5 % (254,4 nm); 93,5 % (230,0 nm)).

Methyl-3-(4-(3-(4-fluor-3-nitrophenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoat (**S-100**)Summenformel: C₁₈H₁₄FN₅O₅

Exakte Masse: 399,10

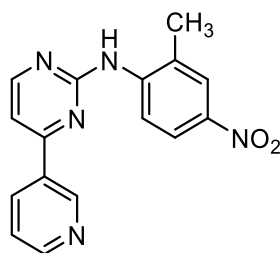
Molekulargewicht: 399,34

Die Synthese wird nach ASV-7b durchgeführt.

719 mg 4-Fluor-3-nitroanilin (4,6064 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 70 mL trockenem ACN gelöst. Folgend wird der Ansatz via Eis-Wasserbad gekühlt und 0,578 mL Phenylchlorformiat (4,6064 mmol; 1 eq.) sowie 0,372 mL Pyridin (4,6064 mmol; 1 eq.) werden zugegeben. Die Reaktion wird 30 min. gerührt, wonach die Kühlung entfernt wird und die Reaktion bei RT weiter rührt. Nachdem eine Reaktionskontrolle via DC (EtOAc/PE: 35/65) die vollständige Umsetzung zum intermediären Carbamat anzeigt (1,5 h), wird 1000 mg S-24 (4,6064 mmol; 1 eq.) hinzugegeben sowie 1,567 mL DIPEA (9,2128 mmol; 2 eq.). Der Ansatz wird bei leichtem Erhitzen (55-60 °C) für 3,5 h rühren gelassen. Nun wird der Ansatz mit Wasser versetzt, wodurch das Produkt ausfällt und abfiltriert werden kann. Man erhält das Produkt als neon-gelben FS (Ausbeute: 1651 mg (90 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.30 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.47 (dd, J = 6.6, 2.4 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.09 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.91 – 7.79 (m, 2H), 7.76 – 7.68 (m, 1H), 7.63 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.56 – 7.46 (m, 1H), 3.90 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 152.2, 149.5 (d, J = 256.6 Hz), 139.9, 136.8 (d, J = 3.0 Hz), 136.4 (d, J = 8.1 Hz), 133.7, 131.0, 130.2, 126.2, 125.6 (d, J = 7.8 Hz), 124.4, 122.1, 118.6 (d, J = 21.8 Hz), 118.1, 116.9, 114.3 (d, J = 3.1 Hz), 52.4; DC-MS (ESI) *m/z*: 421.8 [M+Na]⁺; 453.7 [M+Na+MeOH]⁺; 398.0 [M-H]⁻.

7.4.13 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.9

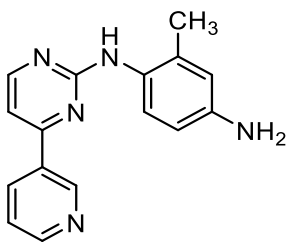
N-(2-Methyl-4-nitrophenyl)-4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (**S-101**)Summenformel: C₁₆H₁₃N₅O₂

Exakte Masse: 307,11

Molekulargewicht: 307,31

1000 mg 1-Brom-2-methyl-4-nitrobenzen (4,6290 mmol; 1 eq.) sowie 1280 mg K₂CO₃ (9,2580 mmol; 2 eq.) und 877 mg 4-(Pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (5,0919 mmol; 1,1 eq.) werden vorgelegt und in 30 mL trockenem Dioxan gelöst. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 220 mg Cu(I)I (1,1572 mmol; 0,25 eq.) sowie 0138 mL (90 %) *N,N*-Dimethylethylendiamin (1,1572 mmol; 0,25 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen und 20 h bei 100 °C erhitzt. Der Ansatz wird mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Das nicht gelöste Produkt wird abfiltriert als gelber FS. Dieser Ansatz wurde mit einem zweiten Ansatz welcher von 200 mg 1-Brom-2-methyl-4-nitrobenzen ausgeht vereinigt (Ausbeute: F1 = 400 mg (23,4 %); Reinheit 93,9 % (254,4 nm); 89,0 % (230,0 nm); Ausbeute :F2 = 280 mg (16,4 %); Reinheit: 98,9 % (254,4 nm); 97,4 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.42 (br s, 1H), 8.83 (br s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.49 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 8.30 – 8.02 (m, 3H), 7.63 (s, 2H), 6.96 (d, J = 242.7 Hz, 1H), 2.44 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.9, 159.9, 159.6, 151.6, 148.2, 144.8, 141.9, 134.4, 130.4, 125.5, 121.9, 121.7, 109.6, 18.0; DC-MS (ESI) *m/z*: 308.3 [M+H]⁺; 330.2 [M+Na]⁺; 306.2 [M-H]⁻.

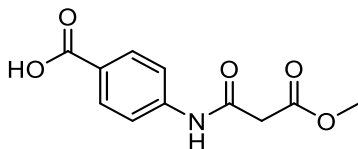
2-Methyl-*N*¹-(4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin (**S-102**)

Summenformel: C₁₆H₁₅N₅
 Exakte Masse: 277,13
 Molekulargewicht: 277,33

Die Synthese wird nach ASV-3b durchgeführt.

600 mg S-101 (1,9524 mmol; 1 eq.) wird in einem miniclave[®] Glasreaktor (Büchi) vorgelegt und in 150 mL EtOAc suspendiert. Der Reaktor wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon Gegenstrom wird 104 mg (10 %) Pd/C (0,0976 mmol (Pd); 0,05 eq.) zugegeben. Der Reaktor wird mit 7 bar H₂ beladen und über Nacht bei RT gerührt. Nach 24 h wird nach Monitoring (HPLC) der Ansatz auf 50 °C erwärmt und wiederum 24 h gerührt. Der Ansatz wird über Celite filtriert und eingeengt. Man erhält das Produkt als braun-gelben FS (Ausbeute: 481 mg (89 %); Reinheit: 97,0 % (254,4 nm); 94,1 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.22 – 9.16 (m, J = 1.2 Hz, 1H), 8.67 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.39 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.37 – 8.31 (m, 1H), 7.51 (dd, J = 8.0, 4.5 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 8.3, 2.5 Hz, 1H), 4.87 (br s, 2H), 2.07 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.1, 161.3, 159.3, 151.2, 148.0, 146.2, 134.3, 134.0, 132.4, 127.3, 126.5, 123.7, 115.4, 111.6, 106.3, 18.2.

4-(3-Methoxy-3-oxopropanamid)benzoesäure (**S-103**)

Summenformel: C₁₁H₁₁NO₅
 Exakte Masse: 237,06
 Molekulargewicht: 237,21

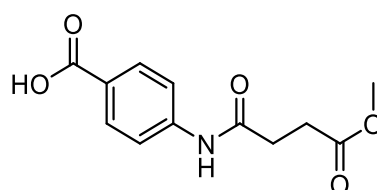
Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

500 mg 4-Aminobenzoesäure (3,6459 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL trockenem Pyridin gelöst. Bei RT wird 0,391 mL Methyl-3-Chlor-3-oxopropanoat (3,6459 mmol; 1 eq.) zugegeben und der Ansatz wird 20 h bei RT gerührt. Es wird EtOAc zum Ansatz gegeben und die organische Phase wird 2x mit (10 %) HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische

Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90 + AcOH). Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 70 mg (8 %); Reinheit: 99,7 % (254,4 nm); 91,8 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.73 (br s, 1H), 10.48 (s, 1H), 7.93 – 7.87 (m, 2H), 7.71 – 7.64 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.52 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 167.9, 166.8, 164.5, 142.7, 130.4, 125.5, 118.4, 52.0, 43.6; DC-MS (ESI) m/z : 268.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 236.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

4-(4-Methoxy-4-oxobutanamid)benzoesäure (**S-104**)



Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_5$

Exakte Masse: 251,08

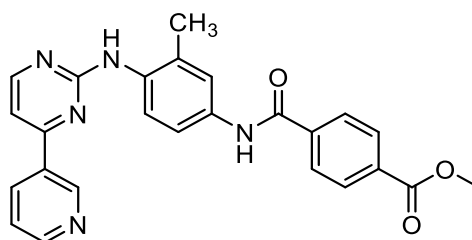
Molekulargewicht: 251,24

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

500 mg 4-Aminobenzoesäure (3,6459 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL trockenem Pyridin gelöst. Bei RT wird 0,449 mL Methyl-4-Chlor-4-oxobutanoat (3,6459 mmol; 1 eq.) zugegeben und der Ansatz wird 18 bei RT gerührt. Es wird EtOAc zum Ansatz gegeben und die organische Phase wird 2x mit (10 %) HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als braunen FS (Ausbeute: 423 mg (46 %); Reinheit: 88,7 % (254,4 nm); 81,2 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) m/z : 274.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 296.0 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$.

Methyl-4-((3-methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)benzoat (**S-105**)



Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3$

Exakte Masse: 439,16

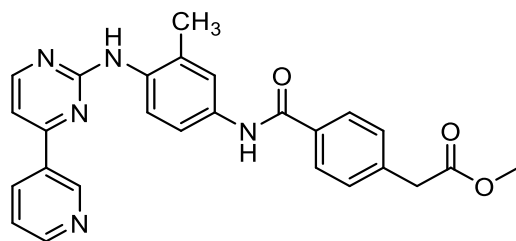
Molekulargewicht: 439,48

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

80 mg S-102 (0,2885 mmol; 1 eq.), 52 mg 4-(Methoxycarbonyl)benzoesäure (0,2885 mmol; 1 eq.) sowie 111 mg EDC·HCl (0,5769 mmol; 2 eq.) und 103 mg HOBt Monohydrat (0,5769 mmol; 2 eq.) (enthält 14 wt.% Wasser) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM suspendiert. Folgend werden 147 μ L DIPEA (0,8654 mmol; 3 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird für 24 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt. Die organische Phase wird 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NH₄Cl (aq.)-Lösung sowie 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der entstehende FS wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90). Man erhält das Produkt als gelbe Kristalle (Ausbeute: 53 mg (42 %); Reinheit: 98,3 % (254,4 nm); 98,9 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.37 (s, 1H), 9.24 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.69 (dd, *J* = 4.7, 1.3 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.42 – 8.36 (m, 1H), 8.10 (s, 4H), 7.67 (s, 1H), 7.64 – 7.59 (m, 1H), 7.54 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.26 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 164.4, 161.5, 161.3, 159.4, 151.3, 148.1, 139.1, 135.4, 134.2, 133.9, 132.8, 132.2, 131.9, 129.1, 128.0, 125.6, 123.8, 122.3, 118.3, 107.3, 52.4, 18.4; DC-MS (ESI) *m/z*: 462.4 [M+Na]⁺; 438.5 [M-H]⁻.

Methyl-2-(4-((3-methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)acetat (**S-106**)



Summenformel: C₂₆H₂₃N₅O₃

Exakte Masse: 453,18

Molekulargewicht: 453,50

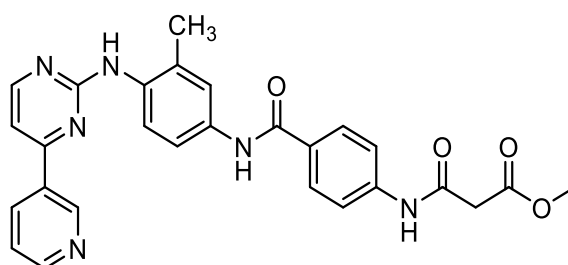
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

80 mg S-102 (0,2885 mmol; 1 eq.), 56 mg 4-(2-Methoxy-2-oxoethyl)benzoesäure (0,2885 mmol; 1 eq.) sowie 111 mg EDC·HCl (0,5769 mmol; 2 eq.) und 103 mg HOBt Monohydrat (0,5769 mmol; 2 eq.) (enthält 14 wt.% Wasser) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM suspendiert. Es wird 147 μ L DIPEA (0,8654 mmol; 3 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt. Die organische Phase wird 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NH₄Cl (aq.)-Lösung sowie 1x mit

ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Der entstehende FS wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90). Man erhält das Produkt als gelber FS (Ausbeute: quantitativ; Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 99,0 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.16 (s, 1H), 9.24 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.69 (dd, J = 4.7, 1.5 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.42 – 8.37 (m, 1H), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.64 (s, 3H), 2.25 (s, 3H); ¹³C: NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.2, 165.0, 161.5, 161.4, 159.4, 151.3, 148.1, 137.9, 135.7, 134.2, 133.6, 133.5, 132.8, 132.2, 129.4, 127.7, 125.6, 123.8, 122.2, 118.2, 107.3, 51.8, 39.9, 18.4.; DC-MS (ESI) *m/z*: 476.4 [M+Na]⁺; 452.5 [M-H]⁻.

Methyl-3-((4-((3-methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)amino)-3-oxopropanoat (**S-107**)



Summenformel: C₂₇H₂₄N₆O₄

Exakte Masse: 496,19

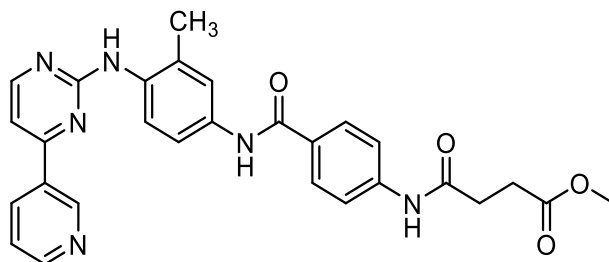
Molekulargewicht: 496,53

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

65 mg S-102 (0,2344 mmol; 1 eq.), 56 mg S-103 (0,2344 mmol; 1 eq.) sowie 90 mg EDC·HCl (0,4688 mmol; 2 eq.) und 83 mg HOBt Monohydrat (0,4688 mmol; 2 eq.) (enthält 14 wt.% Wasser) werden vorgelegt und in 12 mL trockenem DCM suspendiert. Folgend werden 120 µL DIPEA (0,7031 mmol; 3 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird für 16 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt. Die organische Phase wird 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NH₄Cl (aq.)-Lösung sowie 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Der entstehende FS wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90). Man erhält das Produkt als gelblichen FS (Ausbeute: quantitativ; Reinheit: 87,9 % (254,4 nm); 79,9 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) *m/z*: 519.2 [M+Na]⁺; 495.3 [M-H]⁻.

Methyl-4-((4-((3-methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)amino)-4-oxobutanoat (**S-108**)



Summenformel: $C_{28}H_{26}N_6O_4$

Exakte Masse: 510,20

Molekulargewicht: 510,55

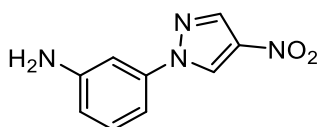
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

80 mg S-102 (0,2885 mmol; 1 eq.), 81 mg S-104 (0,2885 mmol; 1 eq.; 90 % Reinheit) sowie 111 mg EDC·HCl (0,5769 mmol; 2 eq.) und 103 mg HOBt Monohydrat (0,5769 mmol; 2 eq.) (enthält 14 wt.% Wasser) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM suspendiert. Folgend werden 147 μ L DIPEA (0,8654 mmol; 3 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird für 20 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt. Die organische Phase wird 1x mit ges. NaHCO_3 (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NH_4Cl (aq.)-Lösung sowie 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Der entstehende FS wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 8/92). Man erhält das Produkt als gelblichen FS (Ausbeute: 40 mg (27 %); Reinheit: 98,2 % (254,4 nm); 89,4 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) m/z : 533.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 509.6 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

7.4.14 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.10

3-(4-Nitro-1H-pyrazol-1-yl)anilin (**S-109**)



Summenformel: $C_9H_8N_4O_2$

Exakte Masse: 204,06

Molekulargewicht: 204,19

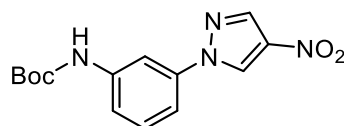
Die Synthese wird nach ASV-1 durchgeführt.

3000 mg 4-Nitropyrazol (26,53 mmol; 1 eq.) sowie 5477 mg 3-Bromanilin (31,84 mmol, 1,2 eq.) und 10999 mg K_2CO_3 (79,59 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt und in 150 mL DMF suspendiert. Der Ansatz wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon

Gegenstrom wird 505 mg Cu(I)I (2,65 mmol; 0,1 eq.) sowie 0,837 mL *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexane-1,2-diamine (5,31 mmol; 0,2 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, auf 100 °C erhitzt und für 20 h gerührt. Die Reaktion wird mit demin. H₂O versetzt. Ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Wasser und Et₂O gewaschen. Der FS wird im Umluftofen getrocknet, wodurch man das Produkt als grün-goldene Nadeln erhält (Ausbeute: 2225 mg (41 %); Reinheit: 99,6 % (254,4 nm); 99,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.44 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.16 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.02 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 6.61 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150.0, 139.2, 136.5, 136.5, 130.0, 127.7, 113.7, 106.3, 104.6; DC-MS (ESI) *m/z*: 205.3 [M+H]⁺; 203.1 [M-H]⁻.

tert-Butyl-(3-(4-nitro-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)carbammat (**S-110**)



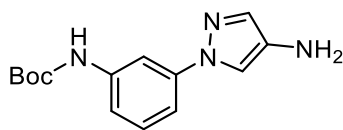
Summenformel: C₁₄H₁₆N₄O₄

Exakte Masse: 304,12

Molekulargewicht: 304,31

1800 mg S-109 (8,82 mmol; 1 eq.) sowie 1924 mg Di-*tert*-butyldicarbonat (8,82 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt und in 40 mL *t*-BuOH suspendiert. Die Reaktion wird auf 40-50 °C für 20 h erwärmt. Folgend wird der Ansatz mit EtOAc versetzt. Die organische Phase wird 2x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/PE: 10/90 – 35/65). Man erhält ein gelb-oranges Öl. Unter Kühlung bilden sich Kristalle, welche abfiltriert und mit Pentan gewaschen werden. Man erhält so das Produkt als weiß-graue Brocken (Ausbeute: 1875 mg (70 %); Reinheit: 98,7 % (254,4 nm); 99,2 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.67 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.56 – 7.50 (m, 1H), 7.45 – 7.39 (m, 2H), 1.49 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.7, 140.8, 138.7, 136.8, 136.7, 129.9, 128.1, 117.7, 112.8, 109.4, 79.6, 28.1; DC-MS (ESI) *m/z*: 327.1 [M+Na]⁺, 303.0 [M-H]⁻.

tert-Butyl-(3-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)carbamat (**S-111**)Summenformel: C₁₄H₁₈N₄O₂

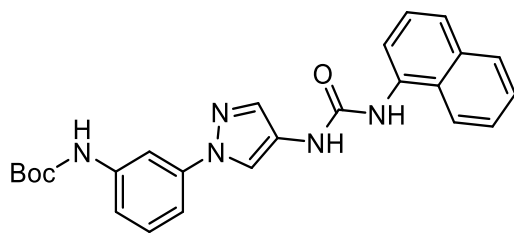
Exakte Masse: 274,14

Molekulargewicht: 274,32

Die Synthese wurde nach ASV-3a durchgeführt.

1490 mg S-110 (4,90 mmol; 1 eq.) sowie 1367 mg Fe(0)-Pulver (24,48 mmol; 5 eq.) und 1310 mg NH₄Cl (24,48 mmol; 5 eq.) werden vorgelegt und in 40 mL EtOH:H₂O (3:1) suspendiert. Die Reaktion wird 1h auf 60°C erhitzt. Nach dem Erkalten der Mischung wird der Ansatz über Celite filtriert. Die alkoholischen Komponente wird abgenommen und die entstehende Suspension wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 2x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt und via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 3/97 – 10/90).. Man erhält das Produkt als roten FS (Ausbeute: 1020 mg (76 %); Reinheit: 97,1 % (254,4 nm); 95,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.47 (s, 1H), 7.99 – 7.88 (m, 1H), 7.55 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.31 – 7.16 (m, 4H), 4.18 (br s, 2H), 1.48 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.7, 140.5, 140.4, 133.5, 132.5, 129.5, 114.5, 112.0, 110.6, 106.9, 79.2, 28.1; DC-MS (ESI) *m/z*: 297.2 [M+Na]⁺.

tert-Butyl-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)carbamat (**S-112**)Summenformel: C₂₅H₂₅N₅O₃

Exakte Masse: 443,20

Molekulargewicht: 443,51

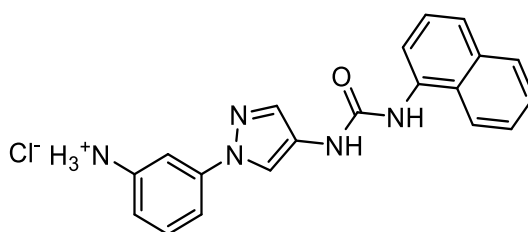
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

1725 mg S-111 (6,288 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 80 mL trockenem DCM gelöst. 0,904 mL 1-Naphthylisocyanat (6,288 mmol; 1 eq.) wird via Spritze langsam zugegeben. Die Reaktion wird für 72 h bei RT rühren gelassen, wobei das Produkt präzipitiert. Der FS

wird abfiltriert und mit DCM und Pentan gewaschen. Man erhält das Produkt als weiß-pinken FS (Ausbeute: 2325 mg (83 %); Reinheit: 99,7 % (254,4 nm); 99,0 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.55 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.57 (dt, $J = 14.6, 7.0$ Hz, 2H), 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.39 – 7.28 (m, 3H), 1.49 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.8, 152.7, 140.7, 140.2, 134.4, 133.8, 132.6, 129.7, 128.4, 126.1, 125.9, 125.7, 124.5, 123.0, 121.4, 117.5, 116.1, 115.4, 111.3, 107.5, 79.3, 28.1; DC-MS (ESI) m/z : 466.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 442.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 478.2 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzenaminiumchlorid (**S-113**)



Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}$

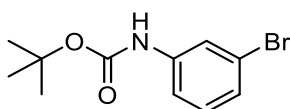
Exakte Masse: 379,12

Molekulargewicht: 379,85

Die Synthese wird nach ASV-8 durchgeführt.

1000 mg S-112 (2,2547 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 30 mL EtOH gelöst. Folgend wird 9 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (11,2737 mmol; 5 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 20 h auf 50-60°C erwärmt, wobei das Produkt präzipitiert. Der FS wird abfiltriert und mit Pentan gewaschen. Man erhält das Produkt als weiß-grauen FS (Ausbeute: 687 mg (80 %); Reinheit: 99,9 % (254,4 nm); 99,9 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.69 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.85 (s, 2H), 7.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.59 – 7.51 (m, 3H), 7.46 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.14 (br s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.0, 140.6, 134.7, 134.6, 133.8, 133.3, 130.9, 128.3, 125.9, 125.8, 125.6, 125.1, 122.7, 121.8, 119.3, 116.9, 116.0, 115.7, 111.8; DC-MS (ESI) m/z : 365.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 397.9 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$; 341.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 377.8 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

tert-Butyl-(3-bromphenyl)carbamate (**S-114**)Summenformel: C₁₁H₁₄BrNO₂

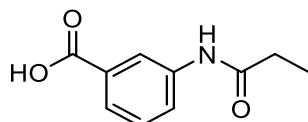
Exakte Masse: 271,02

Molekulargewicht: 272,14

1000 mg 3-Bromanilin (5,8129 mmol; 1 eq.) sowie 1269 mg Di-*tert*-butyldicarbonat (5,8129 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt und in 20 mL *t*-BuOH gelöst. Der Ansatz wird über Nacht auf 40-50°C erhitzt. Es wird 20 mL MeOH zur Reaktion gegeben. Die alkoholische Komponente wird abgenommen und der Rückstand wird in EtOAc wieder aufgenommen. Die organische Phase wird 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Man erhält das Produkt als braune Kristalle (Ausbeute: 1532 mg (97 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 99,9 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.55 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.41 – 7.35 (m, 1H), 7.20 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (ddd, J = 7.9, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.6, 141.2, 130.6, 124.6, 121.6, 120.2, 116.9, 79.6, 28.0.

7.4.15 Synthese der Vorstufen zu Kapitel 3.10.1

3-Propionamidbenzoesäure (**S-115**)Summenformel: C₁₀H₁₁NO₃

Exakte Masse: 193,07

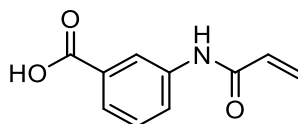
Molekulargewicht: 193,20

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

400 mg 3-Aminobenzoesäure (2,917 mmol; 1 eq.) werden in 8 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Reaktion wird via Aceton-Eisbad gekühlt. 255 µL Propionylchlorid (2,917 mmol; 1 eq.) wird langsam zugegeben. Die Reaktion wird langsam auf RT aufgewärmt und 4 d auf RT rühren gelassen. Folgend wird die Reaktion mit EtOAc verdünnt und mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Die Lösung wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Das *crude* Produkt wurde via Umkehrphasen-Flash-Chromatographie aufgereinigt (ACN/H₂O: 5/95 – 100/00 + 0,1 % TFA). Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 405 mg (80 %); Reinheit: 99,8 % (254,4 nm); 99,7 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.91 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.1$, 1.0 Hz, 1H), 7.64 – 7.54 (m, 1H), 7.40 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.33 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.2, 167.2, 139.6, 131.2, 128.9, 123.7, 123.1, 119.8, 29.5, 9.6; DC-MS (ESI) m/z : 238.0 $[\text{M}+2\text{Na-H}]^+$; 270.0 $[\text{M}+2\text{Na-H}+\text{MeOH}]^+$, 192.0 $[\text{M-H}]^-$.

3-Acrylamidbenzoesäure (**S-116**)



Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_3$

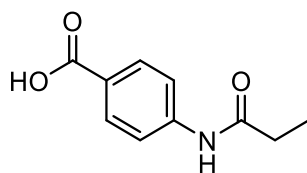
Exakte Masse: 191,06

Molekulargewicht: 191,19

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

300 mg 3-Aminobenzoesäure (2,188 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 2,5 mL trockenem DMF gelöst. Folgend wird 150 μL Pyridin (1,859 mmol; 0,85 eq.) zugegeben und die Reaktion wird via Eis-Wasserbad gekühlt. Es wird 178 μL Acryloylchlorid (2,188 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird 5 min unter Kühlung rühren gelassen, wonach die Kühlung entfernt und die Reaktion 2 h bei RT gerührt wird. Der Ansatz wird auf demin. H_2O gegeben, welches mit HCl (aq.)-Lösung angesäuert wurde. Die entstehende Suspension wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und eingengt. Das *crude* Produkt wird in ACN suspendiert und die entstehende Suspension wird abfiltriert, um das Produkt als weißen FS zu erhalten (Ausbeute: 188 mg (50 %); Reinheit: 94,6 % (254,4 nm); 91,8 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.97 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.29 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.91 (ddd, $J = 8.1$, 2.1, 1.0 Hz, 1H), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.45 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.43 (dd, $J = 17.0$, 10.1 Hz, 1H), 6.28 (dd, $J = 17.0$, 2.0 Hz, 1H), 5.78 (dd, $J = 10.0$, 2.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 167.1, 163.3, 139.2, 131.7, 131.3, 129.1, 127.3, 124.3, 123.4, 120.1; DC-MS (ESI) m/z : 236.0 $[\text{M}+2\text{Na-H}]^+$.

4-Propionamidbenzoesäure (**S-117**)Summenformel: C₁₀H₁₁NO₃

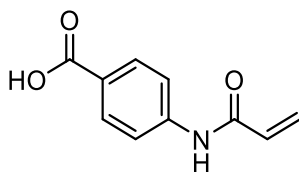
Exakte Masse: 193,07

Molekulargewicht: 193,20

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

400 mg 4-Aminobenzoesäure (2,917 mmol; 1 eq.) werden in 8 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Reaktion wird via Aceton-Eisbad gekühlt. 255 µL Propionylchlorid (2,917 mmol; 1 eq.) wird langsam zugegeben. Die Reaktion wird langsam auf RT aufgewärmt und 4 d auf RT rühren gelassen. Folgend wird die Reaktion mit EtOAc verdünnt und mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt. Die Lösung wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Das *crude* Produkt wurde via Umkehrphasen-Flash-Chromatographie aufgereinigt (ACN/H₂O: 8/92 – 100/00 + 0,1 % TFA). Man erhält das Produkt als weiße Kristalle (Ausbeute: 372 mg (73 %); Reinheit: 99,7 % (254,4 nm); 96,9 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.66 (br s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 2.35 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.08 (t, J = 7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.5, 167.0, 143.4, 130.4, 124.8, 118.2, 29.6, 9.5; DC-MS (ESI) *m/z*: 238.0 [M+2Na-H]⁺; 191.6 [M-H]⁻.

4-Acrylamidbenzoesäure (**S-118**)Summenformel: C₁₀H₉NO₃

Exakte Masse: 191,06

Molekulargewicht: 191,19

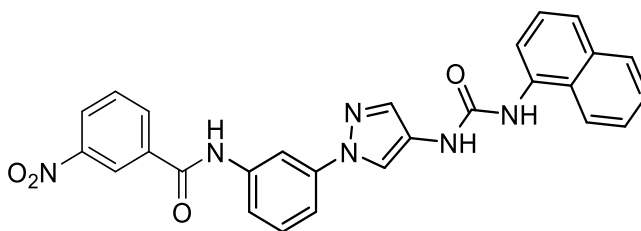
Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

400 mg 4-Aminobenzoesäure (3,646 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF gelöst. Folgend wird 250 µL Pyridin (3,099 mmol; 0,85 eq.) zugegeben und die Reaktion wird via Aceton-Icebad gekühlt. Es wird 297 µL Acryloylchlorid (3,646 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird 16 h rühren gelassen, wodurch sich der Ansatz langsam auf

RT erwärmt. Der Ansatz wird auf demin. H₂O gegeben, welches mit HCl (aq.)-Lösung angesäuert wurde. Die entstehende Suspension wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird, über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und eingeengt. Verbleibendes DMF wird azeotropisch mit Toluol abdestilliert. Der Rückstand wird mit Et₂O gewaschen und via Umkehrphasen-Flash-Chromatographie aufgereinigt (ACN/H₂O: 10/90 – 55/45 + 0,1 % TFA). Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: 357 mg (57 %); Reinheit: 100 % (254,4 nm); 100 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.72 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 7.98 – 7.87 (m, 2H), 7.82 – 7.73 (m, 2H), 6.46 (dd, J = 17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.30 (dd, J = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.80 (dd, J = 10.1, 2.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.9, 163.5, 143.0, 131.6, 130.4, 127.7, 125.4, 118.7; DC-MS (ESI) *m/z*: 236.0 [M+2Na-H]⁺; 268.1 [M+2Na-H+MeOH]⁺; 190.0 [M-H]⁻.

N-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)-3-nitrobenzamid (**S-119**)



Summenformel: C₂₇H₂₀N₆O₄

Exakte Masse: 492,15

Molekulargewicht: 492,50

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

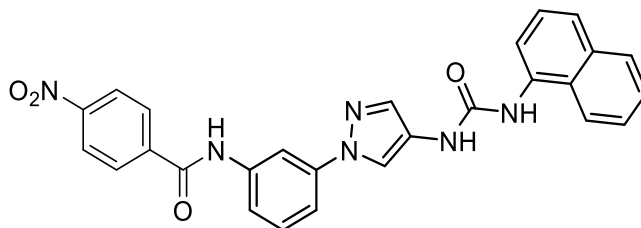
150 mg S-113 (0,3949 mmol; 1 eq.) wird in 12 mL trockenem Pyridin gelöst. unter Eis-Wasserkühlung wird 73 mg *m*-Nitrobenzoesäurechlorid (0,3949 mmol; 1 eq.) zugegeben. Nach 10 min wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird insgesamt 66 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen sowie 1x gegen ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt. Man erhält das Produkt als beige-gelben FS (Ausbeute: 105 mg (54 %); Reinheit: 96,2 % (254,4 nm); 96,8 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.75 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.85 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.53 – 8.41 (m, 3H), 8.33 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.90 – 7.82 (m, 2H), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.67 – 7.52 (m, 4H), 7.49 (td, J = 8.0, 3.4 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.5, 152.9, 147.8, 140.1, 139.8, 136.1, 134.5, 134.3, 133.8, 132.8, 130.3, 129.9, 128.4, 126.4, 126.0,

Experimenteller Teil

125.9, 125.7, 124.7, 123.0, 122.5, 121.5, 117.5, 117.4, 116.1, 113.2, 109.9; DC-MS (ESI) m/z : 493.3 $[M+H]^+$; 515.2 $[M+Na]^+$; 491.2 $[M-H]^-$.

N-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)phenyl)-4-nitrobenzamid (**S-120**)



Summenformel: $C_{27}H_{20}N_6O_4$

Exakte Masse: 492,15

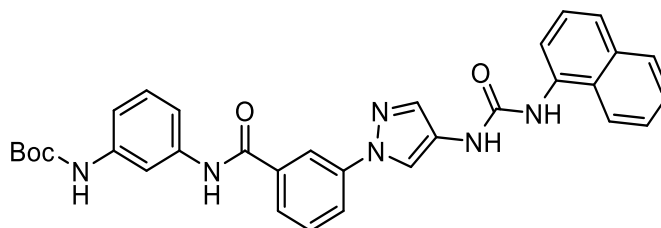
Molekulargewicht: 492,50

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

150 mg S-113 (0,3949 mmol; 1 eq.) wird in 12 mL trockenem Pyridin gelöst. unter Eiskühlung wird 73 mg *p*-Nitrobenzoesäurechlorid (0,3949 mmol; 1 eq.) zugegeben. Nach 10 min wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird insgesamt 66 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen sowie 1x gegen ges. $NaHCO_3$ (aq.)-Lösung. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Man erhält das *crude* Produkt als gelben FS (Ausbeute: quant.; Das Produkt wird *crude* im nächsten Schritt eingesetzt).

DC-MS (ESI) m/z : 493.3 $[M+H]^+$; 491.2 $[M-H]^-$.

tert-Butyl-(3-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid)phenyl)carbammat (**S-121**)



Summenformel: $C_{32}H_{30}N_6O_4$

Exakte Masse: 562,23

Molekulargewicht: 562,63

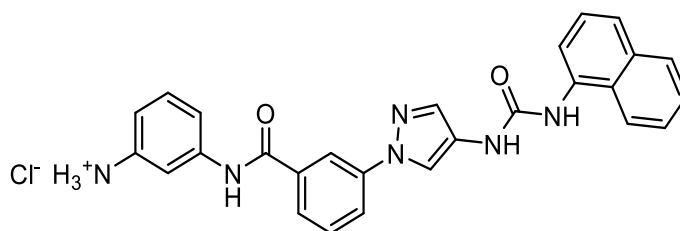
Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

350 mg P-35 (0,9399 mmol; 1 eq.) sowie 215 mg *tert*-Butyl(3-aminophenyl)carbammat (1,0339 mmol; 1,1 eq.) und 715 mg HATU (1,8798 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt. Folgend wird der Ansatz in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Es wird 0,560 ml DIPEA (3,2897 mmol; 3,5 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird 18 h bei RT gerührt. Danach wird demin. H_2O

zum Ansatz gegeben. Das Präzipitat wird abgesaugt und mit Et₂O gewaschen. Das trockene Produkt wird mit MeOH aufgeschlämmt und wieder abgesaugt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 1/99 – 10/90). Man erhält das Produkt als bräunlicher FS (Ausbeute: 267 mg (51 %); Reinheit: 99,6 % (254,4 nm); 98,8 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) m/z : 585.3 [M+Na]⁺; 561.4 [M-H]⁻; 597.3 [M+Cl]⁻.

3-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid)benzenaminiumchlorid
(S-122)



Summenformel: C₂₇H₂₃ClN₆O₂

Exakte Masse: 498,16

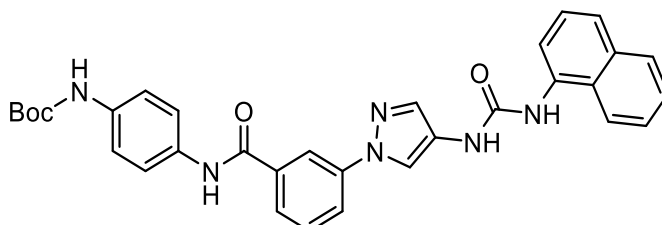
Molekulargewicht: 498,97

Die Synthese wird nach ASV-8 durchgeführt.

258 mg S-121 (0,4586 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 13 mL EtOH suspendiert. Folgend wird 2,018 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (2,5221 mmol; 5,5 eq.) zugegeben und der Ansatz wird für 28 h auf 60°C erhitzt. Das Lösemittel wird abgenommen. Man erhält das Produkt als weißlichen Feststoff (Ausbeute: 214 mg (94 %); Reinheit: 98,2 % (254,4 nm); 97,8 % (230,0 nm)).

DC-MS (ESI) m/z : 485.4 [M+Na]⁺; 461.5 [M-H]⁻; 497.4 [M+Cl]⁻.

tert-Butyl-(4-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid)phenyl)carbamate (S-123)



Summenformel: C₃₂H₃₀N₆O₄

Exakte Masse: 562,23

Molekulargewicht: 562,63

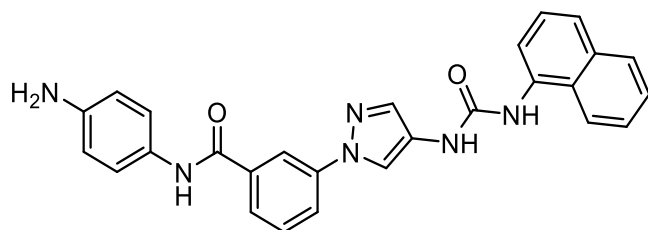
Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

Experimenteller Teil

350 mg P-35 (0,9399 mmol; 1 eq.) sowie 196 mg *tert*-Butyl(4-aminophenyl)carbamat (0,9399 mmol; 1 eq.) und 1072 mg HATU (2,8197 mmol; 3 eq.) werden vorgelegt. Folgend wird der Ansatz in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Es wird 0,559 ml DIPEA (3,2897 mmol; 3,5 eq.) zugegeben. Der Ansatz wird 18 h bei RT gerührt. Danach wird demin. H₂O zum Ansatz gegeben. Das Präzipitat wird abgesaugt und mit Et₂O gewaschen. Das trockene Produkt wird mit DCM aufgeschlämmt und wieder abgesaugt. Man erhält einen dunkel-braunen FS (Ausbeute: 143 mg; Das Produkt wird *crude* im nächste Schritt eingesetzt).

DC-MS (ESI) *m/z*: 585.3 [M+Na]⁺; 561.4 [M-H]⁻; 597.3 [M+Cl]⁻.

N-(4-Aminophenyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**S-124**)



Summenformel: C₂₇H₂₂N₆O₂

Exakte Masse: 462,18

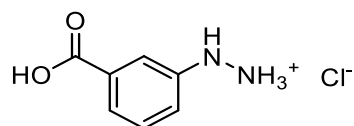
Molekulargewicht: 462,51

Die Synthese wird nach ASV-8 durchgeführt.

135 mg S-123 (0,2399 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 14 mL EtOH suspendiert. Es wird 1 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung zugegeben und der Ansatz wird für 20 h auf 60 °C erhitzt. Folgend wird erneut 1 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung zugegeben und 24 h erhitzt. Da immer noch keine vollständige Umsetzung zu erkennen ist wird erneut 1,5 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung zugegeben und erneut bei 60 °C für 72 h gerührt. Das Lösemittel wird abgenommen. Man erhält das Produkt als beigen Feststoff (Ausbeute: 54 mg mg (49 %); Reinheit: 94,8 % (254,4 nm); 230,0 nm nicht auswertbar)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.05 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.12 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.02 (dd, J = 17.2, 7.2 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.82 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.68 – 7.53 (m, 4H), 7.52 – 7.44 (m, 1H), 7.39 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 6.57 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.95 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.9, 152.8, 145.4, 139.7, 136.6, 134.4, 133.7, 133.2, 129.6, 128.4, 127.9, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 124.7, 123.0, 122.4, 121.4, 120.3, 117.3, 116.5, 116.5, 113.7; DC-MS (ESI) *m/z*: 485.3 [M+Na]⁺; 461.2 [M-H]⁻; 497.3 [M+Cl]⁻.

7.4.16 Sonstige Vorstufen

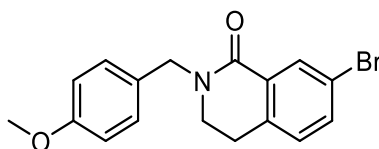
2-(3-Carboxyphenyl)hydrazin-1-iumchlorid (**Z-1**)Summenformel: C₇H₉ClN₂O₂

Exakte Masse: 188,04

Molekulargewicht: 188,61

2000 mg 3-Aminobenzoesäure (14,5932 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt. Diese wird in 30 mL konz. HCl (aq.)-Lösung suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-NaCl-Bad gekühlt auf 0-(-5 °C) Innentemperatur. Über einen Tropftrichter werden tropfenweise 1208 mg NaNO₂ (17,5119 mmol; 1,2 eq.) gelöst in 12 mL demin H₂O zum Ansatz gegeben, wobei die Innentemperatur 5 °C nicht übersteigt. Nach vollständiger Zugabe wird die entstehende Lösung bei 0-(-5 °C) 1 h gerührt. Folgend wird 9878 mg SnCl₂ (Dihydrat) (43,7796 mmol; 3 eq.) gelöst in 12 mL konz. HCl (aq.)-Lösung via Tropftrichter zugetropft, wobei die Innentemperatur 5 °C nicht übersteigt. Die entstehende Suspension wird 3 h bei 0- (-10 °C) gerührt. Die Suspension wird abfiltriert und mit wenig demin. H₂O sowie Et₂O nachgewaschen. Das Produkt wird im Vakuumofen getrocknet, zerkleinert und erst mit konz. HCl (aq.)-Lösung, demin H₂O und Et₂O gewaschen (F-1). Aus der Mutterlauge fällt weiteres Produkt aus (F-2). Man erhält das Produkt als weiß-grauen FS (Ausbeute: F-1 = 1568 mg; F-2 = 587 mg; 2155 mg (73 %); Reinheit F-1: 84,2 % (254,4 nm); 88,4 % (230,0 nm); Reinheit F-2: 94,5 % (254,4 nm); 96,9 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.87 (br s, 1H), 10.43 (br s, 3H), 8.57 (br s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.50 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.1, 145.9, 131.5, 129.1, 122.1, 118.7, 114.7.

7-Brom-2-(4-methoxybenzyl)-3,4-dihydroisochinolin-1(2H)-on (**Z-2**)Summenformel: C₁₇H₁₆BrNO₂

Exakte Masse: 345,04

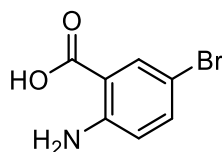
Molekulargewicht: 346,22

100 mg 7-Brom-3,4-dihydroisochinolin-1(2H)-one (0,4423 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt. Das Edukt wird in 10 mL trockenem DMF gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, und mittels Ballon wird eine N₂-Atmosphäre aufgebaut. Folgend wird 19 mg (60 wt.% in Silikonöl) NaH (0,4866 mmol; 1,1 eq.) zugegeben. Die Kühlung wird entfernt und der Ansatz

Experimenteller Teil

wird 30 min rühren gelassen. Es wird 84 μL 4-Methoxybenzylchlorid (0,6193 mmol; 1,4 eq.) zugegeben und der Ansatz wird für 10 min bei RT gerührt. Folgend wird der Ansatz auf 45-55 °C erhitzt und 60 min gerührt. Es wird 0,5 M NaOH (aq.)-Lösung zugegeben und der Ansatz wiederum 30 min rühren gelassen, wobei Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert und mit demin. H_2O sowie Pentan gewaschen. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 78 mg (51 %); Reinheit: 100,0 % (254,4 nm); 99,3 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.99 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J = 8.6$ Hz, 3H), 6.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.63 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.45 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.90 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.0, 158.5, 137.9, 134.2, 131.1, 129.8, 129.8, 129.3, 129.1, 119.6, 114.0, 55.0, 49.1, 44.8, 26.7; DC-MS (ESI) m/z : 368.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 400.0 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$.

2-Amino-5-brombenzoesäure (**Z-3**)

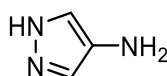
Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_6\text{BrNO}_2$

Exakte Masse: 214,96

Molekulargewicht: 216,03

10000 mg Anthranilsäure (72,9182 mmol; 1 eq.) und 7142 mg NH_4Br (72,9182 mmol; 1 eq.) werden vorgelegt. Die Edukte werden in 73 mL Eisessig gelöst und auf 10 °C gekühlt (LM friert ein). Folgend wird 7,448 mL (30 %) H_2O_2 (aq.)-Lösung (72,9182 mmol; 1 eq.) langsam zugegeben (LM taut auf). Der Ansatz wird langsam auf RT erwärmt. Insgesamt wird der Ansatz 20 h rühren gelassen, wobei das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abgesaugt und in $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) umkristallisiert. Man erhält das Produkt als gelblich, beige Nadeln (Ausbeute: 8318 mg (53 %); Reinheit: 99,7 % (254,4 nm); 99,6 % (230,0 nm)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.75 (br s, 3H), 7.75 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 8.9$, 2.5 Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168.4, 150.6, 136.1, 132.8, 118.7, 111.1, 104.6; DC-MS (ESI) m/z : 260.0 $[\text{M}+2\text{Na-H}]^+$; 214.0 $[\text{M-H}]^-$.

1H-Pyrazol-4-amin (**Z-4**)

Summenformel: $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3$

Exakte Masse: 83,05

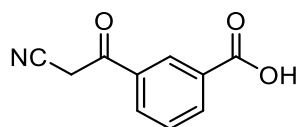
Molekulargewicht: 83,09

Die Synthese wird nach ASV-3b durchgeführt.

In einem miniclave® Glasreaktor (Büchi) vorgelegt werden 5000 mg 1*H*-Pyrazol-4-amin (44,2165 mmol; 1 eq.) sowie 706 mg (10 %) Pd/C (0,06632 mmol (Pd); 0,0015 eq.). Es wird 150 mL EtOH zugegeben. Der Reaktor wird 3x evakuiert und mit Arg wieder begast. Folgend wird der Reaktor mit 6 bar H₂ beladen. Der Ansatz wird über Nacht bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung der Nitroverbindung wird der Ansatz über Celite filtriert und das Lösemittel wird abgenommen. Das Produkt wird in DCM wieder aufgenommen und durch Zugabe von Pe unter schallen gefällt. Das Produkt wird abgesaugt. Man erhält das Produkt als pink-weißes Pulver (Ausbeute: 3381 mg (92 %); Reinheit: HPLC-Methode ungeeignet für Reinheitsbestimmung).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.95 (br s, 1H), 7.00 (s, 2H), 3.61 (br s, J = 110.9 Hz, 2H); DC-MS (ESI) *m/z*: 82.0 [M-H]⁻; 118.2 [M+Cl]⁻.

3-(2-Cyanoacetyl)benzoesäure (**Z-5**)



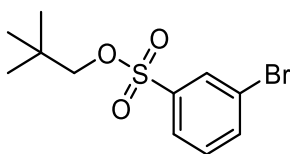
Summenformel: C₁₀H₇NO₃

Exakte Masse: 189,04

Molekulargewicht: 189,17

44 mL trockenes ACN (83,2593 mmol, 1,5 eq.) wird vorgelegt und in 100 mL trockenem THF dispergiert. Der Ansatz wird mit Argon begast und unter Eis-Wasserbad-Kühlung wird 4993 mg (60 wt.% in Silikonöl) NaH (124,8890 mmol; 2,25 eq.) zugegeben. Folgend wird der Ansatz für 30 min. unter Kühlung rühren gelassen. 10000 mg Monomethylisophthalat (55,5062 mmol; 1 eq.) wird spatelweise zugegeben. Der Ansatz wird langsam erwärmt (aufgrund der schlechten Löslichkeit von NaH im LM-Gemisch springt die Reaktion schlagartig an und das Gemisch beginnt zu sieden). Der Ansatz wird 24h zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt und 10 mL (10 %) HCl (aq.)-Lösung wird zugegeben sowie demin. H₂O. Der Ansatz wird 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Das *crude* Produkt wird in alkoholischen LM umkristallisiert (MeOH:H₂O & EtOH). Man erhält das Produkt als gelb-weiße Nadeln (Ausbeute: 2040 mg (19 %); Reinheit: 99,5 % (254,4 nm); 97,4 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.36 (br s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.23 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.70 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.84 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 189.3, 166.5, 135.0, 134.5, 132.5, 131.5, 129.5, 129.0, 115.8, 30.3; DC-MS (ESI) *m/z*: 233.9 [M+2Na-H]⁺; 188.1 [M-H]⁻.

Neopentyl-3-brombenzensulfonat (**Z-6**)Summenformel: C₁₁H₁₅BrO₃S

Exakte Masse: 305,99

Molekulargewicht: 307,20

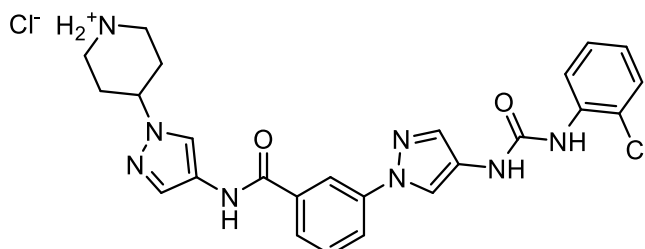
345 mg *neo*-Pentanol (3,9137 mmol; 2 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL trockenem Pyridin gelöst. Folgend wird der Ansatz via Eis-Wasserbad gekühlt und 282 μ L 3-Brombenzoesulfonsäurechlorid (1,9569 mmol; 1 eq.) werden langsam in Portionen zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wird die Kühlung entfernt. Der Ansatz wird 48 h bei RT rühren gelassen. Der Ansatz wird mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung sowie 2x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Im Kühlschrank wird das Produkt als weißer kristalliner Feststoff fest (Ausbeute: 471 mg (78 %); Reinheit: nicht bestimmbar (254,4 nm); 99,6 % (230,0 nm)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.04 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.01 (ddd, J = 8.0, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 7.93 (ddd, J = 7.9, 1.7, 1.0 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 0.84 (s, 9H);
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 137.2, 137.2, 132.0, 129.8, 126.7, 122.5, 80.1, 31.4, 25.5.

7.5 Synthesevorschriften (Endstufen):

7.5.1 Synthese der in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Testverbindungen

4-(4-(3-(4-(3-(2-Chlorphenyl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid)-1H-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**A-1**)



Summenformel: $C_{25}H_{26}Cl_2N_8O_2$

Exakte Masse: 540,16

Molekulargewicht: 541,44

Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 101 mg S-6 (0,223 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 12 mL trockenem DCM gelöst. 27 μ L 2-Chlorphenylisocyanat (0,223 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 22 h bei RT rühren gelassen. Aufgrund von unvollständiger Umsetzung werden weitere 10 μ L 2-Chlorphenylisocyanat zugegeben und der Ansatz 24 h weiter gerührt. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 3/97 – 10/90).

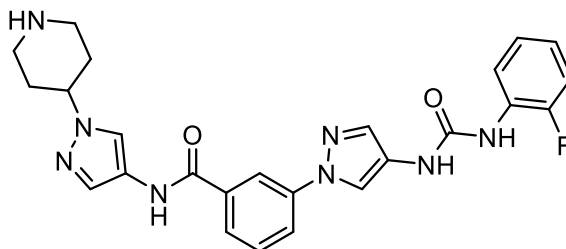
Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 0,9 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,118 mmol; 5 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 22 h auf 50 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelben FS (Ausbeute: 96 mg (79 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.78 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 9.23 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 9.07 – 8.93 (m, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.19 (dd, J = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.01 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.62 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 7.33 – 7.25 (m, 1H), 7.02 (td, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 4.56 – 4.47 (m, 1H), 3.41 – 3.34 (m, 2H), 3.11 – 2.99 (m, 2H), 2.22 – 2.13 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 152.1, 139.8, 136.1, 135.3, 133.1, 130.6, 129.8, 129.2, 127.5, 124.8, 124.5, 123.2, 122.0, 121.7, 121.2, 120.6, 119.3, 116.5, 116.5, 55.1, 42.1, 28.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3216, 3088, 2706, 2372, 1691, 1653, 1577, 1526, 1437,

Experimenteller Teil

1388; DC-MS (ESI) m/z : 505.4 $[M+H]^+$; 503.5 $[M-H]^-$; 539.5 $[M+Cl]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[M+H]^+$: 505.18610; detektiert: 505.1862; HPLC t_{ret} = 5,34 min.

3-(4-(3-(2-Fluorphenyl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)-N-(1-(piperidin-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl)benzamid (**P-1**)



Summenformel: $C_{25}H_{25}FN_8O_2$

Exakte Masse: 488,21

Molekulargewicht: 488,53

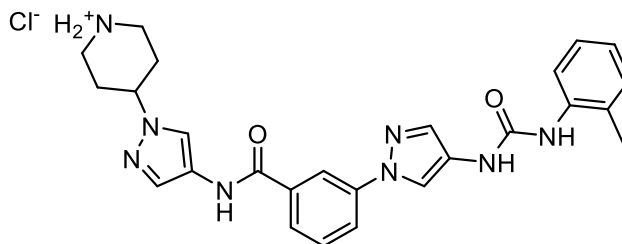
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

Schritt 1: 55 mg S-6 (0,122 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 7 mL trockenem DCM gelöst. 14 μ L 2-Fluorphenylisocyanat (0,122 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 4 h bei RT rühren gelassen. Das so gelöste Intermediat wird direkt in Schritt 2 verwendet.

Schritt 2: Zur Lösung aus Schritt 1 wird 1 mL TFA gegeben. Der Ansatz wird für 30 min gerührt und dann zur Trockene eingengt. Ges. $NaHCO_3$ (aq.)-Lösung wird zugegeben und die Reaktion wird über Nacht rühren gelassen. Folgend wird die Reaktion mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Der *crude* Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 15/85 + 2 N NH_3) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als roten FS (Ausbeute: 20 mg (37 %)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10.64 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 9.10 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.69 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.16 (td, J = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.01 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.84 (t, J = 3.8 Hz, 2H), 7.70 – 7.59 (m, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 7.14 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.05 – 6.98 (m, 1H), 4.38 (dt, J = 14.8, 5.4 Hz, 1H), 3.27 (d, J = 12.7 Hz, 2H), 2.88 (dt, J = 12.2, 6.2 Hz, 2H), 2.15 – 2.05 (m, 2H), 2.03 – 1.94 (m, 2H); ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3264, 3071, 2950, 2850, 1669, 1584, 1540, 1490, 1454, 1396; DC-MS(ESI) m/z : 489.4 $[M+H]^+$; 511.5 $[M+Na]^+$; 487.4 $[M-H]^-$; 523.4 $[M+Cl]^-$; HRMS (ESI) m/z : erwartet für $[M+H]^+$: 489.21565; detektiert: 489.2160; HPLC t_{ret} = 4,80 min.

4-(4-(3-(4-(3-(*o*-Tolyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-2**)



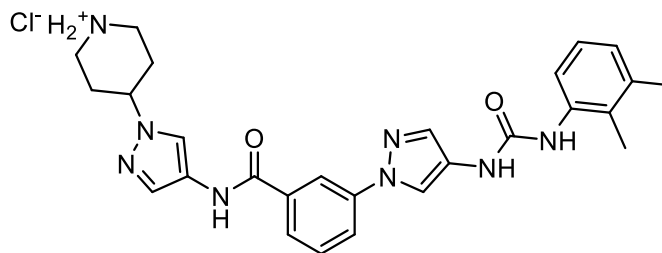
Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 50 mg S-6 (0,111 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL trockenem DCM gelöst. 16 μ L 2-Methylphenylisocyanat (0,111 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 0,44 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (0,554 mmol; 5 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als hell-braunen FS (Ausbeute: 26 mg (44 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.75 (s), 9.49 (s), 9.17 (d, $J = 9.8$ Hz), 8.93 (q, $J = 9.6$ Hz), 8.57 (s), 8.35 (d, $J = 20.2$ Hz), 8.13 (s), 8.00 (d, $J = 7.7$ Hz), 7.86 (t, $J = 8.2$ Hz), 7.80 (s), 7.71 (s), 7.61 (t, $J = 7.5$ Hz), 7.20 – 7.09 (m), 6.93 (t, $J = 7.0$ Hz), 4.60 – 4.43 (m), 3.38 (d, $J = 9.4$ Hz), 3.05 (s), 2.27 (s), 2.17 (s); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.8, 152.6, 139.8, 137.6, 135.3, 133.0, 130.5, 130.1, 129.8, 127.4, 126.1, 124.9, 124.7, 122.4, 121.6, 120.7, 120.5, 119.3, 116.3, 116.1, 55.1, 42.2, 28.6, 18.1; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3396, 3228, 3101, 1692, 1605, 1577, 1534, 1488, 1471, 1454; DC-MS(ESI) m/z : 485.7 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 483.8 [$\text{M}-\text{H}$]; 519.7 [$\text{M}+\text{Cl}$]; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 485.24072; detektiert: 485.2401; HPLC $t_{\text{ret}} = 4,76$ min.

4-(4-(3-(4-(3-(2,3-Dimethylphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-3**)



Summenformel: C₂₇H₃₁ClN₈O₂

Exakte Masse: 534,23

Molekulargewicht: 535,05

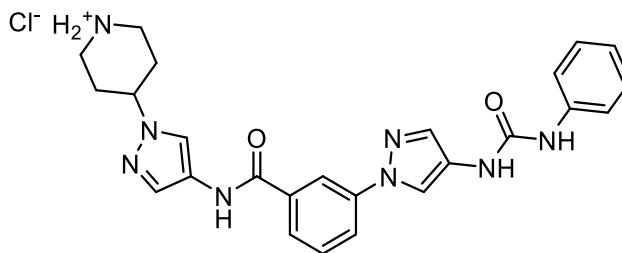
Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 75 mg S-6 (0,166 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 6 mL trockenem DCM gelöst. 23 µL 2,3-Dimethylphenylisocyanat (0,166 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 12 mL EtOH gelöst. 1,33 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,661 mmol; 10 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelb-braunen FS (Ausbeute: 64 mg (72 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.74 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 9.16 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.92 (dd, J = 18.9, 9.4 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.99 (dd, J = 8.1, 1.0 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 – 7.54 (m, 2H), 7.02 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.55 – 4.45 (m, 1H), 3.38 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 3.05 (s, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.21 – 2.13 (m, 7H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 152.9, 139.9, 137.2, 136.5, 135.3, 133.0, 130.6, 129.8, 127.3, 125.2, 125.1, 124.7, 124.7, 121.6, 120.5, 120.1, 119.3, 116.3, 116.1, 55.1, 42.2, 28.7, 20.4, 13.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3243, 2938, 2800, 2712, 2492, 1653, 1584, 1540, 1395, 1278; DC-MS(ESI) *m/z*: 500.1 [M+H]⁺; 534.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 499.25637; detektiert: 499.2554; HPLC *t*_{ret} = 5,16 min.

4-(4-(3-(4-(3-Phenylharnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-4**)



Summenformel: $C_{25}H_{27}ClN_8O_2$

Exakte Masse: 506,19

Molekulargewicht: 506,99

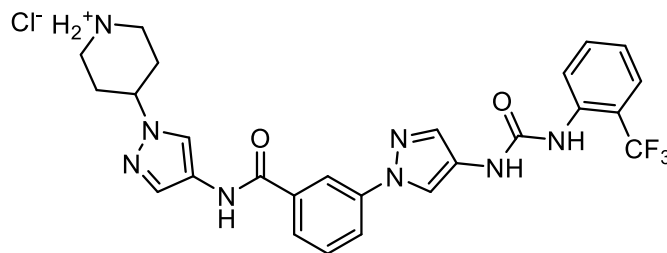
Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 74 mg S-6 (0,164 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem Toluol gelöst. 18 μ L Phenylisocyanat (0,164 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 1,3 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,639 mmol; 10 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelben FS (Ausbeute: 20 mg (26 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.73 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 9.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.00 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.61 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.27 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.95 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.57 – 4.45 (m, 1H), 3.38 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 3.05 (s, 2H), 2.18 (s, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 152.5, 139.9, 139.8, 135.3, 133.1, 130.5, 129.7, 128.7, 124.8, 124.7, 121.6, 121.6, 120.8, 120.5, 119.3, 117.9, 116.3, 55.1, 42.1, 28.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3270, 3043, 2796, 2712, 2501, 1595, 1553, 1490, 1442, 1388; DC-MS(ESI) *m/z*: 471.9 [M+H]⁺; 505.8 [M+Cl]⁺; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 471.22507; detektiert: 471.2241; HPLC *t*_{ret} = 4,35 min.

4-(4-(3-(4-(3-(2-(Trifluormethyl)phenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-5**)



Summenformel: C₂₆H₂₆ClF₃N₈O₂

Exakte Masse: 574,18

Molekulargewicht: 574,99

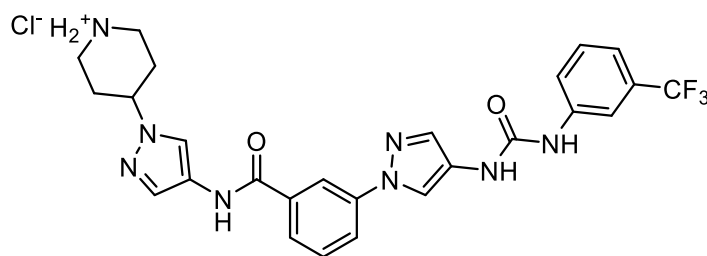
Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 75 mg S-6 (0,166 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 6 mL trockenem DCM gelöst. 25 µL 2-Trifluormethylphenylisocyanat (0,166 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 1,33 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,661 mmol; 10 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als cremefarbenen FS (Ausbeute: 81 mg (85 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.76 (s, 1H), 9.63 (s, 1H), 9.20 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 8.97 (dd, J = 19.6, 9.9 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.01 – 7.95 (m, 2H), 7.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.68 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.63 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 4.51 (dt, J = 15.0, 7.6 Hz, 1H), 3.38 (d, J = 12.6 Hz, 2H), 3.10 – 2.99 (m, 2H), 2.21 – 2.13 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 152.4, 139.8, 136.5 (q, J = 1.8 Hz), 135.3, 133.1, 132.8, 130.6, 129.7, 128.1 – 119.8 (m), 125.9 (q, J = 5.3 Hz), 125.5, 124.8, 124.5, 123.6, 121.6, 120.6, 119.9 (q, J = 29.0 Hz) 119.3, 116.6, 116.5, 55.1, 42.1, 28.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 2932, 2792, 2710, 1662, 1585, 1539, 1490, 1452, 1395, 1318; DC-MS(ESI) *m/z*: 539.4 [M+H]⁺; 537.3 [M-H]⁻; 573.3 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 539.21246; detektiert: 539.2126; HPLC *t*_{ret} = 6,92 min.

4-(4-(3-(4-(3-(3-(Trifluormethyl)phenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-6**)



Summenformel: C₂₆H₂₆ClF₃N₈O₂

Exakte Masse: 574,18

Molekulargewicht: 574,99

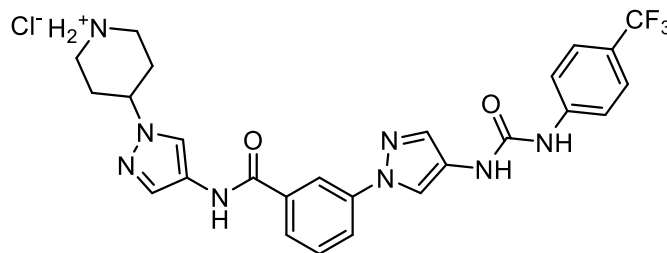
Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 75 mg S-6 (0,166 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 6 mL trockenem DCM gelöst. 23 µL 3-Trifluormethylphenylisocyanat (0,166 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 1,33 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,661 mmol; 10 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als hell-braunen FS (Ausbeute: 75 mg (78 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.72 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 9.14 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.90 (dd, J = 18.8, 9.3 Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.02 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.65 – 7.57 (m, 1H), 7.50 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.58 – 4.45 (m, 1H), 3.39 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 3.13 – 2.98 (m, 1H), 2.23 – 2.11 (m, J = 13.7, 6.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 152.4, 140.8, 139.8, 135.3, 133.2, 130.6, 129.9, 129.8, 129.5 (q, J = 31.2 Hz), 124.8, 124.4, 124.2 (q, J = 272.3 Hz), 121.6, 121.4, 120.6, 119.4, 117.8 (dd, J = 7.7, 3.7 Hz), 116.7, 116.3, 113.7 (q, J = 3.9 Hz), 55.1, 42.2, 28.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3261, 3092, 2797, 2717, 2496, 1653, 1599, 1559, 1490, 1445; LC-MS(APCI) *m/z*: 538.7 [M+H]⁺; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 539.21246; detektiert: 539.2129; HPLC *t*_{ret} = 6,29 min.

4-(4-(3-(4-(3-(4-(Trifluormethyl)phenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-7**)



Summenformel: C₂₆H₂₆ClF₃N₈O₂

Exakte Masse: 574,18

Molekulargewicht: 574,99

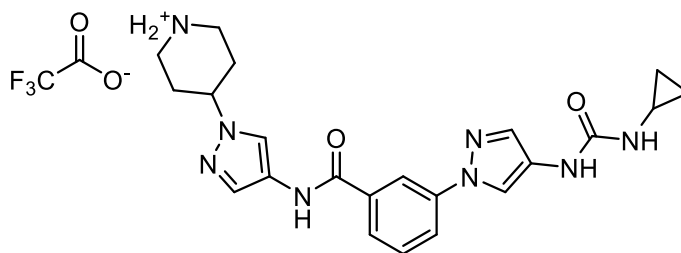
Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 75 mg S-6 (0,166 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 6 mL trockenem DCM gelöst. 24 µL 4-Trifluormethylphenylisocyanat (0,166 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 1,33 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,661 mmol; 10 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als hell-gelben FS (Ausbeute: 27 mg (28 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.73 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 9.02 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 7.72 – 7.67 (m, 3H), 7.66 – 7.60 (m, 3H), 4.56 – 4.47 (m, 1H), 3.40 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 3.12 – 2.98 (m, 2H), 2.23 – 2.08 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 152.2, 143.7, 139.8, 135.3, 133.3, 130.6, 129.8, 126.1 (dd, J = 7.4, 3.6 Hz), 124.9, 124.6 (dd, J = 541.7, 270.8 Hz), 124.4, 121.6, 121.6 (q, J = 31.8 Hz), 120.6, 119.4, 117.6, 116.7, 116.4, 55.1, 42.3, 28.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3242, 3205, 3092, 2843, 2740, 2549, 1706, 1647, 1609, 1583; DC-MS(ESI) *m/z*: 539.2 [M+H]⁺; 537.5 [M-H]⁻; 573.6 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 539.21246; detektiert: 539.2117; HPLC *t*_{ret} = 6,23 min.

4-(4-(3-(4-(3-Cyclopropylharnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid)-1H-pyrazol-1-yl)piperidin-1-ium 2,2,2-trifluoracetat (**P-8**)



Summenformel: $C_{24}H_{27}F_3N_8O_4$

Exakte Masse: 548,21

Molekulargewicht: 548,53

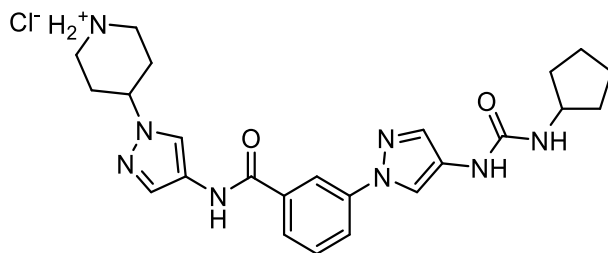
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

Schritt 1: 50 mg S-6 (0,111 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL trockenem DCM gelöst. 8 μ L Cyclopropylisocyanat (0,111 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das so gelöste Intermediat wird direkt in Schritt 2 verwendet.

Schritt 2: Zur Lösung aus Schritt 1 wird 1 mL TFA gegeben. Der Ansatz wird für 30 min gerührt und dann zur Trockene eingedunstet. Folgend wird die Reaktion mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedunstet. Der *crude* Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 15/85 + 2 N NH_3) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als orangenen FS (Ausbeute: 21 mg (35 %)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10.68 (s, 1H), 8.72 (br s, 2H), 8.46 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.30 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.95 (dd, $J = 8.1, 1.3$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.61 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.57 – 4.47 (m, 1H), 3.45 – 3.38 (m, 2H), 3.07 (td, $J = 12.3, 2.7$ Hz, 2H), 2.58 – 2.51 (m, 1H), 2.23 – 2.06 (m, 4H), 0.73 – 0.57 (m, 2H), 0.49 – 0.33 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 162.9, 158.6 – 157.5 (m), 155.9, 139.9, 135.3, 133.2, 130.6, 129.8, 125.6, 124.5, 121.6, 120.4, 119.5, 117.5 (dd, $J = 611.6, 311.4$ Hz), 116.3, 116.1, 55.1, 42.4, 28.8, 22.5, 6.6; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3295, 3071, 3001, 2731, 2498, 1643, 1583, 1551, 1340, 1200; DC-MS(ESI) m/z : 435.6 $[M+H]^+$; 433.7 $[M-H]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[M+H]^+$: 435.22507; detektiert: 435.2251; HPLC $t_{ret} = 2,61$ min.

4-(4-(3-(4-(3-Cyclopentylharnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-9**)



Summenformel: C₂₄H₃₁ClN₈O₂

Exakte Masse: 498,23

Molekulargewicht: 499,02

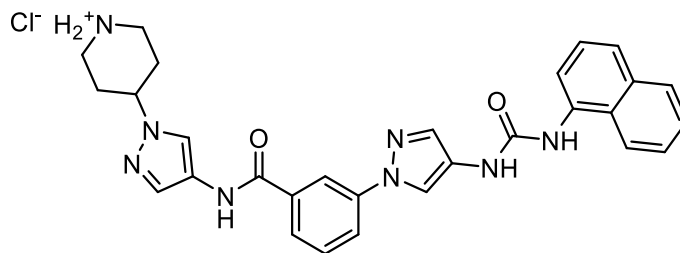
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

Schritt 1: 50 mg S-6 (0,111 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL trockenem DCM gelöst. 25 µL Cyclopentylisocyanat (0,111 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 0,28 mL einer 4 M HCl (Dioxan)-Lösung (1,107 mmol; 10 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen. Der FS wird am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als braunen FS (Ausbeute: 43 mg (84 %)).

¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ 8.32 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.60 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.05 (q, 1H), 3.57 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 3.23 (t, J = 11.3 Hz, 2H), 2.39 – 2.21 (m, 4H), 2.02 – 1.91 (m, 2H), 1.80 – 1.56 (m, 4H), 1.53 – 1.41 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOH-*d*₄) δ 166.3, 141.8, 136.8, 134.7, 132.5, 131.0, 126.4, 125.9, 123.0, 122.6, 121.7, 118.4, 57.0, 53.1, 44.2, 34.2, 30.2, 24.5; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 2944, 2867, 2719, 2499, 1642, 1583, 1559, 1491, 1388, 1281; DC-MS(ESI) *m/z*: 463.7 [M+H]⁺; 497.8 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 463.25637; detektiert: 463.2555; HPLC *t*_{ret} = 4,29 min.

4-(4-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)hanrstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-10**)



Summenformel: C₂₉H₂₉ClN₈O₂

Exakte Masse: 556,21

Molekulargewicht: 557,06

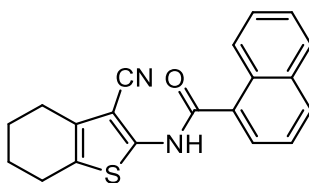
Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 77 mg S-6 (0,171 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM gelöst. 25 µL 1-Naphthylisoyanat (0,171 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 5/95 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 12 mL EtOH gelöst. 1,0 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,279 mmol; 7,5 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als hell-braunen FS (Ausbeute: 61 mg (64 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.77 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 9.22 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 9.07 – 8.91 (m, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.39 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 8.14 (s, 1H), 8.12 – 8.08 (m, 1H), 8.02 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 1H), 7.89 – 7.83 (m, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.62 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 7.58 – 7.50 (m, 2H), 7.46 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.59 – 4.45 (m, 1H), 3.41 – 3.34 (m, 2H), 3.10 – 2.99 (m, 2H), 2.25 – 2.10 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 153.0, 139.9, 135.3, 134.8, 133.8, 133.0, 130.6, 129.8, 128.3, 125.9, 125.7, 125.6, 125.0, 124.8, 122.6, 121.9, 121.7, 120.6, 119.4, 116.6, 116.3, 116.2, 55.2, 42.2, 28.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3234, 3086, 2751, 2548, 1690, 1653, 1547, 1488, 1386, 1340; DC-MS(ESI) *m/z*: 521.1 [M+H]⁺; 555.5 [M+Cl]⁺; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 521.24072; detektiert: 521.2405; HPLC *t*_{ret} = 5,55 min.

7.5.2 Synthese der in Kapitel 5.1.3 beschrieben Testverbindungen

N-(3-Cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-2-yl)-1-naphthamid (**TCS JNK 5a**)Summenformel: C₂₀H₁₆N₂OS

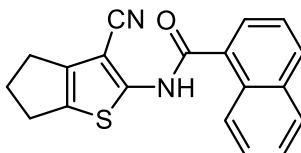
Exakte Masse: 332,10

Molekulargewicht: 332,42

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

300 mg S-11 (1,6830 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 20 mL Pyridin gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 254 µL 1-Napthoesäurchlorid (1,6830 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Nach 5 min. wird die Kühlung entfernt und der Ansatz für 18 h auf 80 °C erhitzt. Folgend wird der Ansatz mit EtOAc versetzt und 2x mit (10 %) HCl (aq.)-Lösung, sowie 2x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingengt, via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Pe: 5/95 – 35/65) und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 71 mg (13 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.21 (s, 1H), 8.16 – 8.10 (m, J = 8.7, 3.8 Hz, 2H), 8.07 – 8.02 (m, 1H), 7.81 (dd, J = 7.1, 1.0 Hz, 1H), 7.68 – 7.60 (m, 3H), 2.69 – 2.64 (m, 2H), 2.57 – 2.52 (m, 2H), 1.84 – 1.76 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.7, 146.1, 133.0, 132.0, 131.3, 131.0, 129.7, 128.5, 128.2, 127.3, 126.6, 126.5, 124.9, 124.7, 114.1, 95.0, 23.6, 23.5, 22.6, 21.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3233, 3187, 3061, 2934, 2909, 2848, 1661, 1575, 1547, 1508; DC-MS (ESI) *m/z*: 354.9 [M+Na]⁺; 386.8 [M+Na+MeOH]⁺; 330.9 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 9,40 min.

N-(3-Cyano-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophen-2-yl)-1-naphthamid (**P-11**)Summenformel: C₁₉H₁₄N₂OS

Exakte Masse: 318,08

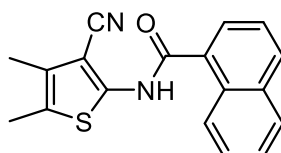
Molekulargewicht: 318,39

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

75 mg S-10 (0,4567 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 7,5 mL trockenem Pyridin gelöst. 86 μ L 1-Naphthoesäurechlorid (0,5708 mmol; 1,25 eq.) wird langsam zugegeben. Der Ansatz wird für 20 h auf 80 °C erhitzt. Nach Monitoring via HPLC wird erneut 86 μ L 1-Naphthoesäurechlorid (0,5708 mmol; 1,25 eq.) zugegeben und der Ansatz bei 80 °C für 2 h weiter gerührt. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wird dieser mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung, sowie 3x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingengt und via Flash-Chromatographie (EtOAc/Hex: 15/85 – 40/60) aufgereinigt, wonach das Lösemittel abgenommen wird. Der Rückstand wird in MeOH und DCM aufgenommen. Das DCM wird am Rotationsverdampfer wieder abgenommen, wobei das Produkt präzipitiert. Der ausgefallene FS wird abgesaugt und mit Et₂O gewaschen. Man erhält das Produkt als weiß-beigen FS (Ausbeute: 66 mg (45 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.21 (s, 1H), 8.17 – 8.12 (m, 2H), 8.07 – 8.02 (m, 1H), 7.82 (dd, *J* = 7.0, 0.9 Hz, 1H), 7.67 – 7.59 (m, 3H), 2.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.45 – 2.35 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.7, 151.1, 141.6, 134.6, 133.1, 131.9, 131.1, 129.8, 128.5, 127.4, 126.7, 126.5, 124.9, 124.8, 114.5, 91.1, 29.2, 27.7, 27.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3241, 3188, 3050, 2949, 2902, 2850, 2218, 1669, 1564, 1541; DC-MS (ESI) *m/z*: 341.5 [M+Na]⁺; 373.5 [M+Na+MeOH]⁺; 317.4 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 9,10 min.

N-(3-Cyano-4,5-dimethylthiophen-2-yl)-1-naphthamid (**P-12**)



Summenformel: C₁₈H₁₄N₂OS

Exakte Masse: 306,08

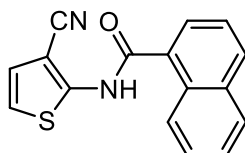
Molekulargewicht: 306,38

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

60 mg S-13 (0,3942 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL trockenem Pyridin gelöst. 65 μ L 1-Naphthoesäurechlorid (0,4336 mmol; 1,10 eq.) wird langsam zugegeben. Der Ansatz wird für 23 h auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wird dieser mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung, sowie 2x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingengt und via Flash-Chromatographie (EtOAc/Pe: 7,5/92,5 – 35/65) aufgereinigt. Nach dem Zusatz von MeOH zur geflashten Lösung fällt das Produkt, und wird abfiltriert und mit MeOH und Pentan gewaschen. Man erhält das Produkt als weißen fluffigen FS (Ausbeute: 55 mg (46 %)).

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.20 (s, 1H), 8.16 – 8.10 (m, $J = 8.6, 4.2$ Hz, 2H), 8.07 – 8.02 (m, 1H), 7.81 (dd, 1H), 7.67 – 7.58 (m, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.15 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.7, 145.3, 133.1, 131.9, 131.0, 129.8, 129.0, 128.5, 127.3, 126.7, 126.5, 125.3, 124.9, 124.8, 114.6, 96.9, 12.2, 12.2; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3243, 3191, 3046, 2911, 2850, 2214, 1667, 1545, 1508, 1466; DC-MS (ESI) m/z : 329.4 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 305.3 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HPLC $t_{\text{ret}} = 8,80$ min.

N-(3-Cyanothiophen-2-yl)-1-naphthamid (**P-13**)

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$

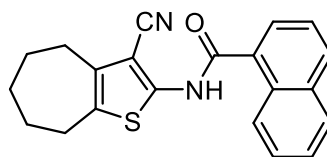
Exakte Masse: 278,05

Molekulargewicht: 278,33

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

80 mg 2-Aminothiophen-3-Carbonitril (0,6443 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 8 mL trockenem Pyridin gelöst. 100 μL 1-Naphthoesäurechlorid (0,6637 mmol; 1,03 eq.) wird langsam zugegeben. Der Ansatz wird für 8 h auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wird dieser mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird 1x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung, sowie 1x mit eine 1:1-Mischung aus 2 M NaOH (aq.)-Lösung und ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird mit erneut mit EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, eingeeengt und via Flash-Chromatographie (EtOAc/Pe: 12,5/87,5 – 32,5/67,5) aufgereinigt. Das Produkt wird am Hochvakuum bis zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 75 mg (42 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.40 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.08 – 8.03 (m, 1H), 7.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.68 – 7.59 (m, 3H), 7.32 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.9, 149.0, 133.1, 131.8, 131.1, 129.8, 128.5, 127.4, 126.8, 126.5, 125.4, 124.9, 124.8, 119.8, 114.7, 94.5; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3235, 3207, 2223, 1675, 1548, 1491, 1280, 1245, 1210, 1192; DC-MS (ESI) m/z : 301.4 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 333.5 [$\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}$] $^+$; 277.3 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HPLC $t_{\text{ret}} = 7,66$ min.

N-(3-Cyano-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]thiophen-2-yl)-1-naphthamid (**P-14**)Summenformel: C₂₁H₁₈N₂OS

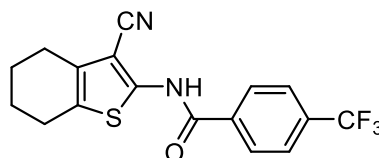
Exakte Masse: 346,11

Molekulargewicht: 346,45

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

300 mg S-12 (1,5602 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 20 mL trockenem Pyridin gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 235 µL 1-Naphthoesäurechlorid (1,5602 mmol; 1 eq.) wird langsam zugegeben. Nach 5 min. wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird für 18 h auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wird dieser mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung, sowie 2x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeeengt und 2x via Flash-Chromatographie (1) DCM/Pe: 40/60 – 100/0; 2) EtOAc/Pe: 5/95 – 35/65) aufgereinigt und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiß-gelben FS (Ausbeute: 100 mg (19 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.12 (s, 1H), 8.13 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.07 – 8.01 (m, 1H), 7.80 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.67 – 7.58 (m, 3H), 2.81 – 2.68 (m, 4H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.68 – 1.59 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.7, 144.1, 136.0, 133.0, 132.0, 131.9, 130.9, 129.7, 128.4, 127.3, 126.6, 126.4, 124.9, 124.8, 114.6, 97.4, 31.4, 28.4, 28.3, 27.6, 26.9; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3228, 2918, 2846, 1673, 1558, 1526, 1437, 1391, 1329, 1249; DC-MS (ESI) *m/z*: 368.9 [M+Na]⁺; 400.8 [M+Na+MeOH]⁺; 344.8 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 9,74 min.

N-(3-Cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-2-yl)-4-(trifluormethyl)benzamid (**P-15**)Summenformel: C₁₇H₁₃F₃N₂OS

Exakte Masse: 350,07

Molekulargewicht: 350,36

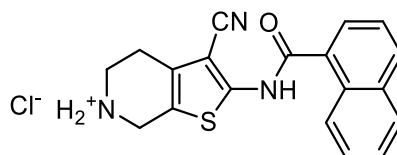
Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

65 mg S-11 (0,3647 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 8 mL Pyridin gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 54 µL 4-Trifluormethylbenzoesäurechlorid (0,3647 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Nach 5 min. wird die Kühlung entfernt und der Ansatz für 18 h auf 80

Experimenteller Teil

°C erhitzt. Folgend wird der Ansatz mit EtOAc versetzt und 2x mit (10 %) HCl (aq.)-Lösung, sowie 2x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingengt und via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/Pe: 0/100 – 15/85). Das Produkt wird in Pentan resuspendiert, abgesaugt, mit Pentan:Et₂O (1:1) gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 35 mg (27 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.96 (s, 1H), 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.65 (s, 2H), 2.54 (s, 2H), 1.78 (s, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.2, 145.8, 136.3 (q, J = 1.4 Hz), 132.0 (q), 131.6, 129.2, 129.0, 125.4 (q, J = 3.9 Hz), 114.1, 123.8 (q, J = 272.5 Hz), 96.3, 23.6, 23.5, 22.6, 21.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3236, 3189, 3076, 2999, 2945, 2864, 1668, 1577, 1554, 1465; DC-MS (ESI) *m/z*: 373.3 [M+Na]⁺; 349.2 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 11,05 min.

2-(1-Naphthamido)-3-cyano-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridin-6-iumchlorid (**P-16**)

Summenformel: C₁₉H₁₆ClN₃OS

Exakte Masse: 369,07

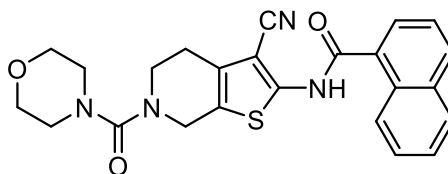
Molekulargewicht: 369,87

Die Synthese wird nach ASV-8 durchgeführt.

91 mg S-19 (0,2099 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 3,5 mL EtOH suspendiert. Folgend wird 0,840 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,0495 mmol; 5 eq.) zugegeben und für 2 h auf 60 °C erhitzt. Das Produkt wird abfiltriert, mit etwas EtOH und Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißes Pulver (Ausbeute: 45 mg (59 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.58 (s, 1H), 9.85 (s, 2H), 8.16 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.14 – 8.09 (m, 1H), 8.08 – 8.03 (m, 1H), 7.85 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.69 – 7.59 (m, 3H), 4.30 (s, 2H), 3.51 – 3.40 (m, 2H), 2.88 (t, J = 5.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.0, 148.3, 133.0, 131.4, 131.3, 129.7, 129.1, 128.5, 127.5, 126.9, 126.6, 124.9, 124.6, 120.3, 113.4, 93.6, 40.7, 40.1, 20.9; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3474, 3395, 3236, 2682, 2600, 2210, 1670, 1577, 1530, 1280; DC-MS (ESI) *m/z*: 356.1 [M+Na]⁺; 388.0 [M+Na+MeOH]⁺; 332.2 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 3,89 min.

N-(3-Cyano-6-(morpholine-4-carbonyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridin-2-yl)-1-naphthamid (**P-17**)



Summenformel: C₂₄H₂₂N₄O₃S

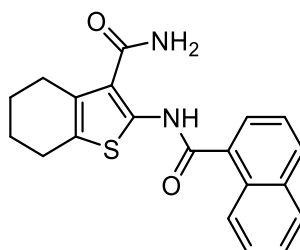
Exakte Masse: 446,14

Molekulargewicht: 446,53

50 mg P-16 (0,1352 mmol; 1 eq.) wird in 5 mL trockenem Toluol suspendiert. Folgend wird 37 μ L TEA (0,2704 mmol; 2 eq.) sowie 16 μ L 4-Morpholincarboxylchlorid (0,1352 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Der Ansatz wird für 5 h bei RT rühren gelassen und 43 h bei 60 °C. Folgend wird MeOH zum Ansatz gegeben. Das LM wird abgenommen und der Rückstand wird in EtOAc wieder aufgenommen. Die organische Phase wird 2x mit 5 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer wieder eingengt. Der Ansatz wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 6,5/93,5). Das Produkt wird in Et₂O suspendiert, abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelb, kristallinen FS (Ausbeute: 44 mg (73 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.40 (s, 1H), 8.17 – 8.10 (m, 2H), 8.07 – 8.03 (m, J = 6.1, 2.5 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 7.1, 1.0 Hz, 1H), 7.67 – 7.59 (m, 3H), 4.38 (s, 2H), 3.60 (t, 4H), 3.49 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.20 (t, 4H), 2.69 (t, J = 5.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8, 162.8, 147.2, 133.1, 131.7, 131.1, 130.4, 129.7, 128.5, 127.4, 126.8, 126.5, 125.4, 124.9, 124.7, 113.8, 94.2, 65.9, 46.9, 45.0, 43.5, 23.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3158, 3055, 2958, 2924, 1832, 1664, 1607, 1551, 1477, 1418; DC-MS (ESI) *m/z*: 469.5 [M+Na]⁺; 445.5 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 7,56 min.

2-(1-Naphthamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-3-carboxamid (**P-18**)



Summenformel: C₂₀H₁₈N₂O₂S

Exakte Masse: 350,11

Molekulargewicht: 350,44

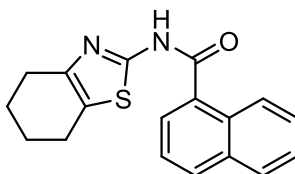
Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

Experimenteller Teil

50 mg S-17 (0,2548 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 5 mL trockenem Pyridin gelöst. Der Ansatz wird mit 42 μ L Naphthoesäurechlorid (0,2802 mmol; 1,1 eq.) versetzt und für 16,5 h auf 60 °C erhitzt. Der Ansatz wird mit EtOAc aufgenommen und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen sowie 2x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Ansatz wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/PE: 25/75 – 60/40). Das Produkt wird in MeOH suspendiert, abfiltriert, mit Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beige-weißes Pulver (Ausbeute: 39 mg (44 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.52 (s, 1H), 8.41 – 8.35 (m, 1H), 8.16 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 1H), 7.86 (dd, 1H), 7.68 – 7.59 (m, 3H), 7.11 (br s, 2H), 2.72 (d, J = 21.6 Hz, 4H), 1.77 (d, J = 4.7 Hz, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.5, 164.6, 142.4, 133.4, 131.9, 131.7, 129.7, 129.2, 128.6, 127.5, 126.7, 126.6, 125.9, 125.2, 124.9, 116.8, 25.2, 23.9, 22.5, 22.4; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3499, 3332, 2932, 1636, 1580, 1554, 1507, 1403, 1334, 1300; DC-MS (ESI) *m/z*: 373.0 [M+Na]⁺; 349.2 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 9,19 min.

N-(4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-1-naphthamid (**P-19**)



Summenformel: C₁₈H₁₆N₂OS
 Exakte Masse: 308,10
 Molekulargewicht: 308,40

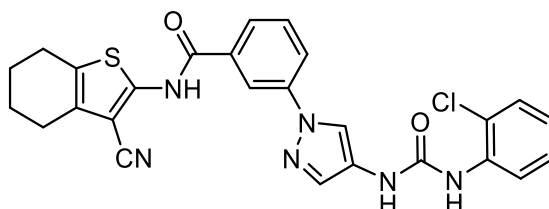
Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

122 mg S-22 (0,7910 mmol; 1 eq.; 82 % Reinheit nach HPLC) wird vorgelegt und in 6 mL trockenem Pyridin gelöst. Folgend wird 97 μ L Naphthoesäurechlorid (0,6486 mmol; 0,82 eq.) zugegeben und die Reaktion wird 1 h bei 40 °C sowie 1,5 h bei 50 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktion wird der Ansatz mit demin H₂O versetzt. Nach 1 h wird EtOAc zugegeben und die organische Phase wird so lange mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen, bis sich kein Pyridin mehr in der organischen Phase befindet. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Ansatz via Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/PE) und das Produkt wird am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als festen weißen Schaum (Ausbeute: 54 mg (27 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.52 (br s, 1H), 8.25 – 8.20 (m, J = 6.9, 2.7 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.05 – 8.00 (m, 1H), 7.82 (dd, J = 7.1, 1.1 Hz, 1H), 7.65 – 7.57 (m, 3H), 2.77 – 2.66 (m, 2H), 2.65 – 2.54 (m, 2H), 1.86 – 1.75 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-

d_6) δ 166.6, 155.0, 144.1, 133.1, 131.6, 131.1, 129.8, 128.4, 127.3, 126.7, 126.4, 124.9, 124.9, 121.6, 26.0, 23.0, 22.6, 22.3; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3134, 3044, 2922, 2839, 1664, 1566, 1539, 1508, 1437, 1364; DC-MS (ESI) m/z : 331.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 307.0 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HPLC t_{ret} = 13,73 min.

3-(4-(3-(2-Chlorphenyl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)-N-(3-cyano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophen-2-yl)benzamid (**P-20**)



Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{S}$

Exakte Masse: 516,11

Molekulargewicht: 517,00

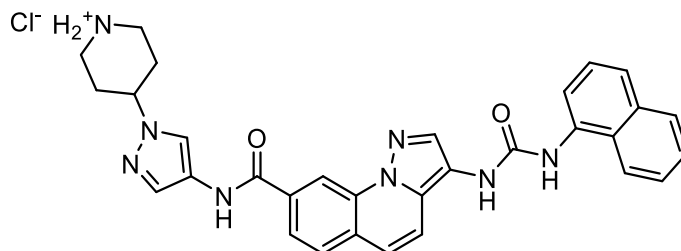
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

80 mg S-21 (0,2201 mmol; 1 eq.; 78 % Reinheit nach HPLC) wird in 8 mL trockenem DCM gelöst und 21 μL 2-Chlorphenylisocyanat (0,2201 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Der Ansatz wird bei RT für 48 h gerührt. Folgend wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird mit MeOH, DCM und Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beige-weißen FS (Ausbeute: 49 mg (55 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.87 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 8.20 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.93 – 7.79 (m, $J = 13.0$ Hz, 2H), 7.67 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.60 (d, $J = 40.6$ Hz, 4H), 1.79 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.6, 151.9, 146.1, 139.7, 136.0, 133.7, 133.3, 131.5, 129.8, 129.2, 128.9, 127.6, 125.6, 124.4, 123.3, 121.9, 121.5, 121.1, 117.4, 116.6, 114.2, 96.3, 23.6, 23.5, 22.6, 21.7; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3278, 3191, 3131, 3074, 2941, 2842, 1692, 1640, 1588, 1574; DC-MS (ESI) m/z : 539.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 515.2 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HPLC t_{ret} = 9,78 min.

7.5.3 Synthese der in Kapitel 5.1.4 beschriebenen Testverbindungen

4-(4-(3-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)pyrazolo[1,5-a]chinolin-8-carboxamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-21**)



Summenformel: C₃₁H₂₉ClN₈O₂

Exakte Masse: 580,21

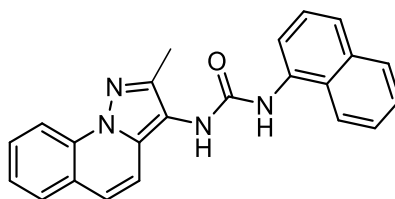
Molekulargewicht: 581,08

Die Synthese wird nach ASV-2a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 30 mg S-82 (0,0731 mmol; 1 eq.), 28 mg EDC·HCl (0,1462 mmol; 2 eq.), sowie 26 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 % Wasser) (0,1462 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 8 mL trockenem THF suspendiert. 37 µL DIPEA (0,2193 mmol; 3 eq.) und 39 mg S-4 (0,1462 mmol; 2 eq.) werden zugesetzt und der Ansatz wird für 48 h rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit demin. H₂O versetzt. Präzipitierendes Produkt wird abgesaugt und mit Pentan und wenig Aceton gewaschen. Folgend wird das Intermediat via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90).

Schritt 2: Das Intermediat aus Schritt 1 wird in 8 mL EtOH suspendiert und 0,248 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (0,3102 mmol; 10 eq.) wird zugegeben. Der Ansatz wird für 20 h bei 60 °C gerührt. Man erhält das Produkt als neongelber krist. FS (Ausbeute: 11 mg (60 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.88 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.72 (br s, 2H), 8.44 (s, 1H), 8.40 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.12 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.06 (s, 2H), 7.96 – 7.91 (m, 1H), 7.89 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.65 – 7.51 (m, 4H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.59 – 4.48 (m, 1H), 3.42 (d, J = 12.8 Hz, 2H), 3.07 (td, J = 12.5, 3.6 Hz, 2H), 2.25 – 2.08 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.6, 153.3, 134.7, 134.5, 133.8, 133.8, 133.7, 130.6, 129.0, 128.4, 127.9, 125.9, 125.7, 125.6, 125.3, 123.7, 122.6, 121.8, 121.8, 121.7, 119.5, 117.3, 116.7, 116.3, 113.4, 55.1, 42.4, 28.8; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3248, 2920, 1639, 1617, 1573, 1523, 1408, 1312, 1251, 1216; DC-MS (ESI) *m/z*: 567.0 [M+Na]⁺; 543.2 [M-H]⁻; 579.2 [M+Cl]⁻; HPLC *t*_{ret} = 5,87 min.

1-(2-Methylpyrazolo[1,5-a]chinolin-3-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (**P-22**)Summenformel: C₂₃H₁₈N₄O

Exakte Masse: 366,15

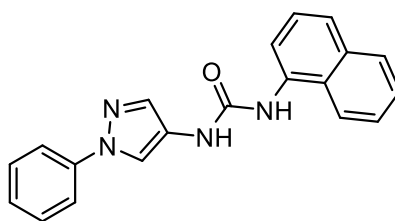
Molekulargewicht: 366,42

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

100 mg S-77 (0,5070 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM gelöst. 73 µL 1-Naphthylisocyanat (0,5070 mmol; 1 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird bei RT für 20 h rühren gelassen. Das Produkt wird abfiltriert, mit DCM und Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als grau-weißen FS (Ausbeute: 144 mg (78 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.87 (br s, 1H), 8.40 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.17 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.96 – 7.88 (m, 2H), 7.75 – 7.69 (m, 1H), 7.66 – 7.59 (m, 2H), 7.58 – 7.44 (m, 5H), 2.44 (s, 3H); ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3254, 3045, 2925, 1617, 1560, 1477, 1388, 1315, 1226, 1082; DC-MS (ESI) *m/z*: 389.3 [M+Na]⁺; 421.3 [M+Na+MeOH]⁺; 365.3 [M-H]⁻; 401,4 [M+Cl]⁻; HPLC *t*_{ret} = 8,43 min.

7.5.4 Synthese der in Kapitel 5.1.5.1 beschriebenen Testverbindung

1-(Naphthalen-1-yl)-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)harnstoff (**P-23**)Summenformel: C₂₀H₁₆N₄O

Exakte Masse: 328,13

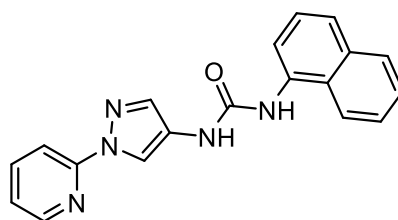
Molekulargewicht: 328,38

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

100 mg S-36 (0,63 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL trockenem THF gelöst. Es wird 90 µL 1-Naphthylisocyanat (0,63 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT für 16 h gerührt. Das präzipitierende Produkt wird filtriert, mit THF und Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 77 mg (37 %)).

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.95 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.83 – 7.79 (m, 2H), 7.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.62 – 7.57 (m, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 3H), 7.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.8, 139.8, 134.5, 133.7, 132.9, 129.5, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 125.7, 124.5, 122.9, 121.4, 117.8, 117.3, 116.3; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3267, 3097, 3050, 1638, 1584, 1501, 1415, 1382, 1344, 1247; DC-MS(ESI) m/z : 351.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 327.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 363.1 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 329.13961; detektiert: 329.1410; HPLC $t_{\text{ret}} = 8,03$ min.

1-(Naphthalen-1-yl)-3-(1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)harnstoff (**P-24**)

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$

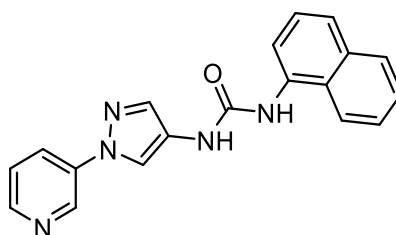
Exakte Masse: 329,13

Molekulargewicht: 329,36

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

100 mg S-38 (0,62 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL trockenem THF gelöst. Es wird 90 μL 1-Naphthylisocyanat (0,62 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT für 72 h gerührt. Das präzipitierende Produkt wird filtriert, mit THF und Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 128 mg (62 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.02 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.46 (dd, $J = 4.8, 0.7$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.03 – 7.89 (m, 5H), 7.65 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.62 – 7.46 (m, 3H), 7.31 (ddd, $J = 6.8, 4.8, 0.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.8, 151.0, 148.3, 139.3, 134.4, 134.1, 133.7, 128.4, 126.2, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.1, 121.5, 121.4, 117.7, 115.1, 111.3; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3273, 3098, 3046, 1638, 1593, 1570, 1471, 1456, 1395, 1369; DC-MS(ESI) m/z : 352.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 384.2 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$; 328.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 364.1 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 330.13486; detektiert: 330.1346; HPLC $t_{\text{ret}} = 7,48$ min.

1-(Naphthalen-1-yl)-3-(1-(pyridin-3-yl)-1H-pyrazol-4-yl)harnstoff (**P-25**)Summenformel: C₁₉H₁₅N₅O

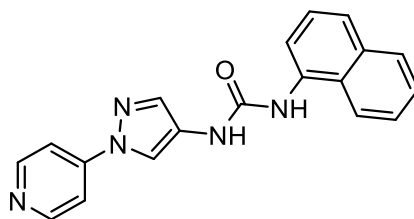
Exakte Masse: 329,13

Molekulargewicht: 329,36

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

100 mg S-40 (0,62 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL trockenem THF gelöst. Es wird 90 μ L 1-Naphthylisocyanat (0,62 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT für 72 h gerührt. Das präzipitierende Produkt wird filtriert, mit THF und Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 116 mg (56 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.09 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.49 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.98 – 7.87 (m, 2H), 7.67 – 7.46 (m, 5H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.8, 146.7, 139.3, 136.1, 134.4, 133.9, 133.7, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 125.1, 125.0, 124.2, 123.0, 121.4, 117.4, 116.5; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3263, 3109, 3040, 1638, 1579, 1554, 1481, 1384, 1345, 1249; DC-MS(ESI) *m/z*: 352.1 [M+Na]⁺; 384.2 [M+Na+MeOH]⁺; 328.1 [M-H]⁻; 364.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 330.13486; detektiert: 330.1350; HPLC *t*_{ret} = 6,62 min.

1-(Naphthalen-1-yl)-3-(1-(pyridin-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl)harnstoff (**P-26**)Summenformel: C₁₉H₁₅N₅O

Exakte Masse: 329,13

Molekulargewicht: 329,36

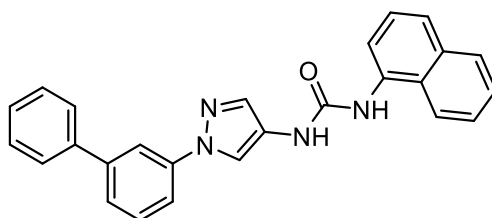
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

100 mg S-42 (0,62 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL trockenem THF gelöst. Es wird 90 μ L 1-Naphthylisocyanat (0,62 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT für 72 h gerührt.

Experimenteller Teil

Das präzipitierende Produkt wird filtriert, mit THF und Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als pink-weißen FS (Ausbeute: 112 mg (55 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.05 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.63 – 8.57 (m, 2H), 8.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.94 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.86 – 7.80 (m, 2H), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 2H), 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.8, 151.1, 145.5, 134.9, 134.3, 133.8, 128.4, 126.1, 126.0, 125.9, 125.8, 125.5, 123.1, 121.4, 117.5, 116.1, 111.6; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3271, 3109, 3063, 1641, 1591, 1559, 1502, 1411, 1370, 1345; DC-MS(ESI) m/z : 352.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 384.3 [$\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}$] $^+$; 328.2 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; 364.2 [$\text{M}+\text{Cl}$] $^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 330.13486; detektiert: 330.1356; HPLC $t_{\text{ret}} = 5,25$ min.

1-(1-([1,1'-Biphenyl]-3-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (**P-27**)

Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$

Exakte Masse: 404,16

Molekulargewicht: 404,47

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

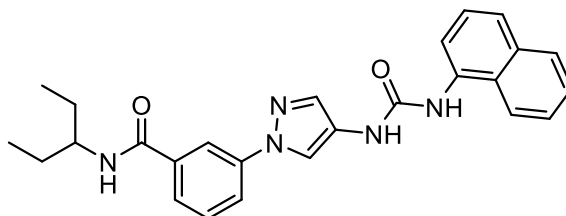
100 mg S-44 (0,4250 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 15 mL trockenem THF gelöst. Es wird 61 μL 1-Naphthylisocyanat (0,4250 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT für 16 h gerührt. Der Ansatz wird mit 1 mL MeOH versetzt und 1h rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird in einer Kleinstmenge an THF resuspendiert, abgesaugt, mit Pentan nachgewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 47 mg (27 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.95 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.07 – 8.02 (m, 2H), 7.94 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.84 – 7.80 (m, 1H), 7.79 – 7.75 (m, 2H), 7.65 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.62 – 7.46 (m, 7H), 7.44 – 7.39 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.8, 141.6, 140.4, 139.5, 134.5, 133.7, 133.1, 130.1, 129.0, 128.4, 127.9, 126.9, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.6, 124.1, 122.9, 121.4, 117.3, 116.9, 116.7, 115.9; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3284, 3109, 3048, 1640, 1554, 1483, 1441, 1388, 1344, 1249; DC-MS(ESI) m/z : 427.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 459.2 [$\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}$] $^+$; 403.2 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; 439.2 [$\text{M}+\text{Cl}$] $^-$

; HRMS(ESI) m/z erwartet für $[M+H]^+$: 405.17091; detektiert: 405.1716; HPLC t_{ret} = 9,55 min.

7.5.5 Synthese der in Kapitel 5.1.5.2 beschriebenen Testverbindungen

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)-N-(pentan-3-yl)benzamid (**P-28**)



Summenformel: $C_{26}H_{27}N_5O_2$

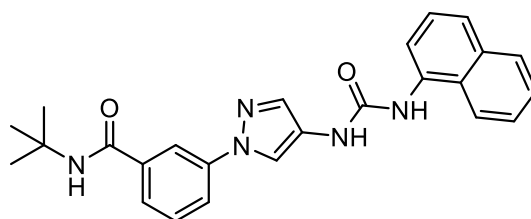
Exakte Masse: 441,22

Molekulargewicht: 441,54

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 μ L DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 37 μ L 3-Pentylamin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H_2O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et_2O und Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: 69 mg (97 %)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.32 – 8.18 (m, 2H), 8.12 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.95 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.76 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.69 – 7.52 (m, 4H), 7.48 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 3.89 – 3.73 (m, 1H), 1.65 – 1.44 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 165.5, 152.8, 139.7, 136.3, 134.4, 133.7, 133.1, 129.5, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.0, 121.4, 120.2, 117.4, 116.5, 116.3, 52.2, 27.00, 10.7; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3329, 3276, 3229, 3073, 2960, 2930, 2873, 1644, 1629, 1551M; DC-MS(ESI) m/z : 442.9 $[M+H]^+$; 463.8 $[M+Na]^+$; 439.9 $[M-H]^-$; 475.8 $[M+Cl]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[M+H]^+$: 442.22368; detektiert: 442.2252; HPLC t_{ret} = 8,64 min.

N-(*tert*-butyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-29**)Summenformel: C₂₅H₂₅N₅O₂

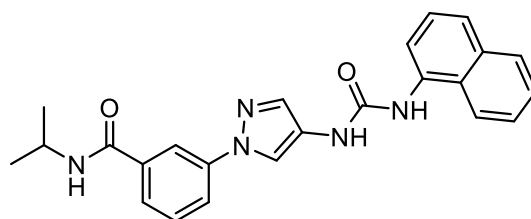
Exakte Masse: 427,20

Molekulargewicht: 427,51

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 8 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 39 µL Isobutylamin (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 20 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: 69 mg (86 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.17 – 8.11 (m, 2H), 8.03 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.99 – 7.90 (m, 3H), 7.86 (s, 1H), 7.73 – 7.68 (m, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.51 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.6, 152.8, 139.6, 137.2, 134.4, 133.7, 133.1, 129.3, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.7, 124.7, 123.0, 121.4, 120.0, 117.4, 116.6, 116.6, 50.9, 28.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3405, 3258, 2963, 1694, 1633, 1550, 1493, 1444, 1400, 1342; DC-MS(ESI) *m/z*: 450.1 [M+Na]⁺; 426.2 [M-H]⁻; 462.2 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 428.20803; detektiert: 428.2104; HPLC *t*_{ret} = 8,37 min.

N-Isopropyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-30**)Summenformel: C₂₄H₂₃N₅O₂

Exakte Masse: 413,19

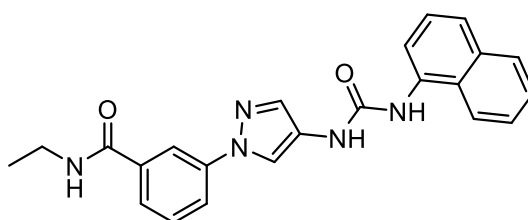
Molekulargewicht: 413,48

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 32 µL Isopropylamin (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: 52 mg (67 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.00 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.43 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.98 – 7.91 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.75 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.14 (dh, J = 13.0, 6.4 Hz, 1H), 1.20 (d, J = 6.6 Hz, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.6, 152.8, 139.7, 136.1, 134.4, 133.7, 133.1, 129.5, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.7, 123.0, 121.4, 120.2, 117.4, 116.5, 116.3, 41.1, 22.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3288, 3241, 3110, 3060, 2968, 2934, 2873, 1646, 1633, 1585; DC-MS(ESI) *m/z*: 436.0 [M+Na]⁺; 412.2 [M-H]⁻; 448.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 414.19238; detektiert: 414.1936; HPLC *t*_{ret} = 7,82 min.

N-Ethyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-31**)



Summenformel: C₂₃H₂₁N₅O₂

Exakte Masse: 399,17

Molekulargewicht: 399,45

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

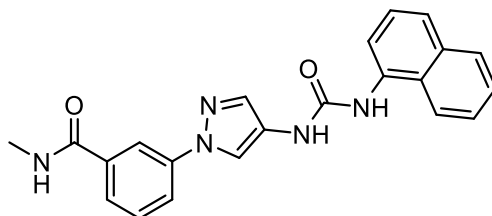
70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 188 µL 2 M Ethylamin (MeOH)-Lösung (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit

Experimenteller Teil

Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonzanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weiß-gelber FS (Ausbeute: 45 mg (60 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.95 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.48 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.40 – 3.26 (m, $J = 12.4$ Hz, 2H), 1.16 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.2, 152.8, 139.8, 136.0, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.7, 124.5, 123.0, 121.4, 120.2, 117.4, 116.4, 116.2, 34.1, 14.8; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3272, 2971, 2932, 2875, 1639, 1586, 1540, 1490, 1385, 1311; DC-MS(ESI) m/z : 422.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 398.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 434.1 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 400.17672; detektiert: 400.1776; HPLC $t_{\text{ret}} = 7,36$ min.

N-Methyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-32**)



Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2$

Exakte Masse: 385,15

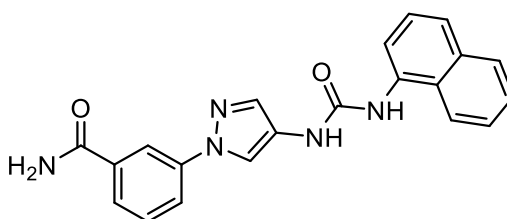
Molekulargewicht: 385,43

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

400 mg P-35 (1,074 mmol; 1 eq.), 383 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (2,149 mmol; 2 eq.) und 412 mg EDC·HCl (2,148 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 40 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 0,748 mL DIPEA (4,297 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Anschließend wird die Kühlung entfernt und die Reaktion wird für 1 h rühren gelassen. Folgend wird 1,074 mL 2 M Methylamin (THF)-Lösung (2,148 mmol; 2 eq.) zugegeben und der Ansatz wird für 20 h rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird in EtOAc wieder aufgenommen. Die organische Phase wird 1x mit demin. H_2O , 1x mit ges. NaHCO_3 (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NH_4Cl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 346 mg (84 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.98 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.65 – 8.60 (m, J = 4.5 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.24 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.06 – 8.02 (m, J = 7.7, 0.7 Hz, 1H), 7.98 – 7.91 (m, J = 11.4, 5.7, 0.9 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.74 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 2.83 (d, J = 4.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165.8, 152.8, 139.8, 135.8, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.8, 125.7, 124.7, 124.4, 123.0, 121.4, 120.2, 117.4, 116.4, 116.1, 26.3; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3288, 3231, 3081, 2948, 1647, 1584, 1546, 1482, 1394, 1385; DC-MS(ESI) m/z : 408.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 384.1 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; 420.0 [$\text{M}+\text{Cl}$] $^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 386.16107; detektiert: 386.1624; HPLC t_{ret} = 6,71 min.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-33**)



Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2$

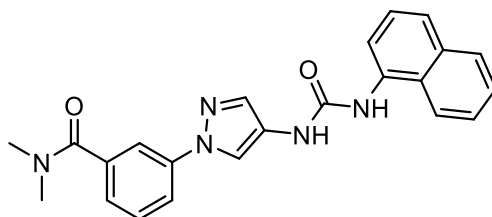
Exakte Masse: 371,14

Molekulargewicht: 371,40

Die Synthese wird nach ASV-2c durchgeführt.

150 mg P-35 (0,403 mmol; 1 eq.) sowie 130 mg CDI (0,806 mmol; 2 eq.) werden in 20 mL trockenem THF suspendiert. Die Reaktion wird 4 h bei RT rühren gelassen. Anschließendes Monitoring lässt auf eine quantitative Aktivierung der Carbonsäure-Komponente schließen. Folgend werden 71 μL (25 wt. %) NH_3 (aq.)-Lösung zugegeben und die Reaktion wird für 20 h bei RT gerührt. Das präzipitierte Produkt wird abgefiltert, mit MeOH und Et_2O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 33 mg (22 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.98 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.00 – 7.91 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.63 – 7.52 (m, 3H), 7.53 – 7.37 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 167.1, 152.8, 139.8, 135.6, 134.4, 133.7, 133.1, 129.5, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.0, 121.4, 120.4, 117.3, 116.5, 116.4; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3301, 3167, 3108, 1643, 1627, 1610, 1592, 1583, 1547, 1499; DC-MS(ESI) m/z : 393.8 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 425.7 [$\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}$] $^+$; 370.0 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; 405.9 [$\text{M}+\text{Cl}$] $^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 372.14542; detektiert: 372.1452; HPLC t_{ret} = 6,45 min.

N,N-Dimethyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-34**)Summenformel: C₂₃H₂₁N₅O₂

Exakte Masse: 399,17

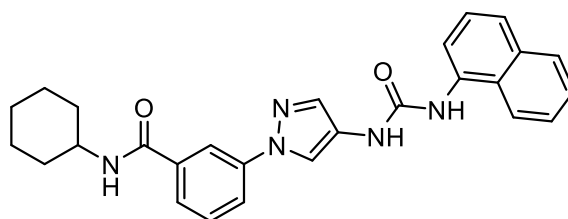
Molekulargewicht: 399,45

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 188 µL 2 M Dimethylamin (MeOH)-Lösung (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Die Reaktion wird mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung versetzt und 2x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 1x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung, 1x mit 1 M HCl (aq.)-Lösung sowie 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung. Folgend wird die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiß-gelber FS (Ausbeute: 23 mg (31 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.97 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.91 – 7.86 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.51 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.01 (s, 3H), 2.94 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.3, 152.8, 139.6, 137.9, 134.4, 133.7, 133.3, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.9, 122.9, 121.4, 118.3, 117.3, 116.4, 116.0, 34.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3295, 3046, 2924, 1606, 1581, 1549, 1482, 1388, 1341, 1252; DC-MS(ESI) *m/z*: 422.0 [M+Na]⁺; 398.1 [M-H]⁻; 434.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 400.17672; detektiert: 400.1776; HPLC *t*_{ret} = 6,96 min.

N-Cyclohexyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-36**)



Summenformel: C₂₇H₂₇N₅O₂

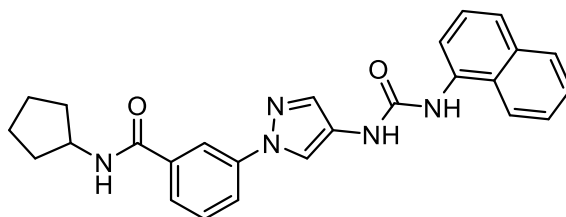
Exakte Masse: 453,22

Molekulargewicht: 453,55

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 µL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 37 µL Cyclohexanamin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et₂O gewaschen, via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 0/100 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: 39 mg (53 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.98 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.41 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.24 – 8.18 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.05 – 8.00 (m, 1H), 7.97 – 7.91 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.86 – 3.73 (m, J = 7.2, 3.4 Hz, 1H), 1.91 – 1.69 (m, 4H), 1.62 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 1.40 – 1.24 (m, 4H), 1.19 – 1.06 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.6, 152.8, 139.7, 136.2, 134.4, 133.7, 133.1, 129.5, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.0, 121.4, 120.2, 117.4, 116.5, 116.4, 48.5, 32.4, 25.3, 25.0; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3273, 2930, 2852, 1633, 1585, 1539, 1486, 1388, 1328, 1236; DC-MS(ESI) *m/z*: 476.0 [M+Na]⁺; 452.1 [M-H]⁻; 487.7 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 454.22368; detektiert: 454.2241; HPLC *t*_{ret} = 8,88 min.

N-Cyclopentyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-37**)Summenformel: C₂₆H₂₅N₅O₂

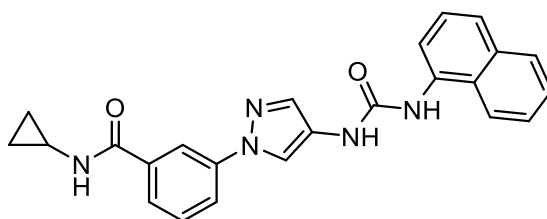
Exakte Masse: 439,20

Molekulargewicht: 439,52

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

57 mg P-35 (Kaliumsalz) (0,139 mmol; 1 eq.), 49 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,277 mmol; 2 eq.) und 53 mg EDC·HCl (0,277 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 15 mL trockenem DCM suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 145 µL DIPEA (0,833 mmol; 6 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 27 µL Cyclopentylamin (0,277 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird mit EtOAc wieder aufgenommen. Folgend wird die organische Phase 1x mit demin. H₂O, 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NH₄Cl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockenen eingeeengt. Das *crude* Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 35 mg (57 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.50 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.98 – 7.91 (m, J = 10.2, 4.2 Hz, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, J = 10.6, 6.8, 1.9 Hz, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.31 – 4.20 (m, 1H), 1.97 – 1.85 (m, 2H), 1.78 – 1.65 (m, 2H), 1.62 – 1.49 (m, J = 9.0, 4.6 Hz, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.2, 152.8, 139.7, 136.1, 134.4, 133.7, 133.1, 129.4, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.0, 121.4, 120.2, 117.4, 116.5, 116.4, 51.0, 32.1, 23.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3284, 3248, 3058, 2954, 2866, 1646, 1633, 1584, 1542, 1486; DC-MS(ESI) *m/z*: 438.2 [M-H]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 440.20803; detektiert: 440.2076; HPLC *t*_{ret} = 8,50 min.

N-Cyclopropyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-38**)Summenformel: C₂₄H₂₁N₅O₂

Exakte Masse: 411,17

Molekulargewicht: 411,47

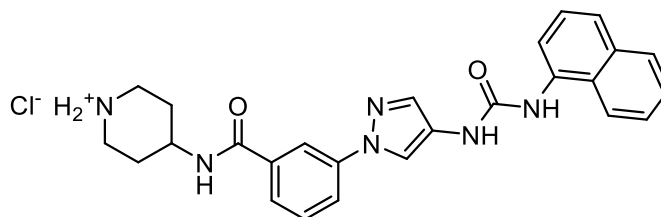
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 µL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 32 µL Cyclopropylamin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weißer FS (Ausbeute: 61 mg (92 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.98 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.64 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.95 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.72 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.67 – 7.52 (m, 4H), 7.48 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 2.93 – 2.82 (m, 1H), 0.77 – 0.68 (m, 2H), 0.65 – 0.54 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.7, 152.8, 139.7, 135.7, 134.4, 133.7, 133.1, 129.5, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.5, 123.0, 121.4, 120.3, 117.4, 116.4, 116.2, 23.1, 5.8; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3267, 3083, 3047, 3005, 1640, 1586, 1558, 1528, 1491, 1384; DC-MS(ESI) *m/z*: 444.9 [M+H+MeOH]⁺; 410.0 [M-H]⁻; 445.8 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 412.17672; detektiert: 412.1772; HPLC *t*_{ret} = 7,41 min.

4-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)piperidin-1-iumchlorid

(P-39)



Summenformel: C₂₆H₂₇ClN₆O₂

Exakte Masse: 490,19

Molekulargewicht: 490,99

Die Synthese wird nach ASV-2a & ASV-8 durchgeführt.

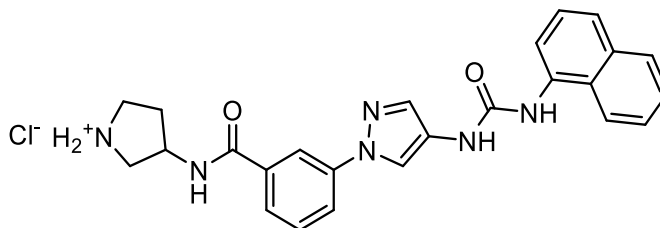
Schritt 1: 60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 µL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 64 mg 4-Amino-1-Boc-piperidin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, mit demin H₂O und Et₂O gewaschen und zur Massenkonstanz getrocknet

Schritt 2: Das Intermediat von Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst und 0,645 mL 1,25 M HCl (EtOH) (0,806 mmol; 5 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird auf 60 °C für 20 h erhitzt. Das Lösemittel wird abgenommen und das Produkt am Hochvakuum wird bis zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beigen FS (Ausbeute: 66 mg (83 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.72 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.99 – 8.81 (m, 2H), 8.73 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.35 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.09 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.98 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.59 – 7.51 (m, 3H), 7.47 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.16 – 4.05 (m, 1H), 3.32 (d, J = 12.5 Hz, 2H), 3.02 (dd, J = 21.8, 11.5 Hz, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 2H), 1.88 – 1.75 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.2, 153.0, 139.7, 135.6, 134.7, 133.8, 133.0, 129.5, 128.3, 125.9, 125.8, 125.6, 124.9, 124.8, 122.6, 121.8, 120.4, 116.7, 116.5, 116.2, 44.5, 42.2, 28.2; FTIR [cm⁻¹]: 3241, 3035, 2928, 2725, 2486, 1583, 1540, 1488, 1388, 1341; DC-MS(ESI) *m/z*: 455.4 [M+H]⁺; 477.4 [M+Na]⁺; 453.4 [M-H]⁻; 489.5 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 455.21892; detektiert: 455.2177; HPLC *t*_{ret} = 5,06 min.

3-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)pyrrolidin-1-iumchlorid

(P-40)

Summenformel: C₂₅H₂₅ClN₆O₂

Exakte Masse: 476,17

Molekulargewicht: 476,97

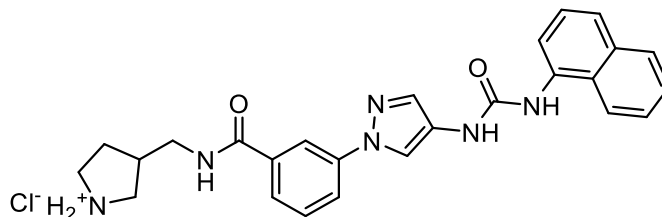
Die Synthese wird nach ASV-2a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 µL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 60 mg (*RS*)-1-Boc-3-aminopyrrolidin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, mit demin H₂O und Et₂O gewaschen und zur Massenkonstanz getrocknet

Schritt 2: Das Intermediat von Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst und 0,645 mL 1,25 M HCl (EtOH) (0,806 mmol; 5 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird auf 60 °C für 20 h erhitzt. Das Lösemittel wird abgenommen und das Produkt am Hochvakuum wird bis zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beige-gelben FS (Ausbeute: 45 mg (59 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.62 (s, 1H), 9.35 – 9.17 (m, J = 17.4 Hz, 3H), 8.95 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.34 – 8.29 (m, J = 7.9 Hz, 2H), 8.08 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.80 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.64 – 7.51 (m, 4H), 7.47 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.62 – 4.53 (m, 1H), 3.48 – 3.35 (m, 2H), 3.31 – 3.20 (m, 2H), 2.22 (dq, J = 14.8, 7.5 Hz, 1H), 2.06 (td, J = 13.0, 6.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 153.0, 139.7, 135.2, 134.7, 133.7, 133.1, 129.6, 128.3, 125.9, 125.8, 125.6, 124.9, 124.8, 122.6, 121.7, 120.6, 116.7, 116.5, 116.3, 49.2, 49.1, 43.6, 29.8; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3246, 2958, 2748, 2087, 1647, 1539, 1490, 1388, 1341, 1252; DC-MS(ESI) *m/z*: 441.4 [M+H]⁺; 439.4 [M-H]⁻; 475.3 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 441.20327; detektiert: 441.2032; HPLC *t*_{ret} = 4,97 min.

3-((3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)methyl)pyrrolidin-1-iumchlorid (**P-41**)



Summenformel: C₂₆H₂₇ClN₆O₂

Exakte Masse: 490,19

Molekulargewicht: 490,99

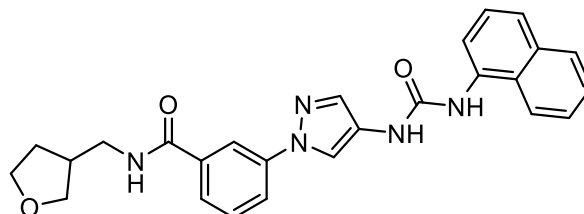
Die Synthese wird nach ASV-2a & ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 µL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 64 mg (*RS*)-1-Boc-3-(aminomethyl)pyrrolidin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, mit demin H₂O und Et₂O gewaschen und zur Massenkonzanz getrocknet

Schritt 2: Das Intermediat von Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst und 0,645 mL 1,25 M HCl (EtOH) (0,806 mmol; 5 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird auf 60 °C für 20 h erhitzt. Das Lösemittel wird abgenommen und das Produkt am Hochvakuum wird bis zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beigen FS (Ausbeute: 14 mg (18 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.68 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 9.09 (br s, 2H), 8.93 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.34 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.08 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 – 7.51 (m, 4H), 7.47 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.41 – 3.34 (m, 2H), 3.32 – 3.19 (m, 2H), 3.17 – 3.07 (m, 1H), 2.97 – 2.89 (m, 1H), 2.61 – 2.54 (m, 1H), 2.08 – 1.97 (m, 1H), 1.69 (dq, J = 13.0, 8.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.9, 153.0, 139.8, 135.5, 134.7, 133.7, 133.0, 129.6, 128.3, 125.9, 125.8, 125.6, 124.9, 124.6, 122.6, 121.8, 120.4, 116.7, 116.2, 47.7, 44.3, 40.9, 37.9, 27.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3261, 3047, 2751, 1636, 1539, 1490, 1388, 1342, 1252, 1169; DC-MS(ESI) *m/z*: 455.4 [M+H]⁺; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 455.21892; detektiert: 455.2182; HPLC *t*_{ret} = 5,06 min.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-((tetrahydrofuran-3-yl)methyl)benzamid (**P-42**)



Summenformel: C₂₆H₂₅N₅O₃

Exakte Masse: 455,20

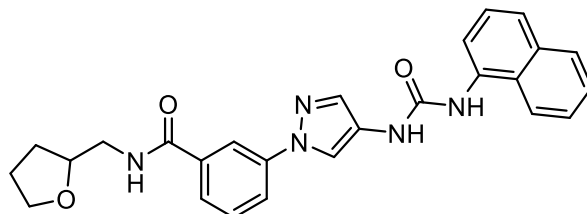
Molekulargewicht: 455,52

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 µL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 33 µL (*RS*)-(Tetrahydrofuran-3-yl)methylamin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 3/97 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 40 mg (54 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.79 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.27 – 8.20 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.06 – 8.01 (m, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 1H), 7.95 – 7.92 (m, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.76 (td, J = 8.0, 5.8 Hz, 1H), 3.70 (dd, J = 8.5, 7.0 Hz, 1H), 3.63 (dd, J = 14.8, 7.9 Hz, 1H), 3.51 (dd, J = 8.5, 5.2 Hz, 1H), 3.33 – 3.20 (m, 2H), 2.54 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 2.02 – 1.90 (m, 1H), 1.68 – 1.57 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.6, 152.8, 139.8, 135.8, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.6, 123.0, 121.4, 120.3, 117.4, 116.4, 116.3, 70.5, 66.8, 42.0, 38.9, 29.5; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3288, 3253, 3101, 3070, 2959, 2850, 1647, 1584, 1546, 1483; DC-MS(ESI) *m/z*: 478.2 [M+Na]⁺; 454.2 [M-H]⁻; 489.8 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 456.20294; found: 456.2033; HPLC *t*_{ret} = 7,20 min.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)benzamid (**P-43**)



Summenformel: C₂₆H₂₅N₅O₃

Exakte Masse: 455,20

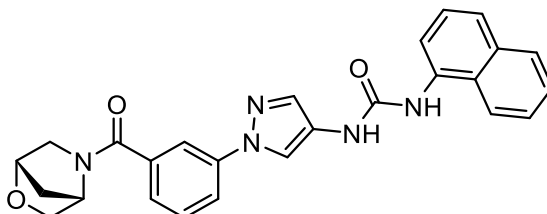
Molekulargewicht: 455,52

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 µL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 33 µL (*RS*)-Tetrahydrofurfurylamin (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 52 mg (71 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.77 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.25 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 7.99 – 7.95 (m, 1H), 7.95 – 7.91 (m, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.79 – 7.73 (m, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.01 (p, J = 6.3 Hz, 1H), 3.83 – 3.75 (m, 1H), 3.64 (dd, J = 14.3, 7.6 Hz, 1H), 3.35 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 1.98 – 1.75 (m, 3H), 1.65 – 1.55 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.6, 152.8, 139.7, 135.7, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.6, 123.0, 121.4, 120.3, 117.3, 116.5, 116.5, 77.1, 67.1, 43.5, 28.7, 25.1; FTIR [cm⁻¹]: 3260, 2952, 2924, 2855, 1639, 1585, 1540, 1482, 1383, 1314; DC-MS(ESI) *m/z*: 454.0 [M-H]⁻; 489.8 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 456.20294; detektiert: 456.2026; HPLC *t*_{ret} = 7,50 min.

1-(1-(3-((1*S*,4*S*)-2-Oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carbonyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (**P-44**)



Summenformel: C₂₆H₂₃N₅O₃

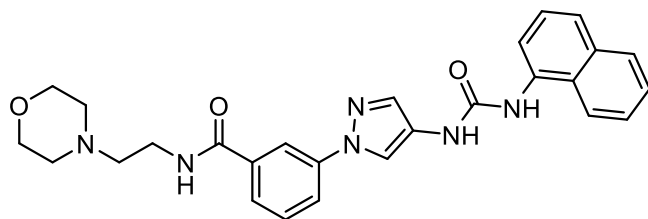
Exakte Masse: 453,18

Molekulargewicht: 453,50

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 168 µL DIPEA (0,967 mmol; 6 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 44 mg (1*S*,4*S*)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 1x mit 1 M HCl (aq.)-Lösung sowie 2x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 1/99 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiße Nadeln (Ausbeute: 46 mg (63 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.01 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.13 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.96 – 7.85 (m, 4H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.51 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 20.3, 7.6 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 74.9 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 75.2 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 24.2, 7.3 Hz, 1H), 3.73 (ddd, J = 33.8, 7.5, 1.2 Hz, 1H), 3.57 – 3.48 (m, 1H), 3.31 (dd, J = 32.8, 10.8 Hz, 1H), 1.93 (ddd, J = 20.8, 10.0, 1.6 Hz, 1H), 1.80 (dd, J = 31.8, 9.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 167.0, 152.8, 139.8, 139.7, 137.7, 137.3, 134.5, 133.7, 133.4, 133.3, 133.3, 129.8, 129.7, 129.1, 128.8, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 124.7, 124.3, 124.1, 122.9, 121.4, 119.3, 119.0, 117.3, 117.2, 116.5, 116.5, 116.4, 116.3, 75.6, 75.1, 73.6, 73.0, 59.9, 57.7, 56.2, 54.3, 36.7, 35.0 (Komplexe Aufspaltung der Signale, wahrscheinlich aufgrund von Rotationsisomerie); ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3292, 3053, 2950, 2876, 1701, 1542, 1465, 1388, 1251, 1206; DC-MS(ESI) *m/z*: 475.8 [M+Na]⁺; 451.8 [M-H]⁻; 487.8 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 454.18729; detektiert: 454.1881; HPLC *t*_{ret} = 6,70 min.

N-(2-Morpholinoethyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-45**)Summenformel: C₂₇H₂₈N₆O₃

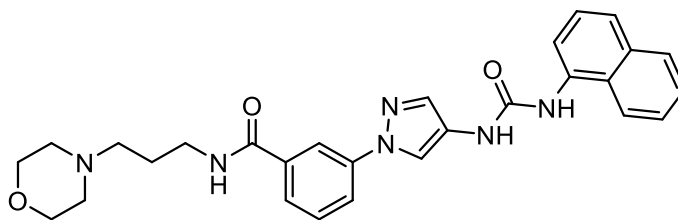
Exakte Masse: 484,22

Molekulargewicht: 484,56

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

40 mg P-35 (0,107 mmol; 1 eq.), 38 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,215 mmol; 2 eq.) und 41 mg EDC·HCl (0,215 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 56 µL DIPEA (0,322 mmol; 3 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 28 µL 4-(2-Aminoethyl)-morpholin (0,215 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit MeOH versetzt und das Lösemittel wird abgenommen. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90 + 2 N NH₃) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 14 mg (27 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.02 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.64 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.26 – 8.21 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.99 – 7.92 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.74 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.58 (t, 4H), 3.42 (dd, J = 13.0, 6.6 Hz, 2H), 2.49 – 2.46 (m, 2H), 2.45 – 2.39 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.4, 152.8, 139.8, 135.8, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 124.5, 123.0, 121.4, 120.3, 117.3, 116.4, 116.2, 66.2, 57.4, 53.3, 36.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3259, 3053, 2926, 2851, 2810, 1636, 1583, 1540, 1487, 1388; DC-MS(EI) *m/z*: 484.8 [M+Na]⁺; 506.9 [M+Na]⁺; 482.8 [M-H]⁻; 518.6 [M+Cl]⁻; HRMS(EI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 485.22949; detektiert: 485.2292; HPLC *t*_{ret} = 4,91 min.

N-(3-Morpholinopropyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid**(P-46)**Summenformel: C₂₈H₃₀N₆O₃

Exakte Masse: 498,24

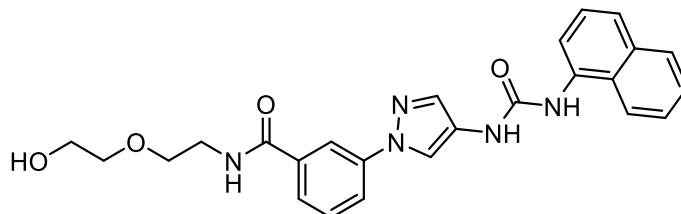
Molekulargewicht: 498,59

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

50 mg P-35 (Kaliumsalz) (0,122 mmol; 1 eq.), 43 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,244 mmol; 2 eq.) und 47 mg EDC·HCl (0,244 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 56 µL DIPEA (0,322 mmol; 3 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 32 µL 4-(3-Aminopropyl)-morpholin (0,244 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 24 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 3/97 – 15/85 + 2 N NH₃) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelb-weißen FS (Ausbeute: 16 mg (26 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.00 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.68 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.25 – 8.20 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 7.98 – 7.91 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.74 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.60 – 3.54 (m, 4H), 3.38 – 3.25 (m, 2H), 2.43 – 2.27 (m, 6H), 1.77 – 1.66 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.4, 152.8, 139.8, 135.9, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.5, 123.0, 121.4, 120.2, 117.3, 116.4, 116.2, 66.2, 56.1, 53.4, 37.9, 26.0; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3297, 3056, 2924, 2851, 2810, 1629, 1582, 1540, 1488, 1388; DC-MS(ESI) *m/z*: 498.9 [M+H]⁺; 520.6 [M+Na]⁺; 496.7 [M-H]⁻; 532.7 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 499.24514; detektiert: 499.2429; HPLC *t*_{ret} = 5,01 min.

N-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-47**)



Summenformel: C₂₅H₂₅N₅O₄

Exakte Masse: 459,19

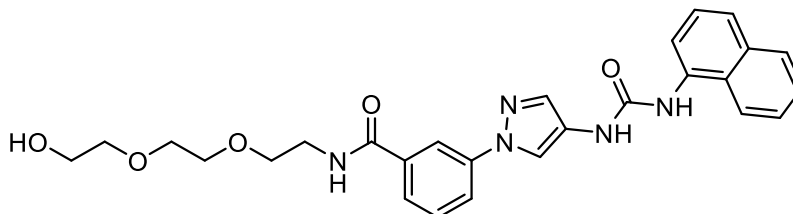
Molekulargewicht: 459,51

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 38 µL 2-(2-Aminoethoxy)ethan-1-ol (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 20 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O und 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird 2x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 48 mg (56 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.73 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.28 – 8.23 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 7.6, 0.7 Hz, 1H), 7.97 (ddd, J = 8.1, 2.2, 0.8 Hz, 1H), 7.95 – 7.91 (m, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.78 – 7.73 (m, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.60 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.57 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.54 – 3.45 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.6, 152.8, 139.8, 135.7, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.5, 123.0, 121.4, 120.3, 117.4, 116.4, 116.3, 72.2, 68.9, 60.2, 39.4; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3265, 2925, 2857, 1639, 1586, 1539, 1484, 1388, 1342, 1307; DC-MS(ESI) *m/z*: 484.2 [M+Na]⁺; 458.0 [M-H]⁻; 494.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 460.19785; detektiert: 460.1982; HPLC *t*_{ret} = 6,66 min.

N-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-48**)



Summenformel: C₂₇H₂₉N₅O₅

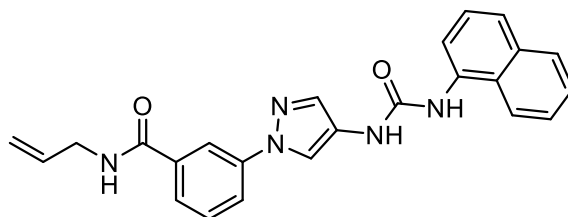
Exakte Masse: 503,22

Molekulargewicht: 503,56

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 52 µL 2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 20 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O und 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird 2x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 72 mg (76 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.75 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.27 – 8.23 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.06 – 8.02 (m, 1H), 7.97 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.95 – 7.92 (m, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.76 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.57 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 3.58 – 3.51 (m, 6H), 3.43 (ddd, J = 10.6, 8.4, 3.4 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.5, 152.8, 139.8, 135.7, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.5, 123.0, 121.4, 120.3, 117.3, 116.4, 116.2, 72.4, 69.7, 69.7, 68.9, 60.2. (ein aliphatisches Signal von DMSO-*peak* verdeckt); DEPT: ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 133.1, 129.6, 128.4, 125.9, 125.9, 125.7, 124.6, 123.0, 121.4, 120.3, 117.3, 116.4, 116.2, 72.4, 69.7, 69.7, 68.9, 60.2, 39.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3274, 2922, 2861, 1638, 1584, 1543, 1487, 1388, 1344, 1216; DC-MS(ESI) *m/z*: 526.3 [M+Na]⁺; 502.3 [M-H]⁻; 538.2 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 504.22407; detektiert: 504.2245; HPLC *t*_{ret} = 6,69 min.

N-Allyl-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-49**)Summenformel: C₂₄H₂₁N₅O₂

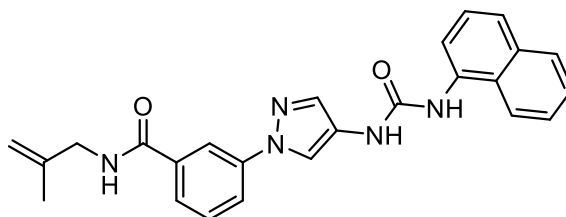
Exakte Masse: 411,17

Molekulargewicht: 411,47

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 8 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 28 µL Allylamin (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 57 mg (74 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.00 (br s, 1H), 8.88 (br s, 2H), 8.61 (s, 1H), 8.27 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.06 – 8.01 (m, 1H), 7.98 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.95 – 7.91 (m, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.78 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 5.93 (ddt, J = 17.1, 10.4, 5.3 Hz, 1H), 5.20 (dq, J = 17.2, 1.7 Hz, 1H), 5.11 (dq, J = 10.3, 1.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.3, 152.8, 139.8, 135.7, 135.3, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 124.6, 123.0, 121.4, 120.4, 117.3, 116.4, 116.2, 115.3, 41.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3285, 3232, 3057, 2906, 1644, 1584, 1539, 1488, 1395, 1344; DC-MS(ESI) *m/z*: 434.1 [M+Na]⁺; 410.2 [M-H]⁻; 446.3 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 412.17672; detektiert: 412.1766; HPLC *t*_{ret} = 7,60 min.

N-(2-Methylallyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-50**)Summenformel: C₂₅H₂₃N₅O₂

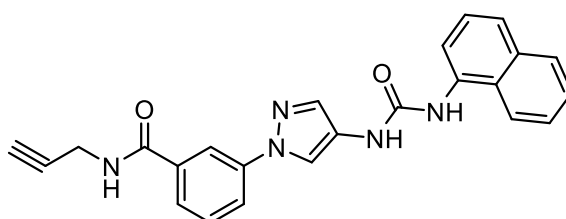
Exakte Masse: 425,19

Molekulargewicht: 425,49

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 8 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 34 µL 2-Methyl-2-propen-1-amin (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 62 mg (78 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.91 – 8.81 (m, 2H), 8.61 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.78 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.84 (d, J = 11.0 Hz, 2H), 3.87 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 1.74 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.3, 152.8, 142.5, 139.8, 135.7, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.6, 123.0, 121.4, 120.4, 117.4, 116.5, 116.2, 110.0, 44.6, 20.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3271, 3069, 2971, 2915, 1642, 1585, 1543, 1485, 1395, 1343; DC-MS(ESI) *m/z*: 448.2 [M+Na]⁺; 424.2 [M-H]⁻; 460.2 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 426.19238; detektiert: 426.1925; HPLC *t*_{ret} = 7,99 min.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamid (**P-51**)Summenformel: C₂₄H₁₉N₅O₂

Exakte Masse: 409,15

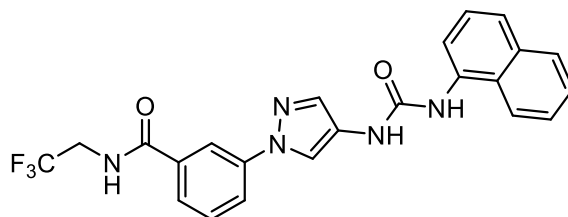
Molekulargewicht: 409,45

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 8 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 24 µL Prop-2-yn-1-amin (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Et₂O gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als cremefarbenen FS (Ausbeute: 70 mg (91 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.16 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.11 (dd, J = 5.3, 2.3 Hz, 2H), 3.17 (t, J = 2.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.2, 152.8, 139.8, 135.0, 134.5, 133.8, 133.1, 129.8, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 124.6, 123.0, 121.4, 120.6, 117.3, 116.4, 116.3, 81.2, 73.1, 28.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3270, 3092, 3047, 1639, 1585, 1559, 1534, 1485, 1394, 1342; DC-MS(ESI) *m/z*: 432.2 [M+Na]⁺; 464.2 [M+Na+MeOH]⁺; 408.3 [M-H]⁻; 444.3 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 410.16107; detektiert: 410.1605; HPLC *t*_{ret} = 7,17 min.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-(2,2,2-trifluorethyl)benzamid (**P-52**)



Summenformel: C₂₃H₁₈F₃N₅O₂

Exakte Masse: 453,14

Molekulargewicht: 453,43

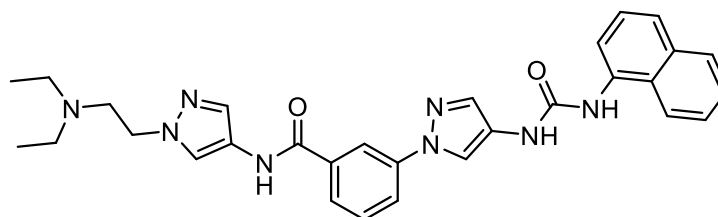
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

70 mg P-35 (0,188 mmol; 1 eq.), 67 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,376 mmol; 2 eq.) und 72 mg EDC·HCl (0,376 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 131 µL DIPEA (0,752 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 30 µL 2,2,2-Trifluorethan-1-amin (0,376 mmol; 2 eq.) zugegeben, die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O

versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 59 mg (69 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.31 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.07 – 8.00 (m, 2H), 7.94 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.66 – 7.53 (m, 4H), 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.14 (qd, $J = 9.7, 6.6$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.2, 152.8, 139.9, 134.5, 134.4, 133.7, 133.2, 129.9, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 124.8 (q, $J = 279.4$ Hz), 124.8, 123.0, 121.4, 121.0, 117.4, 116.4, 40.8 – 39.7 (m); ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3252, 3069, 2958, 1644, 1585, 1545, 1485, 1395, 1319, 1262; DC-MS(ESI) m/z : 452.1 [M-H] $^-$; 488.1 [M+Cl] $^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [M+H] $^+$: 454.14846; detektiert: 454.1492; HPLC $t_{\text{ret}} = 7,94$ min.

N-(1-(2-(Diethylamino)ethyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-53**)



Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}_2$

Exakte Masse: 536,26

Molekulargewicht: 536,64

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

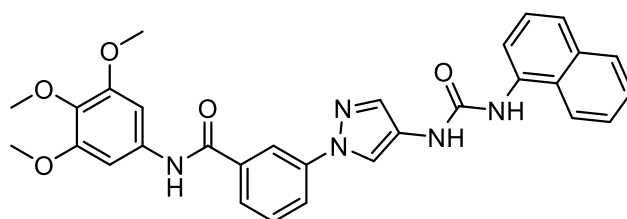
60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 112 μL DIPEA (0,645 mmol; 4 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 59 mg S-34 (0,322 mmol; 2 eq.), gelöst in 4 mL trockenem THF zugegeben. Die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Folgend wird das Lösemittel abgenommen. Der Rückstand wird wieder mit EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wird 3x mit 2 M NaOH (aq.)-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90 + 2 M NH_3) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beiger FS (Ausbeute: 41 mg (47 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.60 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 8.2$ Hz,

Experimenteller Teil

1H), 7.95 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.67 – 7.53 (m, 5H), 7.49 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.14 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.54 – 2.50 (m, 2H), 2.47 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.7, 152.8, 139.9, 135.5, 134.4, 133.7, 133.2, 130.3, 129.8, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 124.7, 123.0, 121.5, 121.4, 121.2, 120.5, 117.4, 116.4, 116.4, 52.5, 50.1, 46.6, 11.9; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3272, 2968, 2927, 2812, 1653, 1647, 1583, 1540, 1491, 1388; DC-MS (ESI) m/z : 537.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 558.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 534.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 570.8 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS (ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 537.27202; detektiert: 537.2704; HPLC $t_{\text{ret}} = 5,45$ min.

3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)benzamid

(P-54)

Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_5$

Exakte Masse: 537,20

Molekulargewicht: 537,58

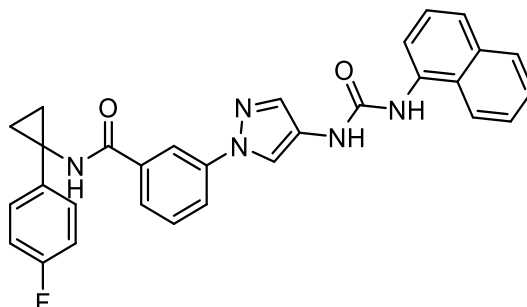
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

60 mg P-35 (0,161 mmol; 1 eq.), 57 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,322 mmol; 2 eq.) und 62 mg EDC·HCl (0,322 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem THF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 84 μL DIPEA (0,483 mmol; 3 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 59 mg 3,4,5-Trimethoxyaniline (0,322 mmol; 2 eq.) zugegeben. Die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 20 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H_2O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als grauen FS (Ausbeute: 65 mg (75 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.33 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.05 – 8.01 (m, 2H), 7.96 – 7.92 (m, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.67 – 7.53 (m, 4H), 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.25 (s, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.66 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.6, 152.8, 152.6, 139.8, 136.2, 135.1, 134.4, 133.9, 133.8, 133.3, 129.7, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.9, 124.8, 123.0, 121.4, 120.7, 117.4, 116.7, 116.5, 98.2, 60.1, 55.8; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3299, 3219, 2933, 2830, 1639, 1597, 1551, 1508, 1449, 1388; DC-MS (ESI) m/z : 560.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 536.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$

; 572.4 [M+Cl]⁻; HRMS (ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 538.20842; detektiert: 538.2081; HPLC *t*_{ret} = 8,19 min.

N-(1-(4-Fluorphenyl)cyclopropyl)-3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-55**)



Summenformel: C₃₀H₂₄FN₅O₂

Exakte Masse: 505,19

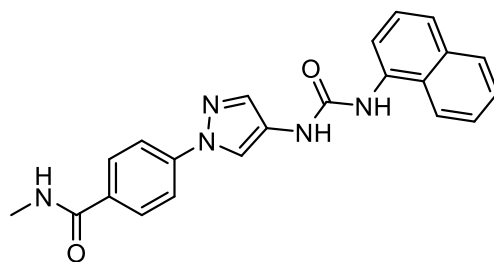
Molekulargewicht: 505,55

Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

85 mg P-35 (0,2283 mmol; 1 eq.), 73 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,4109 mmol; 1,8 eq.) und 79 mg EDC·HCl (0,4109 mmol; 1,8 eq.) werden vorgelegt und in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt, dann wird 179 µL DIPEA (1,027 mmol; 4,5 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 5 min. gerührt. Folgend wird 77 mg 1-(4-Fluorphenyl)cyclopropan-1-amin·HCl (0,4109 mmol; 1,8 eq.) zugegeben. Die Kühlung wird entfernt und der Ansatz wird für 18 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, mit Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 82 mg (71 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.41 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.14 – 7.07 (m, 2H), 1.32 – 1.24 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.9, 160.5 (d, *J* = 241.5 Hz), 152.8, 139.8, 139.5 (d, *J* = 2.8 Hz), 135.6, 134.4, 133.7, 133.1, 129.6, 128.4, 127.0 (d, *J* = 8.0 Hz), 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 124.7, 123.0, 121.4, 120.5, 117.3, 116.5, 116.3, 114.7 (d, *J* = 21.3 Hz), 34.2, 17.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3274, 1644, 1586, 1559, 1511, 1490, 1388, 1343, 1232, 1163; DC-MS (ESI) *m/z*: 527.8 [M+Na]⁺, 504.0 [M-H]⁻; 540.0 [M+Cl]⁻; HRMS (ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 506.19860; detektiert: 506.1994; HPLC *t*_{ret} = 8,83 min.

7.5.6 Synthese der in Kapitel 5.1.5.3 beschriebenen Testverbindungen

N-Methyl-4-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-56**)Summenformel: C₂₂H₁₉N₅O₂

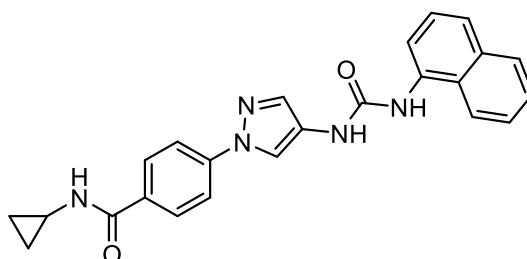
Exakte Masse: 385,15

Molekulargewicht: 385,43

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

65 mg S-88 (0,175 mmol; 1 eq.) sowie 100 mg HATU (0,262 mmol; 1,5 eq.) werden in 8 mL trockenem DMF gelöst. 89 μ L DIPEA (0,524 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 18 h bei RT gerührt. Folgend wird 175 μ L 2 M Methylamin (THF)-Lösung (0,349 mmol; 2 eq.) zugegeben und die Reaktion wird bei RT für 24 h rühren gelassen. Die entstehende Mischung wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch FS präzipitiert. Dieser wird abfiltriert, und in THF wieder aufgenommen. Die Lösung wird mit MeOH versetzt und THF wird am Rotationverdampfer wieder abgenommen. Der ausfallende FS wird abfiltriert und gründlich mit MeOH, Et₂O sowie Pentan gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beigen FS (Ausbeute: 26 mg (39 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.51 – 8.40 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.99 – 7.84 (m, 6H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.57 (dt, J = 14.6, 6.8 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 2.80 (d, J = 3.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 152.8, 141.5, 134.4, 133.7, 133.7, 131.4, 128.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 125.0, 123.0, 121.4, 117.3, 117.1, 116.3, 26.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3261, 3092, 3055, 1636, 1610, 1593, 1554, 1508, 1502, 1405; DC-MS(ESI) *m/z*: 407.9 [M+Na]⁺; 384.0 [M-H]⁻; 420.2 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 386.16107; detektiert: 386.1625; HPLC *t*_{ret} = 6,72 min.

N-Cyclopropyl-4-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-57**)Summenformel: C₂₄H₂₁N₅O₂

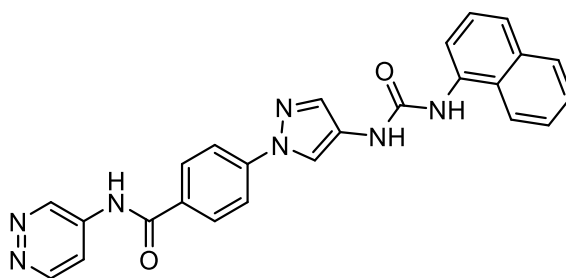
Exakte Masse: 411,17

Molekulargewicht: 411,47

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

65 mg S-88 (0,175 mmol; 1 eq.) sowie 100 mg HATU (0,262 mmol; 1,5 eq.) werden in 8 mL trockenem DMF gelöst. 89 µL DIPEA (0,524 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 18 h bei RT gerührt. Folgend wird 24 µL Cyclopropylamin (0,349 mmol; 2 eq.) zugegeben und die Reaktion wird bei RT für 24 h rühren gelassen. Die entstehende Mischung wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch FS präzipitiert. Dieser wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißlichen FS (Ausbeute: 68 mg (95 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.47 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.97 – 7.85 (m, 6H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 2H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 2.91 – 2.81 (m, 1H), 0.75 – 0.66 (m, 2H), 0.62 – 0.52 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.6, 152.8, 141.5, 134.4, 133.7, 133.6, 131.2, 128.7, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 125.0, 123.0, 121.4, 117.4, 117.0, 116.3, 23.1, 5.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3265, 3094, 3011, 1636, 1610, 1591, 1540, 1508, 1500, 1457; DC-MS(ESI) *m/z*: 433.9 [M+Na]⁺; 410.1 [M-H]⁻; 446.0 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 412.17672; detektiert: 412.1770; HPLC *t*_{ret} = 7,23 min.

4-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-(pyridazin-4-yl)benzamid (**P-58**)Summenformel: C₂₅H₁₉N₇O₂

Exakte Masse: 449,16

Molekulargewicht: 449,47

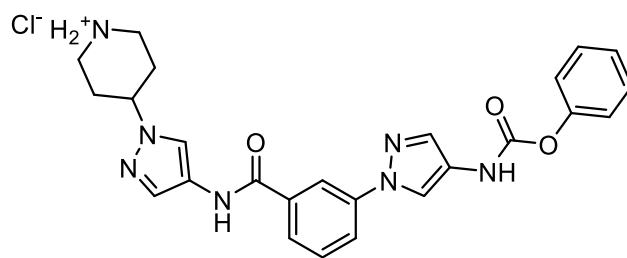
Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

65 mg S-88 (0,175 mmol; 1 eq.) sowie 100 mg HATU (0,262 mmol; 1,5 eq.) werden in 8 mL trockenem DMF gelöst. 89 μ L DIPEA (0,524 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 18 h bei RT gerührt. Folgend wird 33 mg pyridazin-4-amin (0,349 mmol; 2 eq.) zugegeben und die Reaktion wird bei RT für 24 h rühren gelassen. Die entstehende Mischung wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch FS präzipitiert. Dieser wird abfiltriert und mit DCM, MeOH, Et₂O, Pentan sowie Kleinstmengen an DMF gewaschen und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelb-beigen FS (Ausbeute: 31 mg (40 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.84 (s, 1H), 9.55 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 9.09 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.18 – 8.09 (m, 4H), 8.07 – 8.00 (m, 3H), 7.96 – 7.92 (m, 2H), 7.66 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.58 (dt, J = 14.6, 7.0 Hz, 2H), 7.49 (t, J = 7.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.1, 152.8, 151.5, 144.0, 142.6, 138.3, 134.4, 134.1, 133.7, 130.1, 129.7, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 125.2, 123.1, 121.4, 117.4, 117.2, 116.4, 114.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3266, 3049, 1685, 1595, 1571, 1554, 1530, 1502, 1391, 1342; ESI-MS *m/z*: 471.8 [M+Na]⁺; 447.9 [M-H]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 450,16722; detektiert: 450,1682; HPLC *t*_{ret} = 7,18 min.

7.5.7 Synthese der in Kapitel 5.1.6 beschriebenen Testverbindungen

4-(4-(3-(4-((Phenoxycarbonyl)amino)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-59**)



Summenformel: C₂₅H₂₆ClN₇O₃

Exakte Masse: 507,18

Molekulargewicht: 507,98

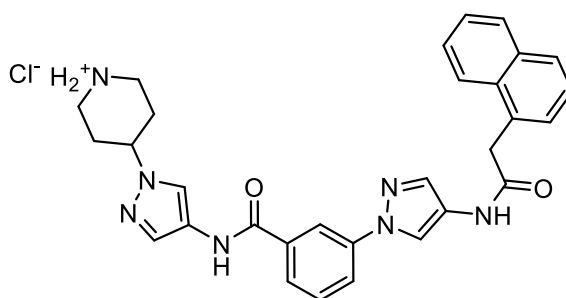
Schritt 2 wird nach ASV-8 durchgeführt.

Schritt 1: 58 μ L Phenylchlorformiat (0,465 mmol; 1 eq.) wird in 5 mL trockenem THF gelöst. 210 mg S-6 (0,465 mmol; 1 eq.) wird in 2x 7 mL trockenem THF gelöst und zugegeben sowie 65 μ L TEA (0,465 mmol; 1 eq.). Die Reaktion wird für 2 h bei RT gerührt. Folgend wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM 2/98 – 10/90) aufgereinigt.

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst und 1,295 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,618 mmol; 5 eq.) wird zugegeben. Der Ansatz wird für 24 h bei 60 °C rühren gelassen. Folgend wird das Lösemittel abgenommen und das Produkt wird am Hochvakuum zur Massekonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiße Kristalle (Ausbeute: 90 mg (55 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.73 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 9.16 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 8.93 (q, $J = 9.9$ Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.00 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.63 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.25 (dd, $J = 17.9, 7.6$ Hz, 3H), 4.51 (dt, $J = 14.8, 7.6$ Hz, 1H), 3.38 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 3.11 – 2.99 (m, 2H), 2.21 – 2.12 (m, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.7, 151.8, 150.7, 139.7, 135.4, 133.1, 130.5, 129.8, 129.4, 125.4, 125.0, 124.0, 121.8, 121.6, 120.8, 119.3, 117.1, 116.7, 55.1, 42.2, 28.7; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3364, 3229, 3090, 2924, 2822, 2789, 2708, 2478, 1724, 1653; LC-MS(APCI) m/z : 471.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 506.1 $[\text{M}+\text{Cl}]$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 472.20909; detektiert: 472.2081; HPLC $t_{\text{ret}} = 4,90$ min.

4-(4-(3-(4-(2-(Naphthalen-1-yl)acetamid)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid)-1H-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-60**)



Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{ClN}_7\text{O}_2$

Exakte Masse: 555,21

Molekulargewicht: 556,07

Die Synthese wird nach ASV-2a & ASV-8 durchgeführt.

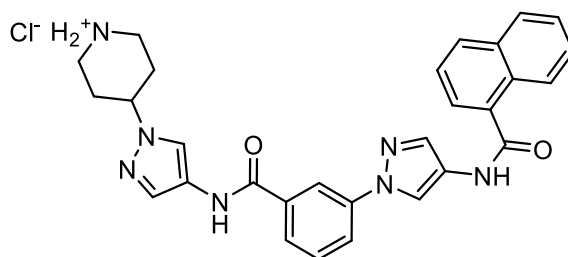
Schritt 1: 100 mg S-6 (0,221 mmol; 1 eq.), 41 mg 2-(Naphthalen-1-yl)essigsäure (0,221 mmol; 1 eq.), 85 mg EDC·HCl (0,443 mmol; 2 eq.) und 79 mg HOBt (Monohydrat) (0,443 mmol; 2 eq.) (enthält 14 % Wasser), werden unter Eis-Wasserbad-Kühlung in 10 mL trockenem DCM gelöst. 116 μL DIPEA (0,664 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und der Reaktion wird für 30 min. gerührt. Folgend wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird mit EtOAc und demin. H_2O versetzt. Die Mischung wird 2x mit ges. NH_4Cl (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaHCO_3 (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 1.5/98.5 – 10/90).

Experimenteller Teil

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 6 mL EtOH gelöst, 1,772 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (2,215 mmol; 10 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 24 h bei 60 °C rühren gelassen. Folgend wird das Lösemittel abgenommen. Der Rückstand wird in Et₂O suspendiert, abfiltriert und am Hochvakuum zur Massekonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beige-weißen FS (Ausbeute: 75 mg (61 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.75 (s, 1H), 10.70 (s, 1H), 9.23 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 8.99 (dd, J = 19.6, 10.2 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.32 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.20 – 8.16 (m, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.99 – 7.91 (m, 2H), 7.88 – 7.82 (m, 3H), 7.70 – 7.66 (m, 1H), 7.63 – 7.46 (m, 5H), 4.53 – 4.47 (m, 1H), 4.16 (s, 2H), 3.41 – 3.33 (m, 2H), 3.11 – 2.96 (m, 2H), 2.20 – 2.11 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 162.7, 139.7, 135.3, 133.4, 133.2, 132.4, 132.0, 130.6, 129.8, 128.4, 127.9, 127.3, 126.1, 125.7, 125.5, 125.0, 124.3, 124.1, 121.6, 120.7, 119.4, 117.5, 116.5, 55.1, 42.2, 39.8, 28.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3209, 3044, 2787, 2703, 1653, 1584, 1395, 1306, 1276, 1166; DC-MS(ESI) *m/z*: 520.4 [M+H]⁺; 554.4 [M+Cl]⁺; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 520.24547; detektiert: 520.2447; HPLC *t*_{ret} = 6,77 min.

4-(4-(3-(4-(1-Naphthamido)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-61**)



Summenformel: C₂₉H₂₈ClN₇O₂

Exakte Masse: 541,20

Molekulargewicht: 542,04

Die Synthese wird nach ASV-2a & ASV-8 durchgeführt.

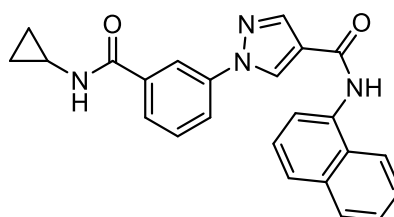
Schritt 1: 100 mg S-6 (0,221 mmol; 1 eq.), 38 mg 1-Naphthoesäure (0,221 mmol; 1 eq.), 85 mg EDC·HCl (0,443 mmol; 2 eq.) und 79 mg HOBt (Monohydrat) (0,443 mmol; 2 eq.) (enthält 14 % Wasser), werden unter Eis-Wasserbad-Kühlung in 10 mL trockenem DCM gelöst. 116 µL DIPEA (0,664 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und der Reaktion wird für 30 min. gerührt. Folgend wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird mit EtOAc und demin. H₂O versetzt. Die Mischung wird 2x mit ges. NH₄Cl (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Produkt wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 1/99 – 8/92).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst, 1 mL 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,329 mmol; 6 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 6 h bei 60 °C rühren gelassen. Folgend wird das Lösemittel abgenommen. Der Rückstand wird in Et₂O suspendiert, abfiltriert und am Hochvakuum zur Massekonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiß-gelben FS (Ausbeute: 53 mg (44 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.93 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.21 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 8.98 (dd, J = 19.5, 9.9 Hz, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.41 (t, 1H), 8.32 – 8.26 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.10 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 8.05 – 8.00 (m, J = 6.2, 3.4 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.91 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 7.0, 0.9 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.69 – 7.57 (m, 4H), 4.59 – 4.47 (m, 1H), 3.39 (d, J = 12.8 Hz, 2H), 3.12 – 2.98 (m, 2H), 2.26 – 2.12 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.9, 162.8, 139.8, 135.4, 133.7, 133.6, 133.2, 130.6, 130.4, 129.8, 129.8, 128.3, 127.0, 126.4, 125.6, 125.1, 125.0, 125.0, 124.2, 121.6, 120.9, 119.3, 117.8, 116.7, 55.1, 42.1, 28.6; FTIR [cm⁻¹]: 3235, 3046, 2932, 2793, 2711, 2492, 1641, 1584, 1388, 1282; DC-MS(ESI) *m/z*: 506.4 [M+H]⁺; 539.6 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 506.22982; detektiert: 506.2264; HPLC *t*_{ret} = 9,74 min.

1-(3-(Cyclopropylcarbamoyl)phenyl)-*N*-(naphthalen-1-yl)-1*H*-pyrazole-4-carboxamid

(P-62)



Summenformel: C₂₄H₂₀N₄O₂

Exakte Masse: 396,16

Molekulargewicht: 396,45

Schritt 2 wird nach ASV-2b durchgeführt.

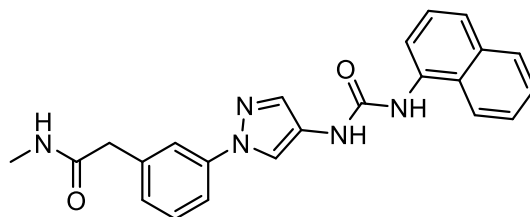
Schritt 1: 55 mg von S-9 (0,203 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL von trockenem DCM suspendiert. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 21 µL Oxalylchlorid (0,243 mmol; 1,2 eq.) und eine katalytische Menge DMF werden zugegeben. Die Kühlung wird nach 10 min. entfernt und die Reaktion wird 3 h bei RT rühren gelassen. Der Ansatz wird hierauf mit 20 mL THF versetzt und weitere 3 h bei 35-40°C rühren gelassen. Es wird wiederum 21 µL Oxalsäure zugegeben und eine weitere h gerührt. Nachdem Monitoring via DC eine vollständige Umsetzung zur aktivierten Carbonsäure-Komponente anzeigt, wird das Lösemittel vollständig abgenommen.

Schritt 2: Der Rückstand aus Schritt 1 sowie 29 mg 1-Naphthylamin (0,2027 mmol; 1 eq.) werden in 8 mL trockenem Pyridin unter Eis-Kühlung gelöst. Nach wenigen Minuten wird

die Kühlung entfernt und der Ansatz wird 14 h rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit EtOAc versetzt und 3x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird 2x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 1/99 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als weißes Pulver (Ausbeute: 37 mg (46 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.26 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.66 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.38 – 8.33 (m, 1H), 8.10 – 8.05 (m, 2H), 8.01 – 7.97 (m, 1H), 7.88 – 7.82 (m, 2H), 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.59 – 7.54 (m, 3H), 2.90 (tq, J = 7.9, 4.0 Hz, 1H), 0.77 – 0.70 (m, 2H), 0.64 – 0.58 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.5, 160.8, 141.0, 139.1, 135.8, 133.8, 133.3, 130.0, 129.8, 128.9, 128.1, 126.1, 126.1, 126.0, 125.8, 125.6, 123.5, 123.3, 121.3, 120.6, 117.4, 23.1, 5.8. ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3261, 3116, 3080, 3053, 3006, 2921, 1630, 1592, 1559, 1512; DC-MS(ESI) *m/z*: 419.0 [M+Na]⁺; 451.1 [M+Na+MeOH]⁺ 395.1 [M-H]⁻; 431.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 397.16583; detektiert: 397.1657; HPLC *t*_{ret} = 7,30 min.

N-Methyl-2-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetamid (**P-63**)



Summenformel: C₂₃H₂₁N₅O₂

Exakte Masse: 399,17

Molekulargewicht: 399,45

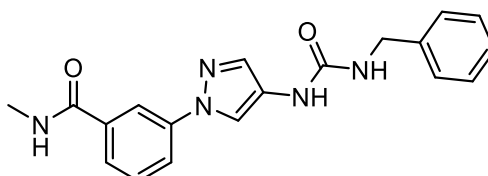
Die Synthese wird nach ASV-2a durchgeführt.

50 mg S-30 (0,129 mmol; 1 eq.), 46 mg HOBt Monohydrat (enthält 14 wt.% Wasser) (0,259 mmol; 2 eq.) und 50 mg EDC·HCl (0,259 mmol; 2 eq.) werden vorgelegt und in 8 mL trockenem DMF suspendiert. Es werden 66 µL DIPEA (0,388 mmol; 3 eq.) sowie 129 µL 2 M Methylamin (THF)-Lösung (0,259 mmol; 2 eq.) zugegeben und der Ansatz wird für 20 h bei RT rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit demin. H₂O versetzt, wodurch das Produkt präzipitiert. Das Produkt wird abfiltriert, getrocknet, via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 2,5/97,5 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonzanz weiter getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 14 mg (27 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.96 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.06 – 7.98 (m, 2H), 7.96 – 7.91 (m, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.75 – 7.71 (m, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.62 – 7.53 (m, 2H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.15 (d, J =

7.6 Hz, 1H), 3.47 (s, 2H), 2.59 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 170.2, 152.8, 139.7, 138.0, 134.5, 133.8, 132.7, 129.3, 128.4, 126.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.5, 123.0, 121.4, 118.5, 117.3, 116.2, 115.8, 42.3, 25.7; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3289, 3087, 3057, 1641, 1601, 1552, 1498, 1454, 1415, 1390; ESI-MS m/z : 422.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 398.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 434.2 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HPLC $t_{\text{ret}} = 7,00$ min.

3-(4-(3-Benzylharnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)-*N*-methylbenzamid (**P-64**)



Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2$

Exakte Masse: 349,15

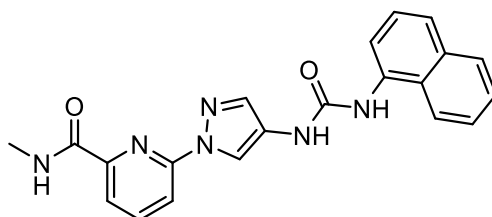
Molekulargewicht: 349,39

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

70 mg S-32 (0,324 mmol; 1 eq.) wird in 8 mL trockenem DCM suspendiert. 51 μL Benzylisocyanat (0,324 mmol; 1 eq.) wird bei RT zugegeben, sowie 165 μL DIPEA (0,971 mmol; 3 eq.). Nach 72 h wird das Lösemittel abgenommen und das Produkt wird via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als gelben FS (Ausbeute: 33 mg (29 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.67 – 8.58 (m, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.18 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J = 8.1, 1.3$ Hz, 1H), 7.74 – 7.67 (m, 2H), 7.54 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.36 – 7.29 (m, 4H), 7.26 – 7.21 (m, 1H), 6.77 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.81 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.8, 158.7, 155.1, 140.9, 140.6, 139.8, 135.7, 132.9, 129.6, 128.3, 128.2, 127.1, 127.0, 126.7, 126.5, 125.5, 124.2, 120.0, 115.9, 43.0, 42.8, 26.3; FTIR [cm^{-1}]: 3288, 3087, 3062, 3027, 1633, 1583, 1543, 1490, 1388, 1318; DC-MS(ESI) m/z : 371.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 347.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 383.9 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 350.16107; detektiert: 350.1619; HPLC $t_{\text{ret}} = 6,09$ min.

7.5.8 Synthese der in Kapitel 5.1.7 beschriebenen Testverbindungen

N-Methyl-6-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)picolinamid (**P-65**)Summenformel: C₂₁H₁₈N₆O₂

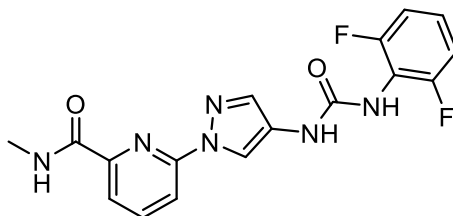
Exakte Masse: 386,15

Molekulargewicht: 386,42

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

35 mg S-62 (0,161 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL trockenem THF gelöst und 23 µL 1-Naphthylisocyanat (0,161 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird für 24 h bei RT rühren gelassen wobei das Produkt ausfällt. Der FS wird abfiltriert. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 16 mg (26 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.09 (s, 1H), 9.03 – 8.93 (m, 2H), 8.89 (s, 1H), 8.15 – 8.02 (m, 4H), 7.97 – 7.92 (m, 2H), 7.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.49 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.88 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.7, 152.9, 150.0, 148.9, 140.6, 135.3, 134.4, 133.7, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.1, 121.4, 119.0, 117.5, 117.1, 113.9, 26.0; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3273, 3109, 3051, 1634, 1600, 1579, 1465, 1381, 1267, 1218; DC-MS(ESI) *m/z*: 408.8 [M+Na]⁺; 384.9 [M-H]⁻; 420.9 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 387.15632; detektiert: 387.1547; HPLC *t*_{ret} = 7,47 min.

6-(4-(3-(2,6-Difluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-methylpicolinamid (**P-66**)Summenformel: C₁₇H₁₄F₂N₆O₂

Exakte Masse: 372,11

Molekulargewicht: 372,34

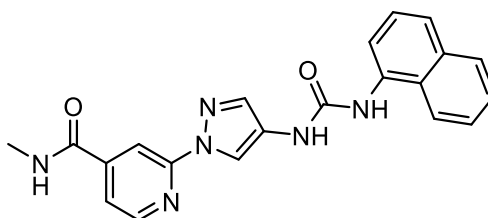
Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

70 mg S-62 (0,322 mmol; 1 eq.) wird in 8 mL trockenem THF gelöst und 50 µg 2,6-Difluorphenylisocyanat (0,322 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird für 24 h bei

RT rühren gelassen wobei das Produkt ausfällt. Der FS wird abfiltriert. Man erhält das Produkt als weiß-gelben FS (Ausbeute: 32 mg (27 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.00 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H), 8.93 (dd, $J = 9.3, 4.6$ Hz, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.13 – 8.02 (m, 2H), 7.88 (dd, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 0.5$ Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, $J = 7.8, 6.3$ Hz, 1H), 7.19 – 7.11 (m, 2H), 2.86 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.7, 158.2 (dd, $J = 247.4, 4.9$ Hz), 152.6, 150.0, 148.9, 140.6, 135.4, 127.2 (t, $J = 9.7$ Hz), 124.7, 119.0, 117.4, 115.4 (t, $J = 16.2$ Hz), 113.8, 111.7 (dd, $J = 17.7, 5.7$ Hz), 26.0; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3323, 3259, 3122, 3076, 1673, 1648, 1603, 1580, 1552, 1465; DC-MS (ESI) m/z : 394.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 370.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 406.9 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS (ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 373.12183 ; detektiert: 373.1226; HPLC $t_{\text{ret}} = 5,79$ min.

N-Methyl-2-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)isonicotinamid (**P-67**)



Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2$

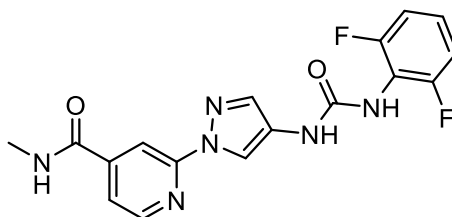
Exakte Masse: 386,15

Molekulargewicht: 386,42

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

50 mg S-65 (0,230 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL trockenem THF gelöst und 33 μL 1-Naphthylisocyanat (0,230 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird für 72 h bei RT rühren gelassen, wobei das Produkt ausfällt, denn man abfiltriert. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 62 mg (70 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.04 (s, 1H), 8.96 – 8.85 (m, 2H), 8.73 (s, 1H), 8.58 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.97 – 7.90 (m, 2H), 7.70 – 7.63 (m, 2H), 7.57 (dt, $J = 14.7, 6.8$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 2.83 (d, $J = 3.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.4, 152.8, 151.6, 149.0, 144.5, 134.5, 134.4, 133.7, 128.4, 126.2, 125.9, 125.9, 125.7, 125.0, 123.2, 121.5, 118.7, 117.7, 115.3, 109.0, 26.4; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3307, 3247, 3049, 2932, 2871, 1642, 1609, 1592, 1550, 1456; DC-MS (ESI) m/z : 408.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 440.8 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$; 385.0 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 420.9 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS (ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 387.15632; detektiert: 387.1563; HPLC $t_{\text{ret}} = 6,77$ min.

2-(4-(3-(2,6-Difluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-methylisonicotinamid (**P-68**)Summenformel: C₁₇H₁₄F₂N₆O₂

Exakte Masse: 372,11

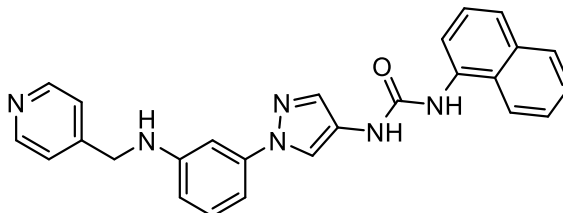
Molekulargewicht: 372,34

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

50 mg S-65 (0,230 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL trockenem THF gelöst und 36 µg 2,6-Difluorphenylisocyanat (0,230 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird für 24 h bei RT rühren gelassen, wobei das Produkt ausfällt, den man abfiltriert. Man erhält das Produkt als grau-weißen FS (Ausbeute: 55 mg (64 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.01 (s, 1H), 8.94 – 8.85 (m, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.55 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.62 (dd, J = 5.1, 1.2 Hz, 1H), 7.37 – 7.27 (m, 1H), 7.15 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 2.82 (d, J = 4.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.4, 158.2 (dd, J = 247.4, 4.5 Hz), 152.4, 151.6, 149.0, 144.5, 134.5, 127.2 (t, J = 9.8 Hz), 125.1, 118.7, 115.3 (t, J = 16.5 Hz), 111.8 (dd, J = 18.1, 5.2 Hz), 109.0, 26.4; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3234, 3085, 1647, 1621, 1590, 1551, 1457, 1412, 1388, 1333; DC-MS (ESI) *m/z*: 394.8 [M+Na]⁺; 426.8 [M+Na+MeOH]⁺; 370.9 [M-H]⁻; 406.9 [M+Cl]⁻; HRMS (ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 373.12183; detektiert: 373.1219; HPLC *t*_{ret} = 4,80 min.

7.5.9 Synthese der in Kapitel 5.1.7.1 beschriebenen Testverbindungen

1-(Naphthalen-1-yl)-3-(1-(3-((pyridin-4-ylmethyl)amino)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)harnstoff**(P-69)**Summenformel: C₂₆H₂₂N₆O

Exakte Masse: 434,19

Molekulargewicht: 434,50

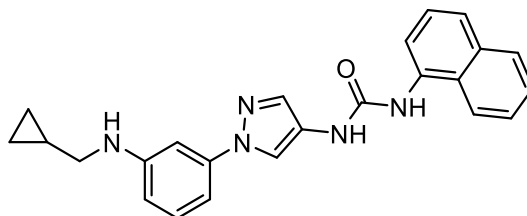
100 mg S-113 (0,263 mmol; 1 eq.) und 30 mg Isonicotinaldehyd (0,276 mmol; 1,05 eq.) werden in 8 mL MeOH suspendiert. Folgend wird mittels AcOH und AcONa der pH ~ 5 eingestellt und die Reaktion wird für 1 h bei RT gerührt. Es wird 25 mg NaCNBH₃ (0,395

mmol; 1,5 eq.) zugegeben und der Ansatz wird für 20 h bei RT gerührt. Das organische Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung, sowie EtOAc wieder aufgenommen. Die Mischung wird 2x mit EtOAc extrahiert, die vereinte organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 2,5/97,5 – 10/90 + 2 M NH₃) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als beige-weißen FS (Ausbeute: 77 mg (74 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.92 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.50 (dd, J = 4.6, 1.4 Hz, 2H), 8.32 (s, 1H), 8.11 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.66 – 7.51 (m, 3H), 7.47 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 7.13 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 6.93 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 6.66 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 6.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.8, 149.6, 149.4, 149.3, 140.7, 134.5, 133.7, 132.3, 129.9, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.2, 122.9, 122.2, 121.4, 117.3, 116.2, 109.9, 105.7, 101.8, 45.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3277, 3052, 2849, 1638, 1552, 1497, 1449, 1388, 1319, 1244; DC-MS(ESI) *m/z*: 434.8 [M+H]⁺; 456.8 [M+Na]⁺; 432.9 [M-H]⁻; 468.8 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 435.19271; detektiert: 435.1925; HPLC *t*_{ret} = 5,82 min.

1-(1-(3-((Cyclopropylmethyl)amino)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff

(P-70)



Summenformel: C₂₄H₂₃N₅O

Exakte Masse: 397,19

Molekulargewicht: 397,48

100 mg S-113 (0,263 mmol; 1 eq.) und 21 µL Cyclopropancarbaldehyd (0,276 mmol; 1,05 eq.) werden in 10 mL MeOH suspendiert. Folgend wird mittels AcOH und AcONa der pH ~ 5 eingestellt und die Reaktion wird für 1 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 25 mg NaCNBH₃ (0,395 mmol; 1,5 eq.) wird zugegeben. Nach 15 min wird die Kühlung entfernt und die Reaktion wird für 6 h bei RT gerührt. Folgend wird 10 mL DCM zugegeben und die Reaktion wird mit weiteren 20 µL Cyclopropancarbaldehyd (0,263 mmol; 1 eq.), sowie 17 mg NaCNBH₃ (0,263 mmol; 1 eq.) versetzt und 42 h bei RT gerührt. Das organische Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung, sowie EtOAc wieder aufgenommen. Die Mischung wird mit EtOAc extrahiert, die vereinte organische Phase wird 2x mit alkalischer ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand

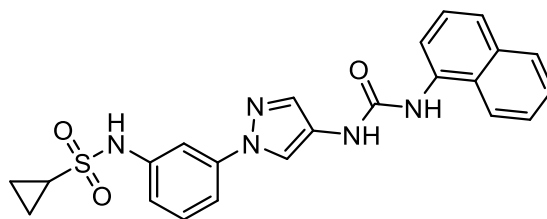
Experimenteller Teil

wird via Flash-Chromatographie (EtOAc/PE: 20/80 – 100/0) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als braun-weißen FS (Ausbeute: 52 mg (50%)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.90 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.61 – 7.52 (m, 2H), 7.47 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.00 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 6.50 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 5.95 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 2.95 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 1.09 – 1.03 (m, 1H), 0.52 – 0.45 (m, 2H), 0.26 – 0.21 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 152.8, 150.0, 140.7, 134.5, 133.7, 132.2, 129.7, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.1, 122.9, 121.4, 117.3, 116.3, 109.8, 105.0, 101.2, 47.4, 10.5, 3.5; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3377, 3272, 3001, 2922, 2851, 1639, 1588, 1560, 1497, 1437; DC-MS(ESI) m/z : 420.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 452.3 $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$; 396.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 432.4 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 398.19746; detektiert: 398.1982; HPLC t_{ret} = 8,59 min.

N-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)cyclopropansulfonamid

(P-71)



Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$

Exakte Masse: 447,14

Molekulargewicht: 447,51

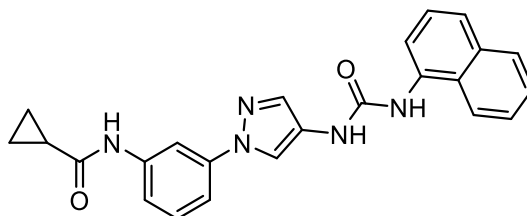
80 mg S-113 (0,233 mmol; 1 eq.) wird in 12 mL trockenem THF:Pyridin (2:1) gelöst. Die Reaktion wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 24 μL Cyclopropansulfonylchlorid (0,233 mmol; 1 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird für 5 min. gerührt, wonach die Kühlung entfernt und die Reaktion bei RT für 20 h gerührt wird. Der Ansatz wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt und 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinte organische Phase wird 1x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung, 1x mit 1 M NaOH (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als beige-braunen FS (Ausbeute: 19 mg (20 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.92 (br s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.77 – 7.69 (m, 1H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.52 – 7.44 (m, 2H), 7.41 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.19 – 7.07 (m, 1H), 2.75 – 2.62 (m, 1H), 1.02 – 0.89 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 152.8, 140.4, 139.7, 134.4, 133.8, 133.0, 130.3, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.7, 123.0, 121.4, 117.4, 117.0, 116.2, 112.7, 109.2, 29.6, 5.0; ATR-FTIR

[cm⁻¹]: 3292, 3202, 3122, 3053, 2923, 2850, 1643, 1600, 1586, 1550; DC-MS(ESI) *m/z*: 470.2 [M+Na]⁺; 446.2 [M-H]⁻; 482.3 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 448.14371; detektiert: 448.1437; HPLC *t*_{ret} = 7,62 min.

N-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)cyclopropancarboxamid

(P-72)



Summenformel: C₂₄H₂₁N₅O₂

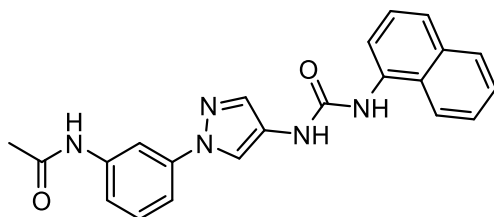
Exakte Masse: 411,17

Molekulargewicht: 411,47

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

50 mg von S-113 (0,132 mmol; 1 eq.) wird in 8 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Reaktion wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 12 µL Cyclopropancarbonylchlorid (0,132 mmol; 1 eq.) wird langsam zugegeben. Der Ansatz wird für 5 min. gerührt, wonach die Kühlung wird entfernt, und die Reaktion für 22 h bei RT gerührt wird. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt und 3x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x reextrahiert und die vereinte organische Phase 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung, sowie 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 1/99 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 40 mg (74 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.38 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.66 – 7.52 (m, 3H), 7.51 – 7.36 (m, 4H), 1.84 – 1.75 (m, 1H), 0.89 – 0.75 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.9, 152.8, 140.4, 140.1, 134.4, 133.7, 132.7, 129.8, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.6, 123.0, 121.4, 117.4, 116.0, 112.1, 108.4, 14.6, 7.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3311, 3280, 3099, 3078, 3010, 2920, 1644, 1609, 1588, 1551; DC-MS(ESI) *m/z*: 434.1 [M+Na]⁺; 410.1 [M-H]⁻; 446.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 412.17672; detektiert: 412.1767; HPLC *t*_{ret} = 7,86 min.

N-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetamid (**P-73**)Summenformel: C₂₂H₁₉N₅O₂

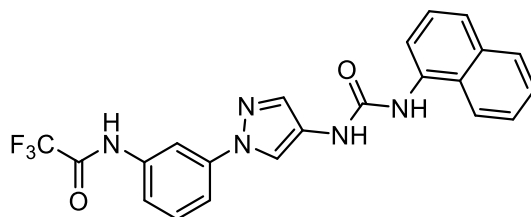
Exakte Masse: 385,15

Molekulargewicht: 385,43

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

600 mg von S-113 (1,747 mmol; 1 eq.) wird in 40 mL trockenem Pyridin gelöst. Die Reaktion wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 125 µL Acetylchlorid (1,747 mmol; 1 eq.) wird langsam zugegeben. Der Ansatz wird für 5 min. gerührt, wonach die Kühlung wird entfernt, und die Reaktion für 20 h bei RT gerührt wird. Der Ansatz wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt und 2x mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung, sowie 2x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 2/98 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als beige-weißen FS (Ausbeute: 366 mg (60 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.11 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.16 – 8.11 (m, J = 8.0 Hz, 2H), 8.05 – 8.00 (m, J = 7.0 Hz, 1H), 7.95 – 7.91 (m, J = 7.8 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.61 – 7.52 (m, 2H), 7.50 – 7.42 (m, 3H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 2.08 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.5, 152.8, 140.4, 140.1, 134.5, 133.7, 132.7, 129.8, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.6, 122.9, 121.4, 117.4, 116.1, 116.1, 112.2, 108.4, 24.1; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3271, 3101, 3055, 2919, 1654, 1644, 1609, 1587, 1547, 1491; DC-MS(ESI) *m/z*: 407.9 [M+Na]⁺; 384.1 [M-H]⁻; 420.1 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 386.16107; detektiert: 386.1615; HPLC *t*_{ret} = 6,91 min.

2,2,2-Trifluor-*N*-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)acetamid**(P-74)**Summenformel: C₂₂H₁₆F₃N₅O₂

Exakte Masse: 439,13

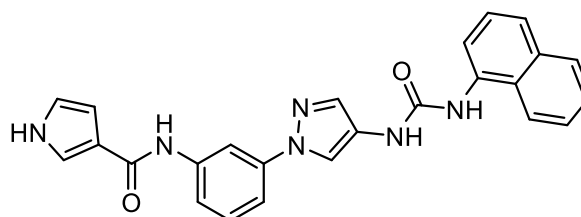
Molekulargewicht: 439,40

100 mg von S-113 (0,263 mmol; 1 eq.) wird in 10 mL trockenem THF gelöst. 73 μ L TEA (0,527 mmol; 2 eq.) wird zugegeben. Die Reaktion wird via Eis-Wasserbad gekühlt und mit 44 μ L Trifluoressigsäureanhydrid versetzt (0,316 mmol; 1,2 eq.). Der Ansatz wird für 30 min. gerührt, wonach die Kühlung entfernt und der Ansatz weitere 23,5 h bei RT gerührt wird. Das präzipitierte Produkt wird abfiltriert und via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 1/99 – 10/90) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 43 mg (37 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.41 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.21 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 7.96 – 7.91 (m, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.68 – 7.63 (m, 2H), 7.62 – 7.57 (m, 2H), 7.57 – 7.45 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 154.65 (q, J = 37.4 Hz), 152.8, 140.1, 137.4, 134.4, 133.7, 133.1, 130.2, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.8, 123.0, 121.4, 118.0, 117.4, 116.1, 115.7 (q, J = 288.4 Hz), 114.6, 110.5; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3343, 3273, 1735, 1706, 1648, 1597, 1560, 1497, 1463, 1390; DC-MS(ESI) m/z : 461.9 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 438.0 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 440.13281; detektiert: 440.1336; HPLC t_{ret} = 8,29 min.

N-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-1*H*-pyrrole-3-carboxamid

(P-75)



Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$

Exakte Masse: 436,16

Molekulargewicht: 436,48

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

80 mg Pyrrol-3-carbonsäure (0,7201 mmol; 1 eq.) und 342 mg HATU (0,90 mmol; 1,25 eq.) werden in 20 mL trockenem DMF gelöst. 0,367 mL DIPEA (2,160 mmol; 3 eq.) wird zum Ansatz gegeben und die Reaktion wird für 14 h bei RT rühren gelassen. Folgend wird 235 mg S-113 (0,6121 mmol; 0,85 eq.) zum Ansatz gegeben und die Reaktion wird für 6 h bei RT rühren gelassen. Es werden weitere 80 mg Pyrrol-3-carbonsäure (0,7201 mmol; 1 eq.), 274 mg HATU (0,7201 mmol; 1 eq.) und 0,367 mL DIPEA (2,1602 mmol; 3 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird für 14 h bei RT rühren gelassen und wird dann mit demin. H_2O versetzt. Das präzipitierte Produkt wird abfiltriert und via Flash-Chromatographie (MeOH/DCM) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als rot-beigen FS (Ausbeute: 17 mg (6 %)).

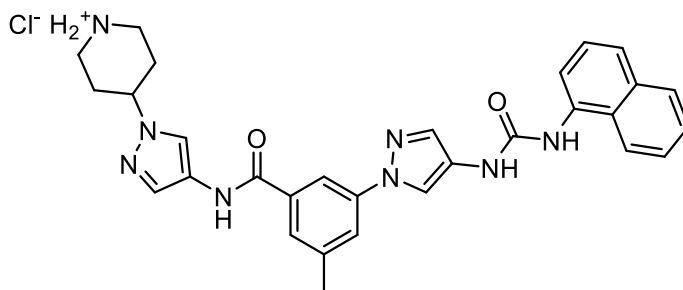
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.33 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.13 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.8 Hz,

Experimenteller Teil

1H), 7.82 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.66 – 7.52 (m, 4H), 7.50 – 7.36 (m, 3H), 6.84 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.68 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 163.0, 152.8, 141.0, 140.0, 134.5, 133.7, 132.6, 129.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.5, 123.0, 121.6, 121.4, 119.4, 118.9, 117.3, 116.8, 116.0, 111.8, 109.1, 107.8; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3254, 1636, 1597, 1540, 1526, 1448, 1388, 1334, 1247, 1196; DC-MS(ESI) m/z : 459.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 435.4 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; 471.1 [$\text{M}+\text{Cl}$] $^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 437.17197; detektiert: 437.1741; HPLC $t_{\text{ret}} = 7,18$ min.

7.5.10 Synthese der in Kapitel 5.1.8 beschriebenen Testverbindungen

4-(4-(3-Methyl-5-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)benzamid)-1H-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-76**)



Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{ClN}_8\text{O}_2$

Exakte Masse: 570,23

Molekulargewicht: 571,08

Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

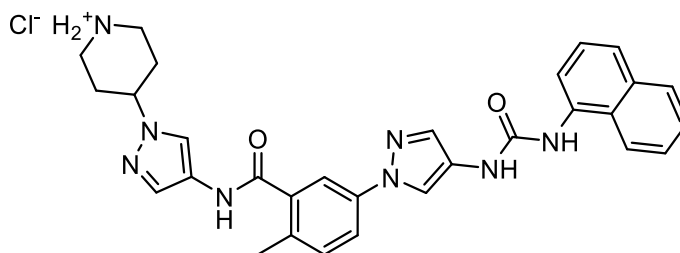
Schritt 1: 77 mg S-50 (0,165 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM gelöst. 24 μL 1-Naphthylisocyanat (0,165 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 12 mL EtOH gelöst. 1 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (1,240 mmol; 7,5 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 22 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als beiger FS (Ausbeute: 70 mg (74 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.68 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 9.15 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 8.91 (q, $J = 9.9$ Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.40 – 8.32 (m, 1H), 8.21 – 8.17 (m, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.09 (dd, $J = 7.6, 0.8$ Hz, 1H), 7.93 – 7.90 (m, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.59 – 7.51 (m, 2H), 7.47 (t, $J = 7.9$ Hz,

¹H), 4.52 (dt, *J* = 15.0, 7.6 Hz, 1H), 3.39 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.11 – 2.98 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.20 – 2.13 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.9, 153.0, 140.0, 140.0, 135.2, 134.7, 133.7, 132.8, 130.5, 128.3, 125.8, 125.7, 125.6, 125.3, 124.8, 122.6, 121.8, 121.7, 121.0, 119.3, 116.6, 116.2, 113.7, 55.1, 42.2, 28.7, 21.0; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3264, 3044, 2920, 2794, 2714, 1662, 1593, 1540, 1390, 1341; DC-MS(ESI) *m/z*: 535.4 [M+H]⁺; 569.5 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 535.25637; detektiert: 535.2547; HPLC *t*_{ret} = 9,19 min.

4-(4-(2-Methyl-5-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid)-1*H*-pyrazol-1-yl)piperidin-1-iumchlorid (**P-77**)



Summenformel: C₃₀H₃₁ClN₈O₂

Exakte Masse: 570,23

Molekulargewicht: 571,08

Die Synthese wird nach ASV-7a & ASV-8 durchgeführt.

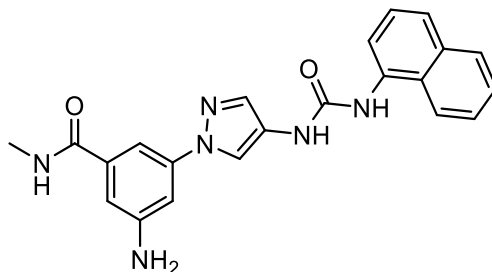
Schritt 1: 50 mg **S-47** (0,107 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem DCM gelöst. 17 µL 1-Naphthylisocyanat (0,107 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. Das Lösemittel wird abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 1,5/98,5 – 10/90).

Schritt 2: Das Produkt aus Schritt 1 wird in 10 mL EtOH gelöst. 0,516 mL einer 1,25 M HCl (EtOH)-Lösung (0,644 mmol; 6 eq.) wird zugesetzt und die Reaktion wird für 24 h auf 60 °C erwärmt. Nach vollständiger Umsetzung des Zwischenproduktes (Monitoring via HPLC) wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird in Et₂O wieder suspendiert. Der FS wird abfiltriert und am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als orange-braunen FS (Ausbeute: 54 mg (93 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.54(s, 1H), 9.48 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 9.01 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 8.81 – 8.68 (m, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.32 – 8.24 (m, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.06 (dd, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 1H), 7.94 – 7.90 (m, 1H), 7.87 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.85 – 7.79 (m, 2H), 7.64 – 7.59 (m, 2H), 7.59 – 7.51 (m, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.56 – 4.45 (m, 1H), 3.39 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 3.12 – 2.99 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.22 – 2.11 (m, 4H); ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3263, 3129, 3043, 2922, 2791, 2469, 1644, 1598, 1540, 1499; DC-

Experimenteller Teil

MS(ESI) m/z : 535.5 $[M+H]^+$; 533.5 $[M-H]^-$; 569.4 $[M+Cl]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[M+H]^+$: 535.25637; detektiert: 535.2556; HPLC t_{ret} = 5,50 min.

3-Amino-*N*-methyl-5-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-78**)

Summenformel: $C_{22}H_{20}N_6O_2$

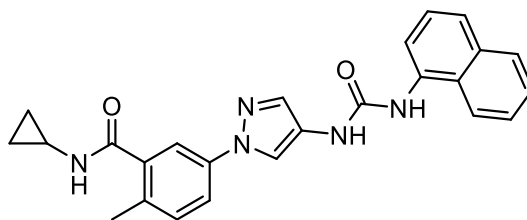
Exakte Masse: 400,16

Molekulargewicht: 400,44

Die Synthese wird nach ASV-3b durchgeführt.

300 mg S-58 (0,561 mmol; 1 eq.) wird in 120 mL MeOH innerhalb eines miniclave® Glasreaktors (Büchi) suspendiert. Der Reaktor wird 3x evakuiert und wieder mit Argon begast. Im Argon-Gegenstrom wird 60 mg (10 %) Pd/C (0,0561 mmol (Pd); 0,1 eq.) zugesetzt. Der Reaktor wird mit 7 bar H_2 beladen und bei RT für 24 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts, wird der Ansatz über Celite filtriert und via Umkehrphasen-Flash-Chromatographie aufgereinigt (ACN/ H_2O : 25/75 – 100/0 + TFA (0,1 %)) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiß-beigen FS (Ausbeute: 90 mg (40 %)).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.95 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.45 – 8.36 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.63 (br s, 2H), 2.78 (d, J = 4.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 166.6, 152.8, 149.4, 140.5, 136.5, 134.5, 133.7, 132.2, 128.4, 126.0, 125.9, 125.9, 125.7, 124.3, 122.9, 121.4, 117.3, 116.2, 110.8, 105.5, 103.6, 26.2; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3268, 1635, 1591, 1545, 1393, 1342, 1326, 1251, 1198, 1024; DC-MS(ESI) m/z : 423.1 $[M+Na]^+$; 399.2 $[M-H]^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für $[M+H]^+$: 401.17197; detektiert: 401.1727; HPLC t_{ret} = 6,00 min.

N-Cyclopropyl-2-methyl-5-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid**(P-79)**Summenformel: C₂₅H₂₃N₅O₂

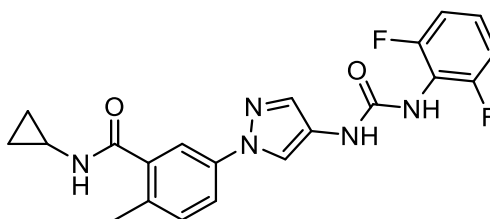
Exakte Masse: 425,19

Molekulargewicht: 425,49

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

Schritt 1: 70 mg S-52 (0,273 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 11 mL trockenem DCM gelöst. 39 µL 1-Naphthylisocyanat (0,273 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. MeOH wird zugegeben und nach wenigen min. rühren wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 3/97 – 10/90). Der FS wird am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelb-braunen FS (Ausbeute: 44 mg (42 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.93 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.43 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.06 – 8.01 (m, 1H), 7.96 – 7.91 (m, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.74 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 – 7.53 (m, 2H), 7.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 2.88 – 2.80 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 0.75 – 0.67 (m, 2H), 0.59 – 0.52 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.4, 152.8, 137.8, 137.4, 134.4, 133.7, 132.8, 132.6, 131.5, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.5, 122.9, 121.4, 118.4, 117.3, 116.5, 116.4, 22.7, 18.8, 5.8; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3235, 3223, 3047, 3015, 1636, 1540, 1497, 1388, 1251, 1237; DC-MS(ESI) *m/z*: 448.3 [M+Na]⁺; 424.5 [M-H]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 426.19238; detektiert: 426.1942; HPLC *t*_{ret} = 7,44 min.

N-Cyclopropyl-5-(4-(3-(2,6-difluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-2-methylbenzamid**(P-80)**Summenformel: C₂₁H₁₉F₂N₅O₂

Exakte Masse: 411,15

Molekulargewicht: 411,41

Die Synthese wird nach ASV-7a durchgeführt.

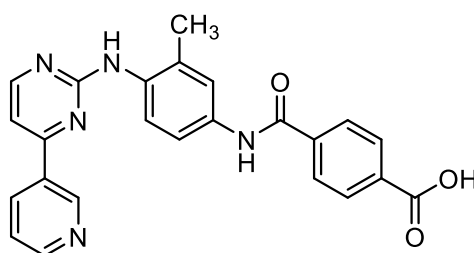
Schritt 1: 70 mg S-52 (0,273 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 11 mL trockenem DCM gelöst. 42 mg 2,6-Difluorphenylisocyanat (0,273 mmol; 1 eq.) wird zum Ansatz gegeben und der Ansatz wird für 24 h bei RT rühren gelassen. MeOH wird zugegeben und nach wenigen min. rühren wird das Lösemittel abgenommen und der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 3/97 – 10/90). Der noch *crude* FS wird in DCM suspendiert und abgesaugt. Der FS wird am Hochvakuum zur Massenkonzanz getrocknet. Man erhält das Produkt als rot-weißen FS (Ausbeute: 37 mg (37 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.85 (s, 1H), 8.41 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.70 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.15 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.87 – 2.79 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 0.69 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 0.58 – 0.51 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169.4, 158.1 (dd, $J = 247.2, 4.8$ Hz), 152.4, 137.8, 137.4, 132.9, 132.7, 131.5, 127.1 (t, $J = 9.8$ Hz), 124.5, 118.3, 116.6, 116.5, 115.4 (t, $J = 16.1$ Hz), 111.7 (dd, $J = 18.0, 5.4$ Hz), 22.7, 18.7, 5.7; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3260, 1642, 1621, 1600, 1534, 1497, 1467, 1388, 1295, 1240; DC-MS (ESI) m/z : 434.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 410.4 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HPLC $t_{\text{ret}} = 5,76$ min.

7.5.11 Synthese der in Kapitel 5.1.9 beschriebene Testverbindungen

4-((3-Methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)benzoesäure

(P-81)



Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$

Exakte Masse: 425,15

Molekulargewicht: 425,45

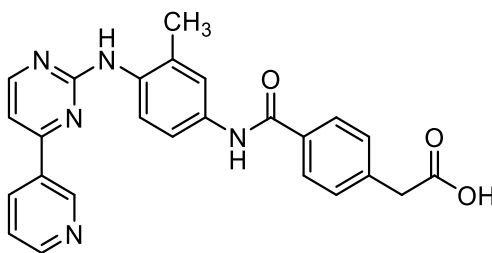
Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

45 mg S-105 (0,1024 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 8 mL MeOH:H₂O (1:1) suspendiert. 0,52 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (0,5120 mmol; 5 eq.) wird zugesetzt und der Ansatz wird für 6 h bei RT gerührt. Folgend wird erneut 0,52 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (0,5120 mmol; 5 eq.) sowie 4 mL THF zugesetzt. Der Ansatz wird weitere 16 h bei RT gerührt. Es wird MeOH und THF am Rotationsverdampfer abgenommen und der wässrige Rückstand wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt und damit leicht angesäuert bis ein gelber FS zu

präzipitieren beginnt. Das Präzipitat wird abgesaugt, leicht mit demin. H₂O gewaschen und im Exsikkator und folgend am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als hell-gelben FS (Ausbeute: 41 mg (94 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.26 (br s, 1H), 10.37 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.71 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.08 (s, 4H), 7.68 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 7.7, 4.9 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8, 164.6, 161.4, 161.3, 159.5, 151.1, 147.8, 138.8, 135.5, 134.5, 133.8, 133.2, 132.9, 132.4, 129.3, 127.9, 125.6, 124.0, 122.3, 118.3, 107.4, 18.4; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3268, 2922, 1676, 1562, 1506, 1448, 1407, 1290, 1247, 1098; DC-MS (ESI) *m/z*: 448.3 [M+Na]⁺; 424.3 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 6,48 min.

2-(4-((3-Methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)essigsäure (**P-82**)



Summenformel: C₂₅H₂₁N₅O₃

Exakte Masse: 439,16

Molekulargewicht: 439,48

Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

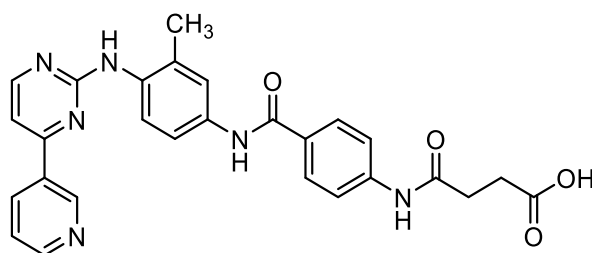
68 mg S-106 (0,1499 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL H₂O:MeOH (1:1) suspendiert. Folgend wird 0,75 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (0,7497 mmol; 5 eq.) zugegeben und der Ansatz wird 18 h bei RT rühren gelassen. MeOH wird am Rotationsverdampfer abgenommen und der Rückstand wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung wird ein pH =2-3 eingestellt, wobei ein FS präzipitiert. Dieser wird abgesaugt und mit DCM gewaschen. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90 + 0,05 % AcOH). Das Produkt wird wieder in DCM suspendiert und abgesaugt und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelben FS (Ausbeute: 16 mg (24 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.39 (br s, 1H), 10.16 (s, 1H), 9.24 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.69 (dd, J = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.43 – 8.35 (m, 1H), 7.92 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 3.67 (s, 2H), 2.25 (s,

Experimenteller Teil

3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.4, 165.1, 161.5, 161.4, 159.5, 151.4, 148.1, 138.9, 135.8, 134.2, 133.5, 133.3, 132.9, 132.3, 129.4, 127.6, 125.6, 123.9, 122.2, 118.2, 107.3, 40.7, 18.4; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 1702, 1664, 1399, 1290, 1223, 1186, 1021, 788; DC-MS (ESI) m/z : 462.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 473.7 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$; HPLC $t_{\text{ret}} = 5,93$ min.

4-((4-((3-Methyl-4-((4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)amino)-4-oxobutansäure (**P-83**)



Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4$

Exakte Masse: 496,19

Molekulargewicht: 496,53

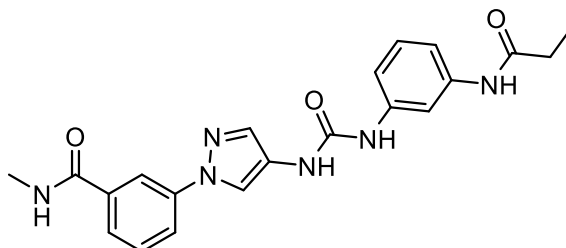
Die Synthese wird nach ASV-5b durchgeführt.

40 mg S-108 (0,0783 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) suspendiert. 1,175 mL 1 M LiOH (aq.)-Lösung (1,1752 mmol; 1 eq.) wird zugesetzt und der Ansatz wird für 96 h bei RT gerührt. Es wird MeOH am Rotationsverdampfer abgenommen und der wässrige Rückstand wird mit 10 % HCl (aq.)-Lösung versetzt und damit leicht angesäuert bis ein gelber FS zu präzipitieren beginnt. Das Präzipitat wird abgesaugt, leicht mit demin. H_2O gewaschen und im Exsikkator und folgend am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelben FS (Ausbeute: 32 mg (82 %)).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.87 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.69 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J = 7.5, 5.0$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 2.60 – 2.52 (m, 2H), 2.46 – 2.40 (m, 2H), 2.24 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 174.7, 171.6, 164.7, 161.5, 161.4, 159.5, 151.4, 148.1, 142.5, 135.9, 134.2, 133.4, 132.8, 132.3, 128.8, 128.5, 125.6, 123.8, 122.2, 118.2, 118.0, 107.3, 32.7, 31.0, 18.4; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3100, 2922, 1653, 1558, 1524, 1506, 1448, 1399, 1308, 1293; DC-MS (ESI) m/z : 519.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 495.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HPLC $t_{\text{ret}} = 5,57$ min.

7.5.12 Synthese der in Kapitel 5.1.10 beschriebenen Testverbindungen

N-Methyl-3-(4-(3-(3-Propionamidphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)benzamid (**P-84**)



Summenformel: C₂₁H₂₂N₆O₃

Exakte Masse: 406,18

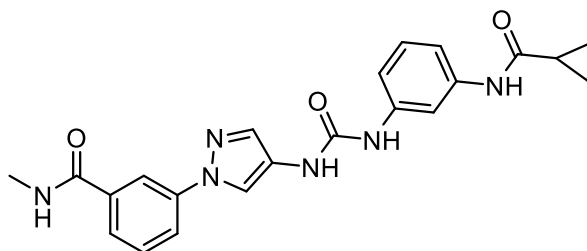
Molekulargewicht: 406,45

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

143 mg S-93 (0,3697 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 20 mL trockenem Pyridin gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 32 µL Propioncarbonsäurechlorid (0,3697 mmol; 1 eq.) wird zugesetzt. Nach 5 min. wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird für 19 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung und 1x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 1/99 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiß-gelblichen FS (Ausbeute: 37 mg (24 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.82 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.68 – 8.57 (m, 2H), 8.53 (s, 1H), 8.24 – 8.19 (m, 1H), 7.94 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.20 – 7.15 (m, 3H), 2.82 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 2.31 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.08 (t, J = 7.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.0, 165.8, 152.2, 140.1, 139.8, 139.8, 135.8, 133.1, 129.6, 128.8, 124.7, 124.4, 120.1, 116.3, 116.1, 112.8, 112.7, 108.9, 29.5, 26.3, 9.7; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3306, 3276, 3106, 2939, 1666, 1647, 1607, 1590, 1560, 1542; DC-MS (ESI) *m/z*: 428.9 [M+Na]⁺; 405.0 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 5,18 min.

3-(4-(3-(3-(Cyclopropancarboxamid)phenyl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)-N-methylbenzamid
(P-85)



Summenformel: C₂₂H₂₂N₆O₃

Exakte Masse: 418,18

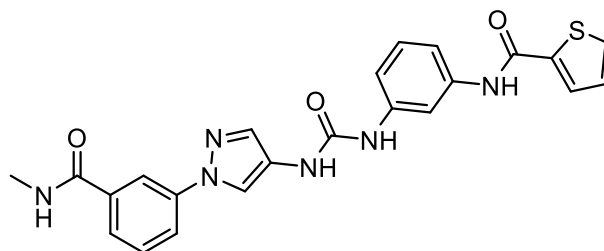
Molekulargewicht: 418,46

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

80 mg S-93 (0,2068 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem Pyridin gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 19 µL Cyclopropancarbonsäurechlorid (0,2068 mmol; 1 eq.) wird zugesetzt. Nach 5 min. wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird für 50 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert, die vereinigte organische Phase wird 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 43 mg (50 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.15 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.69 – 8.59 (m, 2H), 8.53 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.98 – 7.91 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.22 – 7.13 (m, 3H), 2.82 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 1.83 – 1.77 (m, 1H), 0.82 – 0.75 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.6, 165.8, 152.2, 140.1, 139.8, 139.8, 135.8, 133.1, 129.6, 128.9, 124.7, 124.3, 120.1, 116.3, 116.1, 112.8, 112.6, 108.9, 26.3, 14.5, 7.1; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3313, 3236, 3078, 3004, 1647, 1609, 1596, 1586, 1540, 1488; DC-MS (ESI) *m/z*: 440.9 [M+Na]⁺; 417.1 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 5,44 min.

N-(3-(3-(1-(3-(Methylcarbamoyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)harnstoff)phenyl)thiophen-2-carboxamid (**P-86**)



Summenformel: C₂₃H₂₀N₆O₃S

Exakte Masse: 460,13

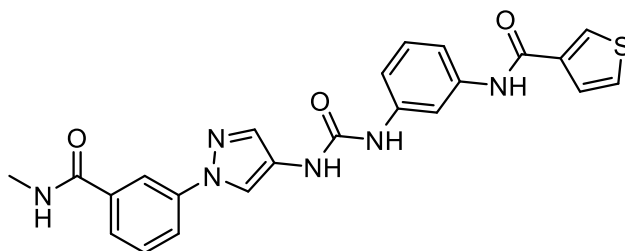
Molekulargewicht: 460,51

Die Synthese wird nach ASV-2b durchgeführt.

80 mg S-93 (0,2068 mmol; 1 eq.) wird vorgelegt und in 10 mL trockenem Pyridin gelöst. Der Ansatz wird via Eis-Wasserbad gekühlt und 22 µL Thiophen-2-carbonsäurechlorid (0,2068 mmol; 1 eq.) wird zugesetzt. Nach 5 min. wird die Kühlung entfernt und der Ansatz wird für 48 h rühren gelassen. Der Ansatz wird mit EtOAc versetzt und 2x mit 10 % HCl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x mit EtOAc reextrahiert, die vereinigte organische Phase wird 1x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen-beigen FS (Ausbeute: 48 mg (50 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.21 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.64 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.06 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.37 – 7.31 (m, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 3H), 2.82 (d, J = 4.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 159.8, 152.3, 140.2, 139.8, 139.1, 135.8, 133.1, 131.8, 129.6, 129.1, 128.8, 128.1, 124.8, 124.4, 120.1, 116.3, 116.1, 114.0, 113.6, 110.3, 26.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3293, 3107, 3076, 2957, 2922, 2852, 1643, 1588, 1569, 1533; DC-MS (ESI) *m/z*: 482.9 [M+Na]⁺; 459.0 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 6,04 min.

N-(3-(3-(1-(3-(Methylcarbamoyl)phenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)harnstoff)phenyl)thiophen-3-carboxamid (**P-87**)



Summenformel: C₂₃H₂₀N₆O₃S

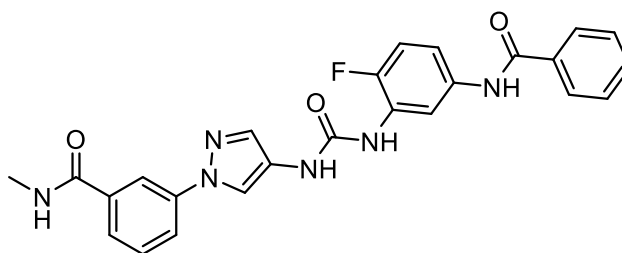
Exakte Masse: 460,13

Molekulargewicht: 460,51

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

53 mg 3-Thiophencarbonsäure (0,4136 mmol; 2 eq.) sowie 157 mg HATU (0,4136 mmol; 2 eq.) werden in 10 mL trockenem DMF gelöst. Folgend wird 176 µL DIPEA (1,034 mmol; 5 eq.) zugegeben und der Ansatz wird 2 h rühren gelassen. Hiernach zeigt eine Reaktionskontrolle die vollständige Aktivierung der Carbonsäure-Komponente an und 80 mg S-93 (0,2068 mmol; 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wird bei RT für 4 h rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit demin. H₂O und EtOAc versetzt und 1x mit ges. NH₄Cl (aq.)-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird 1x reextrahiert. Die vereinte organische Phase wird 2x mit ges. NaHCO₃ (aq.)-Lösung und 2x mit ges. NaCl (aq.)-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Ansatz wird via 2x via Flash-Chromatographie aufgereinigt (1) MeOH/DCM: 4/96 – 10/90 2) Isopropanol/DCM: 5/95 – 20/80) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelb-weißen FS (Ausbeute: 34 mg (35 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.03 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.69 – 8.61 (m, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 7.56 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.37 – 7.33 (m, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 2.82 (d, J = 4.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8, 160.8, 152.3, 140.2, 139.8, 139.4, 137.9, 135.8, 133.1, 129.6, 128.7, 127.3, 126.8, 124.9, 124.3, 120.1, 116.2, 116.0, 113.9, 113.5, 110.3, 26.3; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3299, 3120, 3085, 2919, 2850, 1644, 1589, 1569, 1539, 1484; DC-MS (ESI) *m/z*: 482.9 [M+Na]⁺; 459.1 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 6,07 min.

3-(4-(3-(5-Benzamido-2-fluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-methylbenzamid (**P-88**)Summenformel: C₂₅H₂₁FN₆O₃

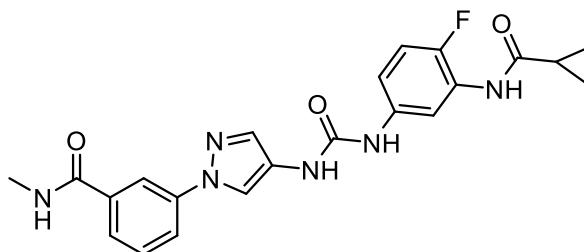
Exakte Masse: 472,17

Molekulargewicht: 472,48

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

80 mg S-97 (0,1741 mmol; 1 eq.) sowie 132 mg HATU (0,3483 mmol; 2 eq.) in 8 mL trockenem DMF gelöst. 91 µL DIPEA (0,5224 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird bei RT 1 h rühren gelassen. 75 µL 40 % Methylamin (aq.)-Lösung (0,8706 mmol; 5 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird bei RT für 19 h rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit Wasser versetzt. Das präzipitierende Produkt wird abgesaugt und im Umluftofen vorgetrocknet und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als weiß-braunen FS (Ausbeute: 30 mg (37 %)).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.29 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.63 (dd, J = 7.4, 2.4 Hz, 2H), 8.55 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.98 – 7.93 (m, 3H), 7.84 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.59 – 7.51 (m, 4H), 7.47 – 7.43 (m, 1H), 7.21 (dd, J = 10.9, 9.0 Hz, 1H), 2.82 (d, J = 2.8 Hz, 3H); ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3320, 3092, 2922, 2850, 1696, 1636, 1625, 1560, 1526, 1491; DC-MS (ESI) *m/z*: 495.2 [M+Na]⁺; 471.3 [M-H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 6,57 min.

3-(4-(3-(3-(Cyclopropancarboxamid)-4-fluorphenyl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)-*N*-methylbenzamid (**P-89**)Summenformel: C₂₂H₂₁FN₆O₃

Exakte Masse: 436,17

Molekulargewicht: 436,45

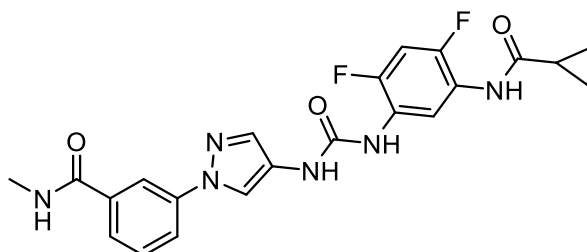
Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

Experimenteller Teil

80 mg S-95 (0,1889 mmol; 1 eq.) sowie 144 mg HATU (0,3779 mmol; 2 eq.) in 8 mL trockenem DMF gelöst. 99 μ L DIPEA (0,5668 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird bei RT 1 h rühren gelassen. 82 μ L 40 % Methylamin (aq.)-Lösung (0,9447 mmol; 5 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird bei RT für 19 h rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit Wasser versetzt. Das präzipitierende Produkt wird abgesaugt und im Umluftofen vorgetrocknet und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelblich-weißen FS (Ausbeute: 70 mg (85 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.92 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.66 – 8.60 (m, 1H), 8.53 (s, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.06 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.72 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.27 – 7.22 (m, 1H), 7.17 – 7.12 (m, 1H), 2.82 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 2.03 – 1.98 (m, 1H), 0.80 (d, J = 5.9 Hz, 4H); ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3341, 3286, 3121, 3087, 1694, 1666, 1634, 1581, 1534, 1488; DC-MS (ESI) m/z : 459.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 435.3 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HPLC t_{ret} = 5,45 min.

3-(4-(3-(5-(Cyclopropancarboxamid)-2,4-difluorphenyl)harnstoff)-1H-pyrazol-1-yl)-*N*-methylbenzamid (**P-90**)



Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_3$

Exakte Masse: 454,16

Molekulargewicht: 454,44

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

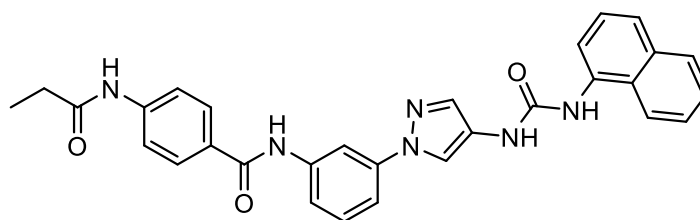
100 mg S-99 (0,2266 mmol; 1 eq.) sowie 172 mg HATU (0,4531 mmol; 2 eq.) in 8 mL trockenem DMF gelöst. 118 μ L DIPEA (0,6797 mmol; 3 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird bei RT 1 h rühren gelassen. 98 μ L 40 % Methylamin (aq.)-Lösung (1,1328 mmol; 5 eq.) wird zugegeben und der Ansatz wird bei RT für 16 h rühren gelassen. Folgend wird der Ansatz mit Wasser versetzt. Das präzipitierende Produkt wird abgesaugt, im Umluftofen vorgetrocknet, mit Et_2O und Pentan gewaschen, via Flash-Chromatographie aufgereinigt (MeOH/DCM: 4/96 – 10/90) und am Hochvakuum zur Massenkonstanz getrocknet. Man erhält das Produkt als gelben FS (Ausbeute: 45 mg (44 %)).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.93 (br s, 1H), 9.13 (br s, 1H), 8.87 – 8.56 (m, 2H), 8.57 – 8.48 (m, 2H), 8.22 (s, 1H), 7.95 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 10.7 Hz, 1H), 2.82 (s, 3H), 1.99 – 1.89 (m, 1H), 0.80 (d,

$J = 6.1$ Hz, 4H); ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3298, 3256, 3097, 2953, 2922, 2854, 1689, 1656, 1640, 1618; DC-MS (ESI) m/z : 477.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 453.2 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; HPLC $t_{\text{ret}} = 5,45$ min.

7.5.13 Synthese der in Kapitel 5.1.11 beschriebenen Testverbindungen

N-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-4-propionamidobenzamid
(P-91)



Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3$

Exakte Masse: 518,21

Molekulargewicht: 518,58

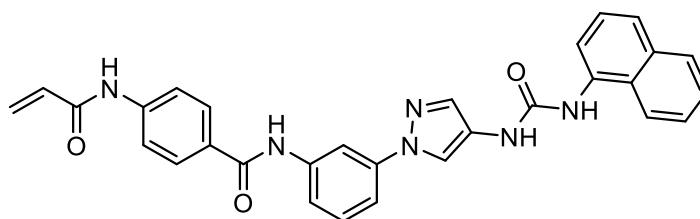
Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

25 mg S-117 (0,132 mmol; 1 eq.), 50 mg S-113 (0,132 mmol; 1 eq.) sowie 100 mg HATU (0,263 mmol; 2 eq.) werden in 2 mL trockenem DMF gelöst. 112 μL DIPEA (0,658 mmol; 5 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 18 h bei RT rühren gelassen. Die Mischung wird via Flüssigauftragung direkt mittels Umkehrphasen-Flash-Chromatographie (ACN/ H_2O : 40/60 – 100/0 + TFA (0,1%)) aufgereinigt. Nach dem Abnehmen der organischen Phase via Rotationsverdampfer, präzipitiert das Produkt. Es wird abgefiltert und mit Et_2O sowie mit 20 % MeOH (aq.)-Lösung gewaschen. Man erhält das Produkt als dunkelbrauner FS (Ausbeute: 5 mg (7 %)).

^1H NMR (700 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.27 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.31 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.79 – 7.71 (m, 3H), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.62 – 7.59 (m, 1H), 7.57 – 7.54 (m, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 2.37 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (176 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 172.5, 165.0, 152.8, 142.5, 140.4, 140.0, 134.5, 133.7, 132.7, 129.7, 128.7, 128.6, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.6, 123.0, 121.4, 118.1, 117.3, 117.3, 116.1, 112.6, 109.6, 29.6, 9.5; ATR-FTIR [cm^{-1}]: 3281, 3237, 3110, 2975, 1659, 1643, 1605, 1587, 1554, 1522; DC-MS(ESI) m/z : 541.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; 517.3 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; 553.2 [$\text{M}+\text{Cl}$] $^-$; HRMS(ESI) m/z : erwartet für [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 519.21384; detektiert: 519.2137; HPLC $t_{\text{ret}} = 7,95$ min.

4-Acrylamido-*N*-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)benzamid

(P-92)

Summenformel: C₃₀H₂₄N₆O₃

Exakte Masse: 516,19

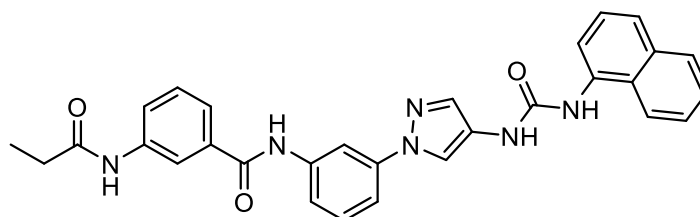
Molekulargewicht: 516,56

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

63 mg S-118 (0,329 mmol; 1 eq.), 125 mg S-113 (0,329 mmol; 1 eq.) sowie 250 mg HATU (0,658 mmol; 2 eq.) werden in 10 mL trockenem DMF gelöst. 280 µL DIPEA (1,645 mmol; 5 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 92 h bei RT rühren gelassen. Die Mischung wird mit demin. H₂O versetzt, präzipitierendes Produkt wird abfiltriert und mit demin. H₂O sowie Et₂O gewaschen. Das *crude* Produkt wird via Umkehrphasen-Flash-Chromatographie (ACN/H₂O: 45/55 – 65/35 + TFA (0,1 %)) aufgereinigt. Man erhält das Produkt als weißen FS (Ausbeute: 12 mg (8 %)).

¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.44 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.32 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.86 – 7.81 (m, 3H), 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.61 – 7.59 (m, 1H), 7.56 – 7.54 (m, 1H), 7.51 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.45 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.48 (dd, J = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.32 (dd, J = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.82 (dd, J = 10.2, 1.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.0, 163.5, 152.8, 142.1, 140.4, 140.0, 134.5, 133.8, 132.7, 131.6, 129.7, 129.3, 128.8, 128.4, 127.7, 126.0, 125.9, 125.7, 124.6, 123.0, 121.4, 118.6, 117.3, 117.3, 116.1, 112.7, 109.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3247, 1664, 1643, 1605, 1590, 1558, 1524, 1495, 1464, 1410; DC-MS(ESI) *m/z*: 539.3 [M+Na]⁺; 515.4 [M-H]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 517.19819; detektiert: 517.1972; HPLC *t*_{ret} = 7,86 min.

N-(3-(4-(3-(Naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)-3-propionamidobenzamid
(P-93)



Summenformel: C₃₀H₂₆N₆O₃

Exakte Masse: 518,21

Molekulargewicht: 518,58

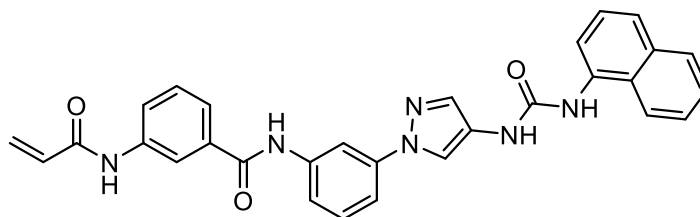
Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

76 mg S-115 (0,395 mmol; 1,2 eq.) sowie 213 mg HATU (0,658 mmol; 2 eq.) werden in 10 mL trockenem DMF gelöst. 280 µL DIPEA (1,645 mmol; 5 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 60 min bei RT rühren gelassen. Folgend wird 125 mg S-113 (0,329 mmol; 1 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 18 h bei RT rühren gelassen. Die Mischung wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch FS ausfällt der abfiltriert und mittels Umkehrphasen-Flash-Chromatographie (ACN/H₂O: 30/70 – 60/40 + TFA (0,1%)) aufgereinigt wird. Nach dem Abnehmen der organischen Phase am Rotationsverdampfer, präzipitiert das Produkt. Es wird abfiltriert und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält das Produkt als hellbraunen FS (Ausbeute: 37 mg (22 %)).

¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.41 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.31 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 8.14 – 8.11 (m, 2H), 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 8.1, 1.0 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.75 – 7.72 (m, 1H), 7.66 – 7.63 (m, 2H), 7.61 – 7.58 (m, 1H), 7.56 – 7.51 (m, 2H), 7.50 – 7.44 (m, 3H), 2.36 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.11 (t, J = 7.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.3, 165.8, 152.8, 140.3, 140.0, 139.6, 135.5, 134.5, 133.8, 132.7, 129.8, 128.8, 128.4, 126.0, 125.9, 125.7, 124.6, 123.0, 122.1, 121.9, 121.4, 118.6, 117.3, 116.1, 112.8, 109.7, 29.5, 9.6; ATR-FTIR [cm⁻¹]: 3270, 3110, 3058, 2968. 1639, 1605, 1588, 1543, 1496, 1485; DC-MS(ESI) *m/z*: 541.3 [M+Na]⁺; 517.4 [M-H]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 519.21384; detektiert: 519.2138; HPLC *t*_{ret} = 7,96 min.

3-Acrylamido-*N*-(3-(4-(3-(naphthalen-1-yl)harnstoff)-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl)benzamid

(P-94)

Summenformel: C₃₀H₂₄N₆O₃

Exakte Masse: 516,19

Molekulargewicht: 516,56

Die Synthese wird nach ASV-2d durchgeführt.

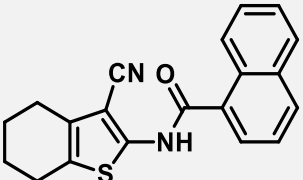
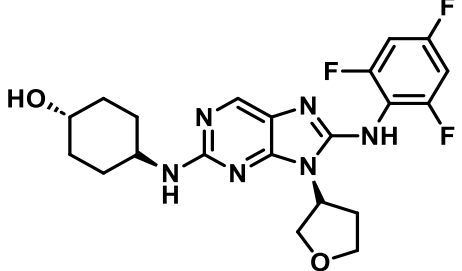
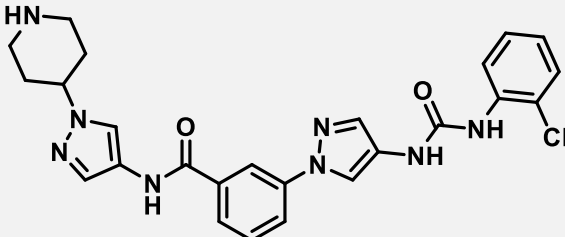
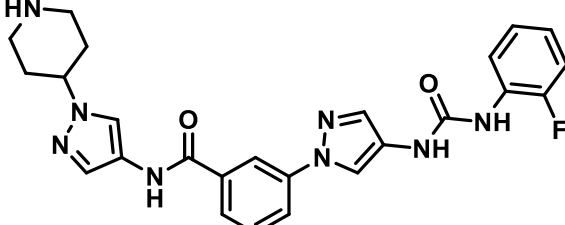
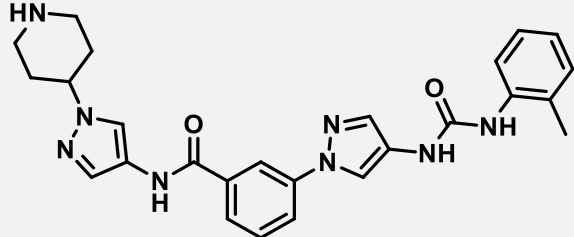
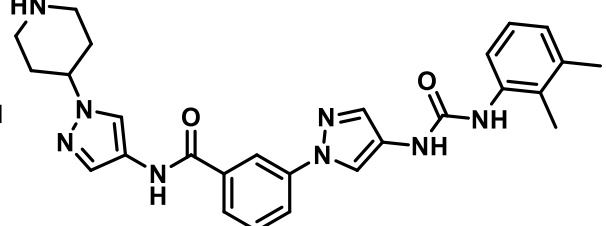
37 mg S-116 (0,194 mmol; 1,05 eq.) sowie 140 mg HATU (0,367 mmol; 2 eq.) werden in 7 mL trockenem DMF gelöst. 125 µL DIPEA (0,737 mmol; 4 eq.) wird zugegeben und die Reaktion wird für 10 min bei RT rühren gelassen. Folgend wird 70 mg S-113 (0,184 mmol; 1 eq.) zugegeben und die Reaktion wird für 21 h bei RT rühren gelassen. Die Mischung wird mit demin. H₂O versetzt, wodurch ein FS ausfällt, der abfiltriert und mit demin H₂O und Et₂O gewaschen wird. Das *crude* Produkt wird mittels Flash-Chromatographie (MeOH/DCM: 2,5/97,5 – 10/90) aufgereinigt. Das immer noch verunreinigte Produkt wird in einer Mischung aus THF und MeOH gelöst. Am Rotationsverdampfer wird das THF wieder langsam abgenommen bis ein FS präzipitiert. Der FS wird abfiltriert. Man erhält das Produkt als weißen-orangen FS (Ausbeute: 9 mg (11 %)).

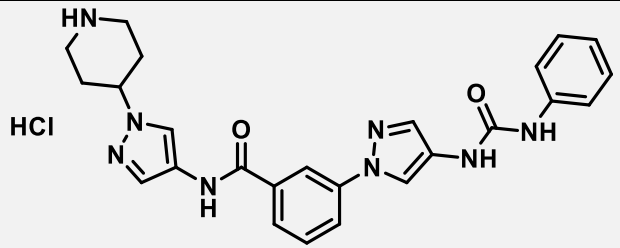
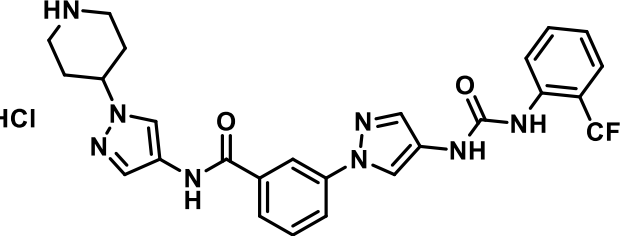
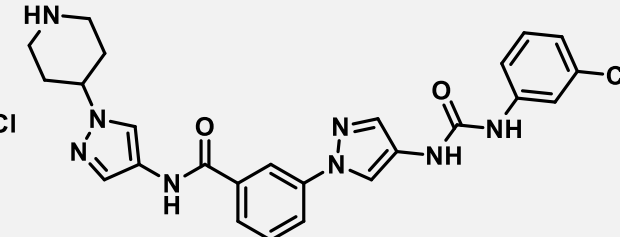
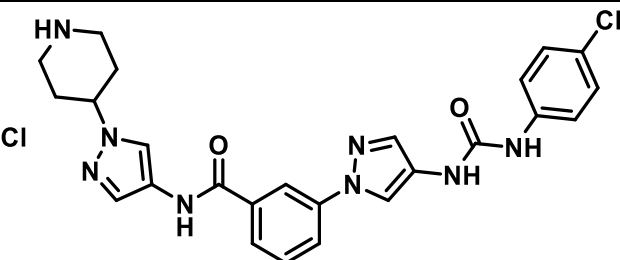
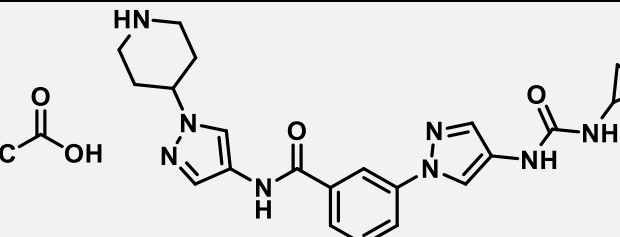
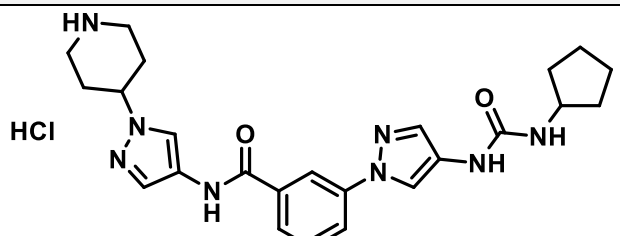
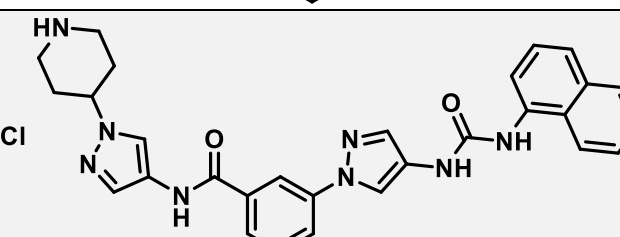
¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.44 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.32 – 8.30 (m, 1H), 8.21 – 8.18 (m, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.97 – 7.92 (m, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.61 – 7.58 (m, 1H), 7.55 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.54 – 7.49 (m, 2H), 7.49 – 7.44 (m, 2H), 6.47 (dd, J = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.30 (dd, J = 17.0, 1.6 Hz, 1H), 5.80 (dd, J = 10.2, 1.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.7, 163.4, 152.8, 140.3, 140.0, 139.2, 135.6, 134.5, 133.7, 132.8, 131.7, 129.8, 128.9, 128.4, 127.3, 126.0, 125.9, 125.7, 124.6, 123.0, 122.5, 122.4, 121.4, 118.9, 117.3, 116.1, 112.9, 109.7; FTIR [cm⁻¹]: 3280, 3237, 3107, 1644, 1588, 1546, 1485, 1465, 1385, 1314; DC-MS(ESI) *m/z*: 539.4 [M+Na]⁺; 515.4 [M-H]⁻; 551.4 [M+Cl]⁻; HRMS(ESI) *m/z*: erwartet für [M+H]⁺: 517.19819; detektiert: 517.1988; HPLC *t*_{ret} = 7,94 min.

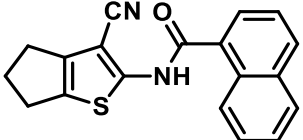
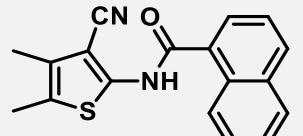

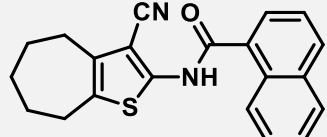
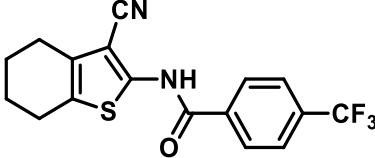
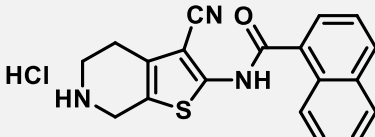
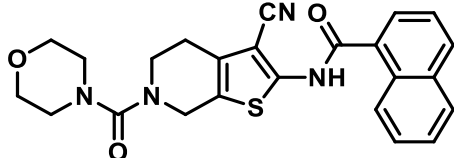
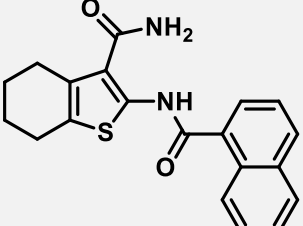
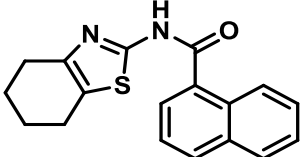
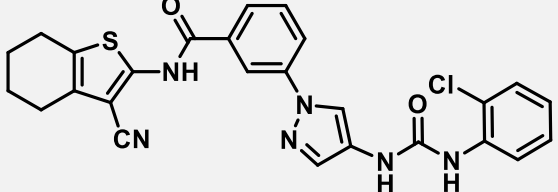
8 Anhang

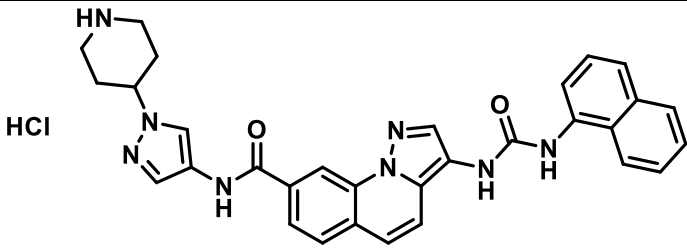
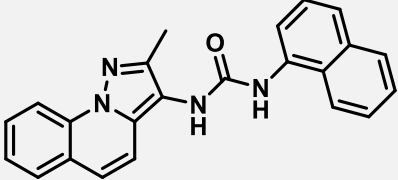
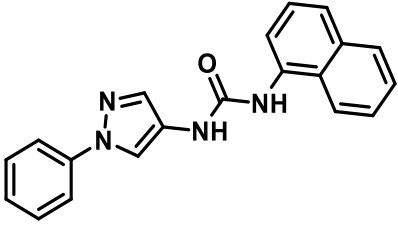
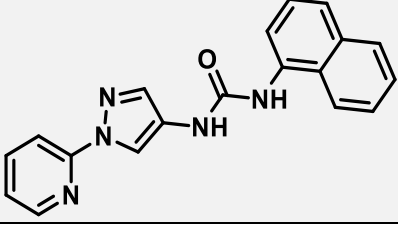
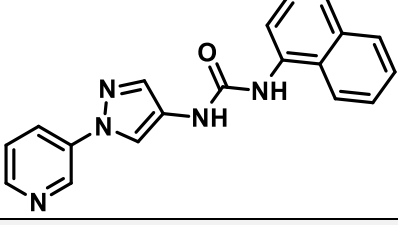
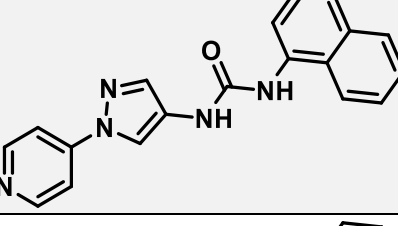
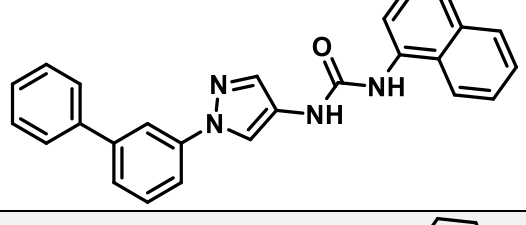
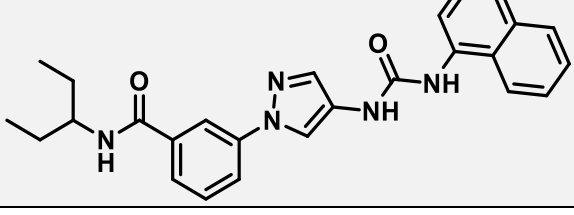
8.1 Liste aller Endverbindungen

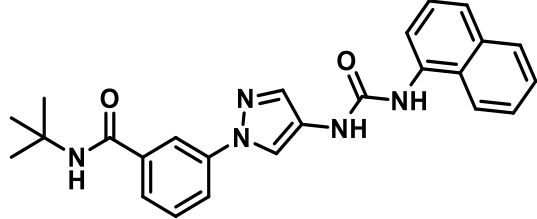
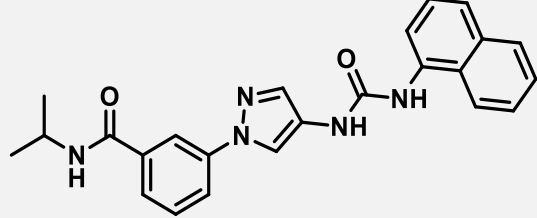
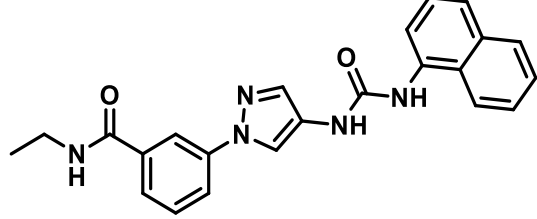
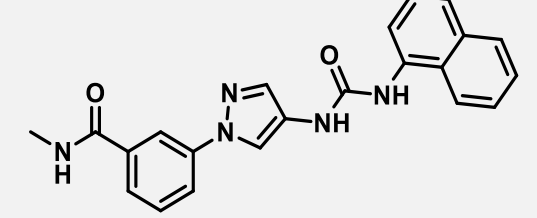
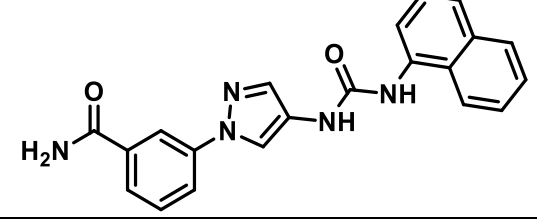
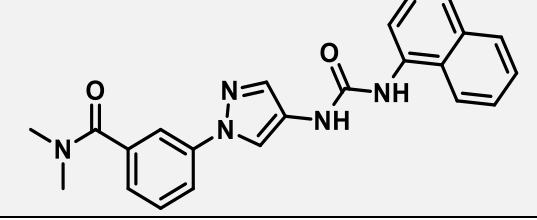
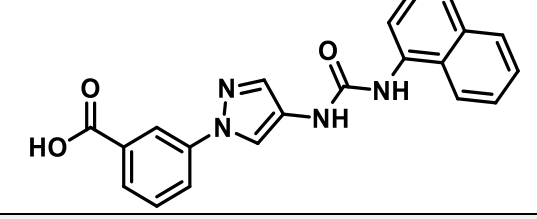
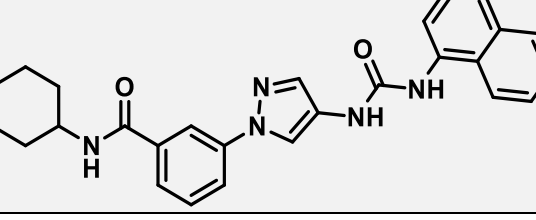
Tabelle 34: Liste aller Endverbindungen (sowie Referenzverbindungen) mit biochemischer Evaluation im ^{33}P anQinaseTM-Assay gegen alle drei JNKs

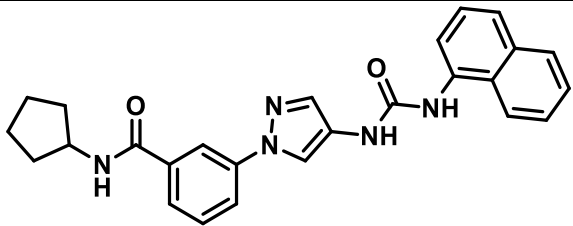
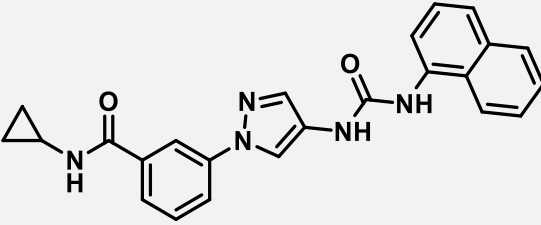
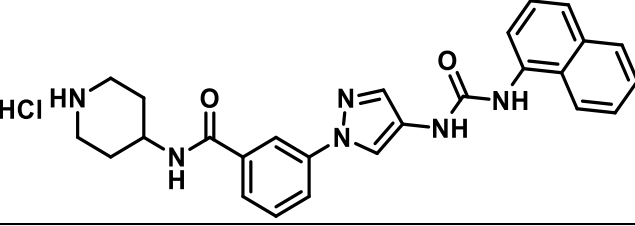
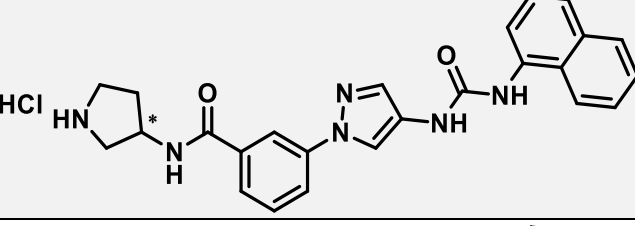
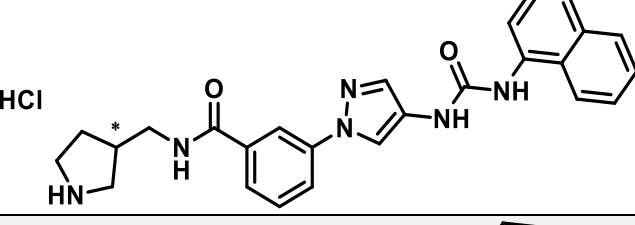
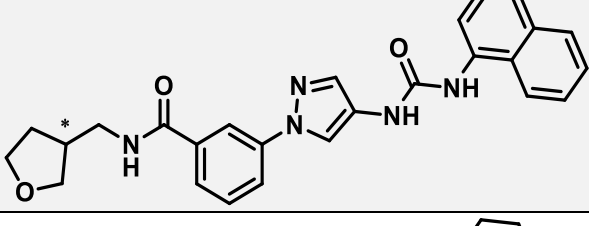
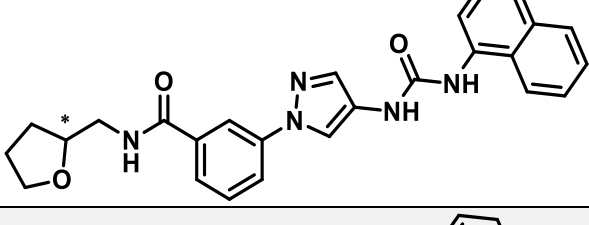
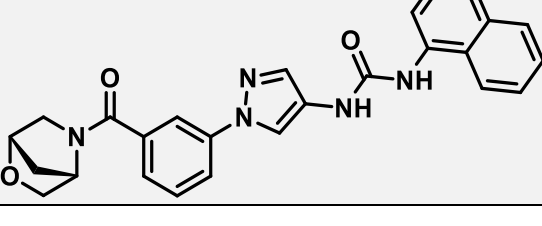
Nr.	Struktur	IC50 (JNK1) [M]	IC50 (JNK2) [M]	IC50 (JNK3) [M]
Referenz : TCS JNK 5a		1.01E-05	8.78E-08	7.08E-08
Referenz : Tanzi- sertib (CC- 930)		1.36E-08	3.32E-09	3.00E-09
Referenz : A-1		1.70E-07	3.77E-08	1.61E-08
P-1		4.05E-07	1.62E-08	1.55E-08
P-2	HCl 	1.32E-07	1.29E-08	7.29E-09
P-3	HCl 	1.36E-07	1.07E-08	9.30E-09

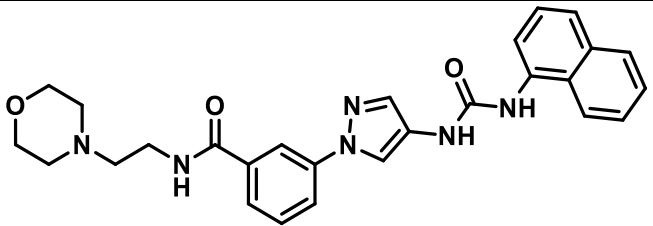
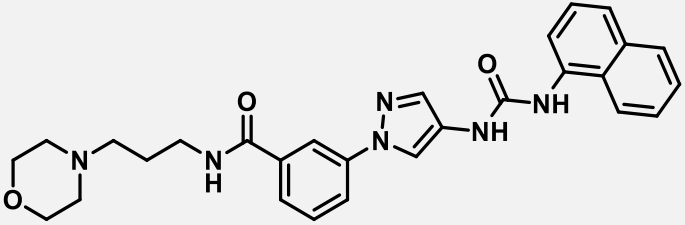
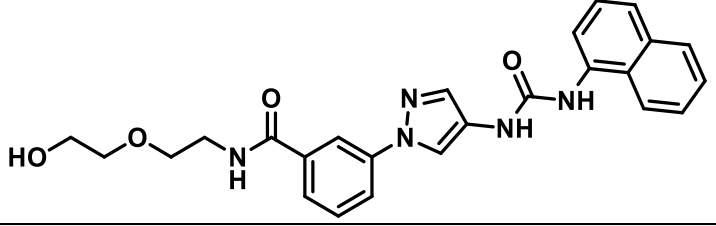
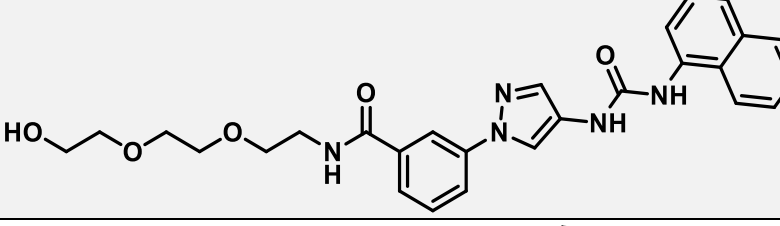
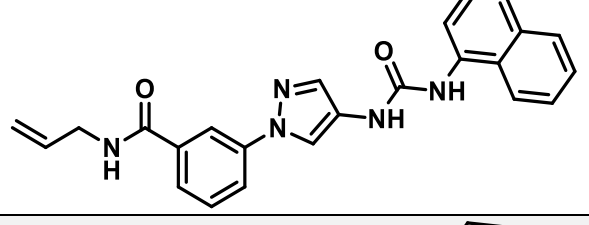
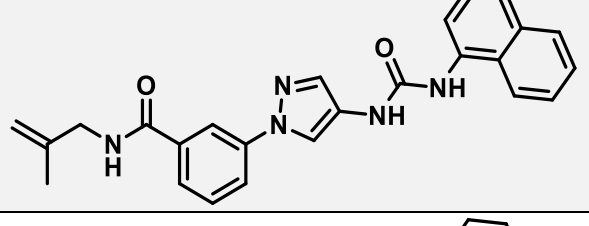
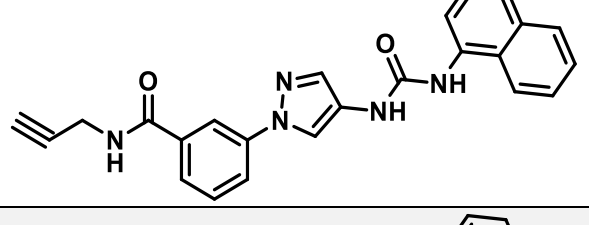
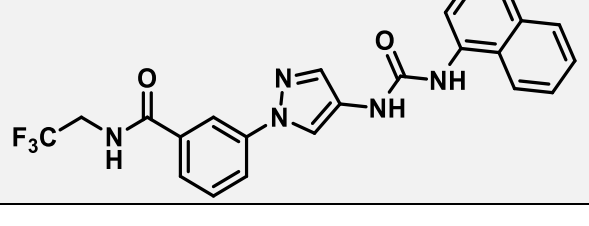
P-4		4.88E -07	3.83E -08	3.75E -08
P-5		4.97E -06	5.55E -07	2.67E -07
P-6		7.41E -06	6.06E -07	1.28E -06
P-7		2.49E -05	1.07E -05	1.00E -04
P-8		8.54E -05	1.00E -04	1.00E -04
P-9		4.35E -05	2.66E -05	1.29E -05
P-10		1.11E -07	6.81E -09	6.33E -09

P-11		1.00E-04	1.00E-04	1.00E-04
P-12		1.00E-04	1.00E-04	1.00E-04
P-13		1.00E-04	1.00E-04	1.00E-04
P-14		1.00E-04	4.52E-07	5.91E-07
P-15		1.00E-04	1.00E-04	1.00E-04
P-16		1.00E-04	6.81E-06	8.82E-06
P-17		3.79E-05	1.41E-06	1.84E-06
P-18		1.00E-04	1.00E-04	1.00E-04
P-19		5.00E-05	1.23E-05	1.02E-05
P-20		9.99E-06	2.01E-05	7.60E-06

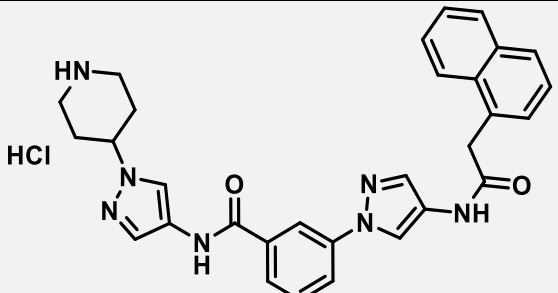
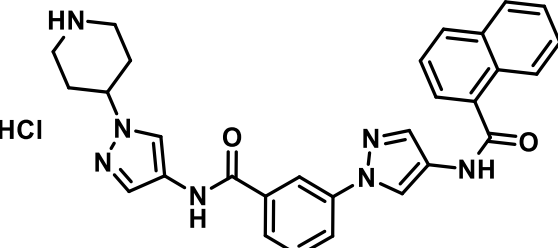
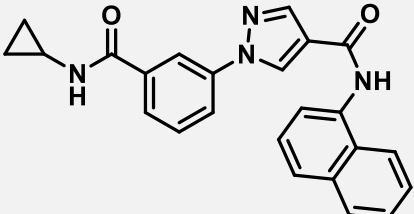
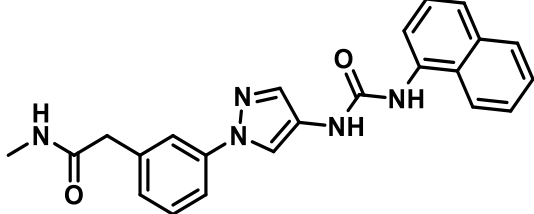
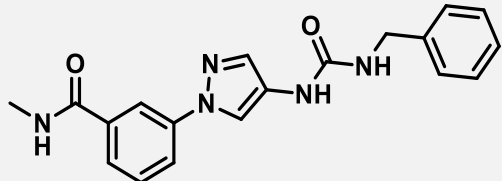
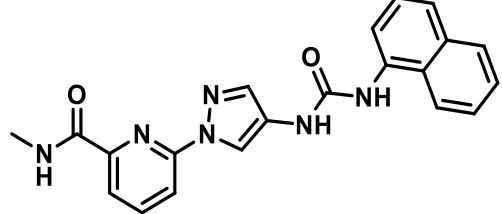
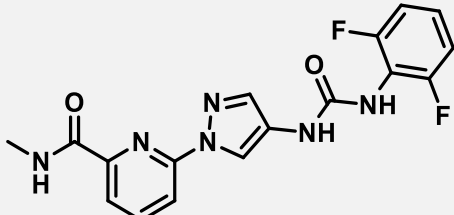
P-21	 <chem>C1CCNCC1CNc2c[nH]c3c2c[nH]3C(=O)Nc4ccc5c4c[nH]5C(=O)Nc6cccc7c6c[nH]7</chem> HCl	1.26E-06	2.72E-06	2.24E-06
P-22	 <chem>Cc1c[nH]c2c1c[nH]2C(=O)Nc3cccc4c3c[nH]4</chem>	-	-	-
P-23	 <chem>c1ccc(cc1)n2c[nH]c3c2c[nH]3C(=O)Nc4cccc5c4c[nH]5</chem>	3.47E-05	3.05E-07	2.34E-07
P-24	 <chem>c1ccc2c(c1)c[nH]2C(=O)Nc3cccc4c3c[nH]4</chem>	1.00E-04	3.34E-07	2.19E-07
P-25	 <chem>c1ccc2c(c1)c[nH]2C(=O)Nc3cccc4c3c[nH]4</chem>	2.65E-05	2.76E-06	1.43E-06
P-26	 <chem>c1ccc2c(c1)c[nH]2C(=O)Nc3cccc4c3c[nH]4</chem>	2.71E-05	4.35E-07	3.33E-07
P-27	 <chem>c1ccc(cc1)-c2ccc3c2c[nH]3C(=O)Nc4cccc5c4c[nH]5</chem>	9.40E-05	6.94E-05	5.85E-05
P-28	 <chem>CC(C)CNC(=O)c1ccc2c1c[nH]2C(=O)Nc3cccc4c3c[nH]4</chem>	6.23E-06	1.13E-06	6.15E-07

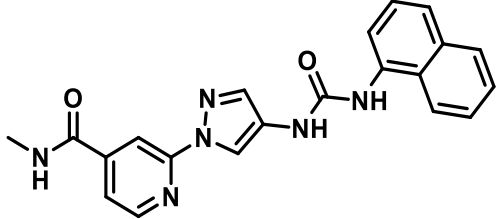
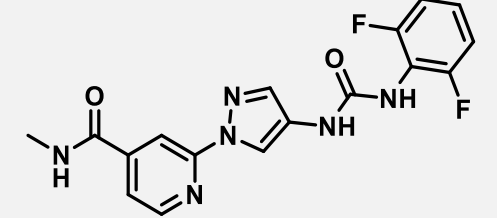
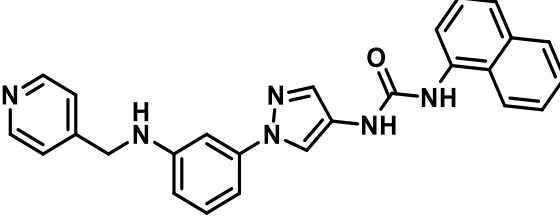
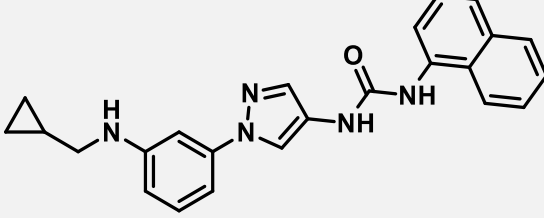
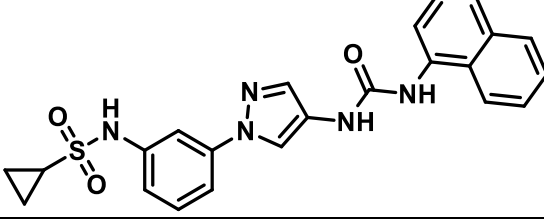
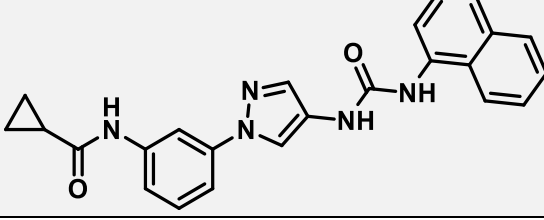
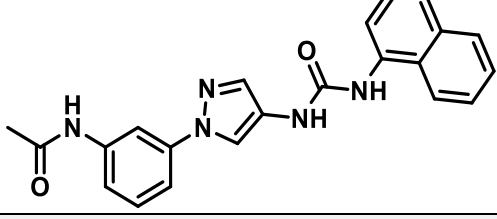
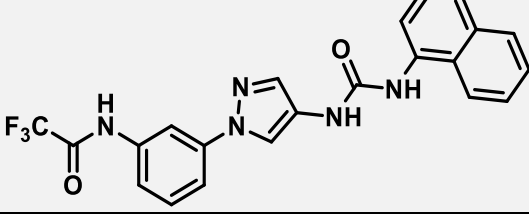
P-29		6.26E-05	4.05E-06	2.54E-06
P-30		6.98E-06	2.89E-07	3.59E-07
P-31		1.16E-05	1.38E-07	1.87E-07
P-32		1.50E-05	1.02E-07	5.36E-08
P-33		1.36E-05	1.57E-07	2.23E-07
P-34		4.75E-05	5.46E-06	3.35E-06
P-35		6.30E-06	8.74E-07	3.96E-07
P-36		3.72E-06	9.63E-07	4.17E-07

P-37		1.35E -05	6.37E -07	3.34E -07
P-38		6.08E -06	7.28E -08	4.53E -08
P-39		9.02E -07	8.67E -08	6.15E -08
P-40		5.02E -07	3.76E -08	3.17E -08
P-41		1.02E -06	8.82E -08	6.51E -08
P-42		3.83E -06	1.56E -07	1.18E -07
P-43		1.08E -05	3.19E -07	2.44E -07
P-44		3.51E -05	4.55E -06	6.07E -06

P-45		1.38E-06	1.15E-07	1.26E-07
P-46		6.59E-07	4.88E-08	6.65E-08
P-47		5.33E-06	2.29E-07	2.35E-07
P-48		8.97E-06	5.33E-07	4.18E-07
P-49		1.99E-05	1.26E-07	1.58E-07
P-50		1.83E-05	6.38E-07	7.37E-07
P-51		1.40E-06	5.85E-08	6.43E-08
P-52		1.34E-05	9.60E-06	9.95E-06

P-53		1.33E-07	1.35E-08	1.83E-08
P-54		2.08E-07	2.56E-08	2.83E-08
P-55		1.18E-06	1.84E-07	2.27E-07
P-56		2.02E-05	1.51E-06	8.34E-07
P-57		6.55E-06	2.73E-06	2.95E-06
P-58		1.85E-05	1.83E-06	2.15E-06
P-59		3.26E-05	2.05E-06	3.06E-06

P-60		6.05E -06	3.27E -07	2.70E -07
P-61		4.44E -07	2.52E -08	2.84E -08
P-62		4.45E -05	4.96E -05	6.13E -05
P-63		7.10E -06	1.57E -07	1.61E -07
P-64		1.00E -04	7.77E -05	8.48E -05
P-65		2.06E -05	4.00E -07	6.86E -07
P-66		2.26E -05	2.87E -06	2.55E -06

P-67		4.48E-05	5.33E-07	6.30E-07
P-68		8.39E-05	3.94E-06	2.50E-06
P-69		7.61E-05	4.56E-07	3.53E-07
P-70		1.47E-05	7.20E-07	7.49E-07
P-71		3.10E-06	3.19E-07	3.39E-07
P-72		3.54E-05	2.57E-06	3.21E-06
P-73		1.00E-04	2.94E-07	2.70E-07
P-74		3.35E-05	2.26E-07	1.39E-06

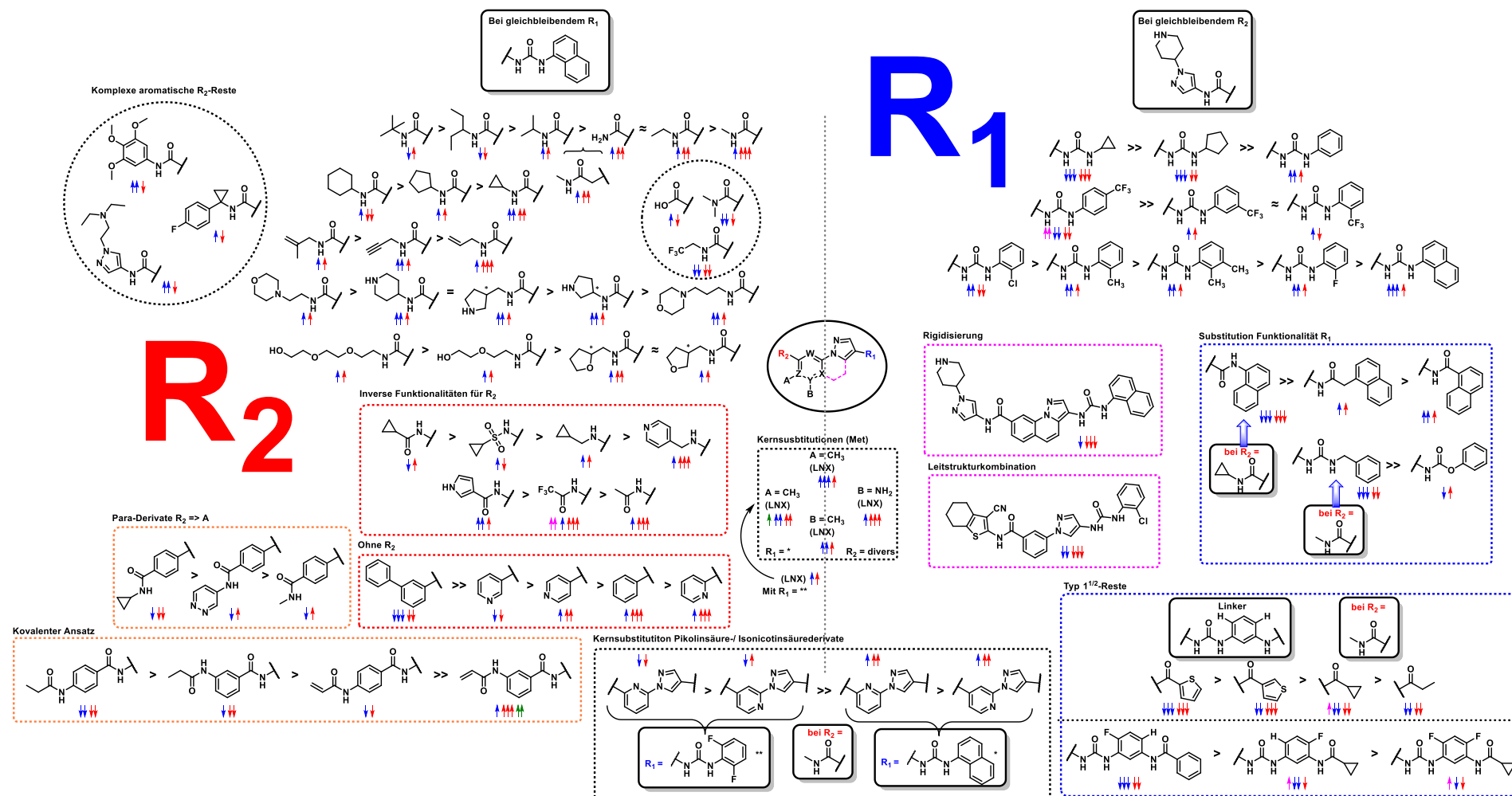
P-75		6.84E -07	3.10E -08	5.22E -08
P-76		3.56E -07	2.58E -08	2.85E -08
P-77		4.89E -08	4.34E -09	5.76E -09
P-78		2.91E -05	1.61E -07	2.24E -07
P-79		3.18E -06	6.42E -08	6.38E -08
P-80		4.99E -06	7.32E -07	3.56E -07
P-81		8.13E -07	4.55E -05	6.55E -07

P-82		4.73E -07	2.77E -06	8.21E -07
P-83		7.14E -07	2.54E -06	8.18E -07
P-84		3.15E -05	1.21E -05	2.38E -05
P-85		2.56E -05	1.32E -05	4.04E -05
P-86		1.78E -05	2.37E -05	3.37E -05
P-87		6.96E -06	1.95E -05	3.07E -05
P-88		9.79E -05	4.46E -05	1.00E -04

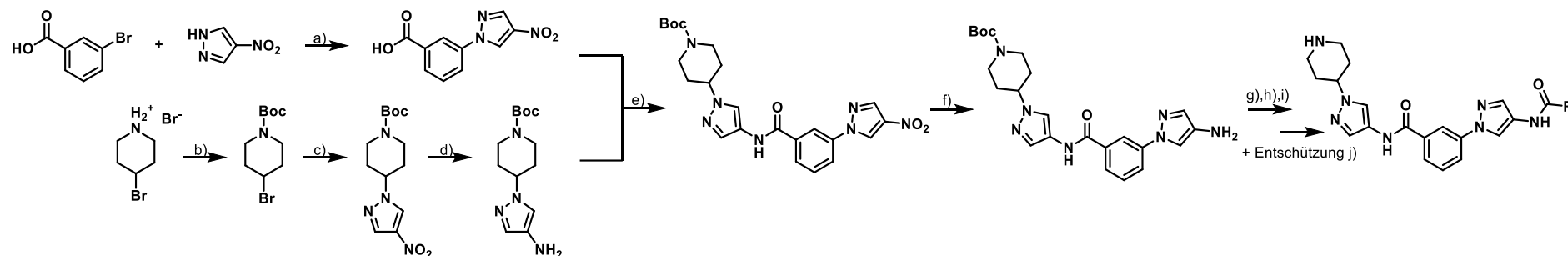
P-89		1.00E -04	1.79E -05	5.32E -05
P-90		2.66E -05	3.30E -06	1.31E -05
P-91		2.63E -05	7.09E -06	7.73E -06
P-92		7.63E -06	1.31E -06	1.92E -06
P-93		1.84E -05	3.84E -06	5.20E -06
P-94		1.00E -04	8.30E -07	1.91E -06

8.2 Zusammenfassung der SARs der synthetisierten Aminopyrazol-Derivaten

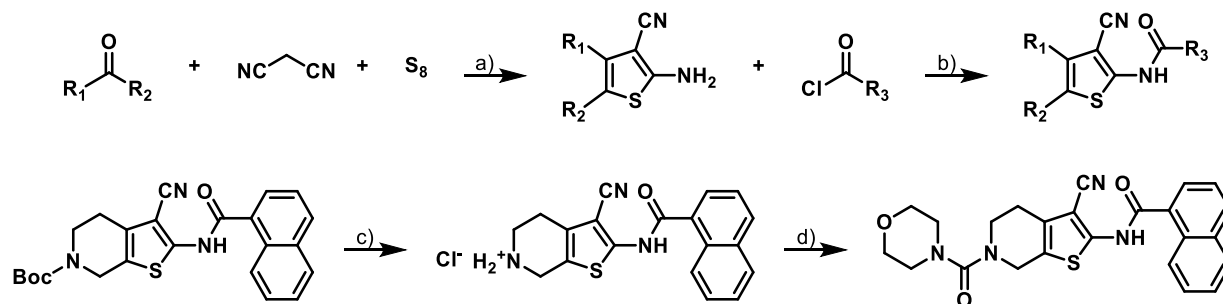
Abbildung 33: Zusammenfassung der SARs am Aminopyrazol-basierten Grundgerüst.*



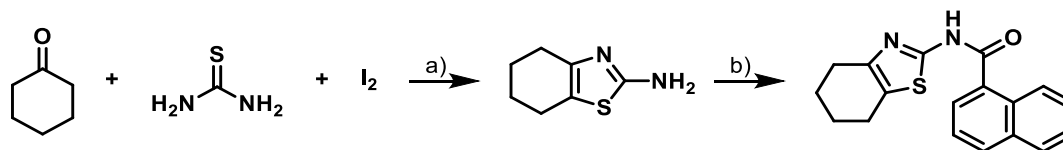
8.3 Liste aller durchgeführten Syntheserouten

Route 1: Synthese der Verbindungen P-1-P-10 + P-59-P-61

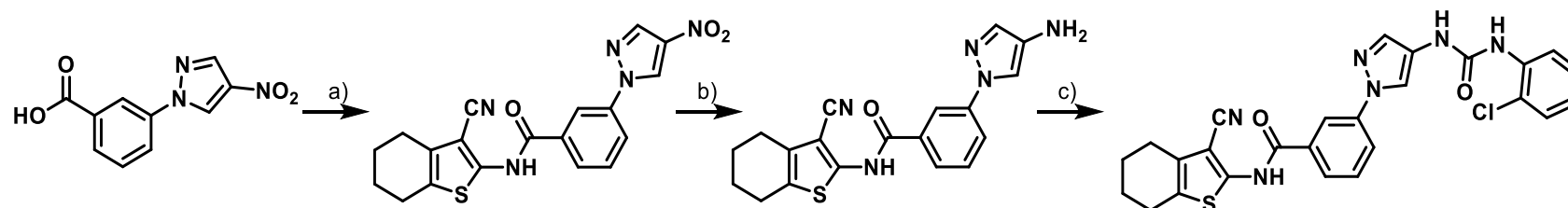
Schema 39: Syntheseroute der Endstufen **P-1-P-10 + P-59-P-61**. Route leicht abgewandelt nach Zheng et al.¹³³ Die Reaktionen **g) + j)** sind für die Synthese von **A-1**, **h)** ist für die Synthese von **P-59** und **i)** ist für die Synthese von **P-60** beschrieben: **a)** 4-Nitro-1H-pyrazol (1 eq.), 3-Brombenzoesäure (1,5 eq.), Cs₂CO₃ (3 eq.), *trans*-N,N'-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,4 eq.), Cu(I) (0,2 eq.), DMF (trocken), 95 °C (88 %); **b)** 4-Brompiperidin·HBr (1 eq.), Di-*tert*-butyldicarbonat (1 eq.), DIPEA (2 eq.), DCM, RT (93 %); **c)** **S-2** (1,8 eq.), 4-Nitro-1H-pyrazol (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), ACN (trocken), 85°C (61 %); **d)** **S-3** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave[®] Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,014 eq.), EtOAc, 40 °C (98 %). **e)** **S-1** (1 eq.), **S-4** (1,02 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 20 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), RT (82 %); **f)** **S-5** (1 eq.), Fe(0) (10 eq.), NH₄Cl (10 eq.), EtOH:H₂O (2:1), 65-70 °C (89 %); **g)** **S-6** (1 eq.), 2-Chlorphenylisocyanat (1 eq.), DCM, RT; **h)** **S-6** (1 eq.), Phenylchlorformiat (1 eq.), TEA (1 eq.), THF (trocken), RT; **i)** **S-6** (1 eq.), 2-(Naphthalen-1-yl)essigsäure (1 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), RT; **j)** Produkt aus g) (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (5 eq.), EtOH, 50°C (79 %, über zwei Stufen).

Route 2: Synthese der Verbindungen P-11-P-18

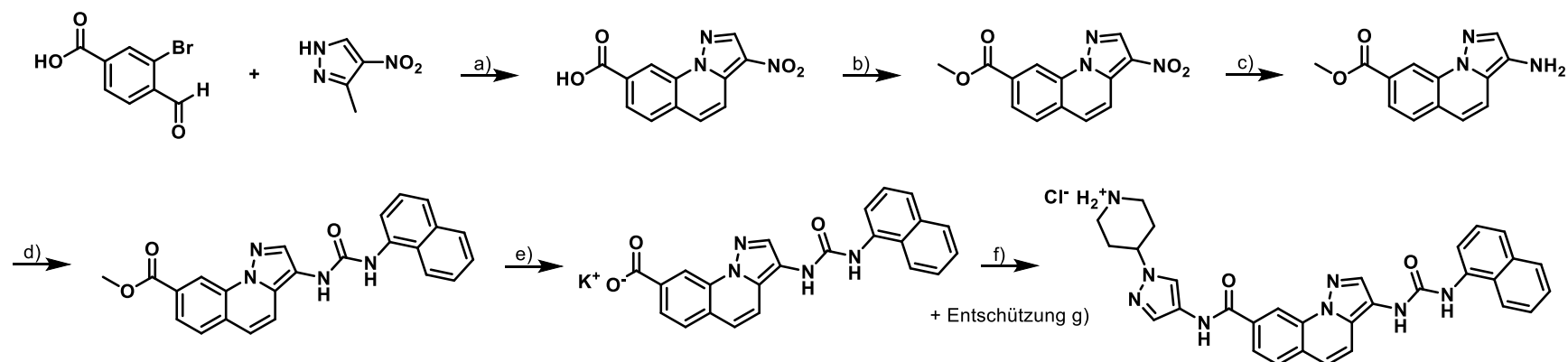
Schema 40: Syntheseroute der Endstufen **P-11-P-18**. Route leicht abgewandelt nach Angel et al.¹²⁹ Die Reaktionen **a) + b)** sind für die Synthese von **P-14**, **c) + d)** sind für die Synthese von **P-17** beschrieben: **a)** Cycloheptanon (1 eq.), Malononitril (1 eq.), S₈ (1 eq.), TEA (1 eq.), EtOH, 70 °C (52 %); **b)** **S-12** (1 eq.), 1-Naphthoesäurechlorid (1 eq.), Pyridin (trocken), 0°C-70°C (19 %); **c)** **S-19** (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (5 eq.), EtOH, 60 °C (59 %); **d)** **P-16** (1 eq.), Morpholincarboxylchlorid (1 eq.), TEA (2 eq.), Toluol (trocken), RT-60 °C (73 %).

Route 2a: Synthese der Verbindung P-19

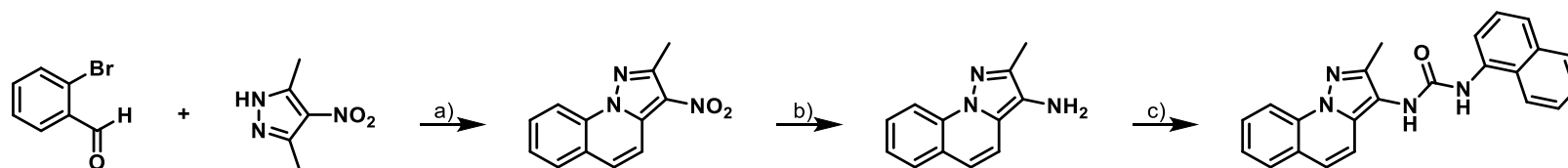
Schema 41: Syntheseroute der Endstufe **P-19**. Synthese der Aminothiazol-Zwischenstufe leicht abgewandelt nach King et al.¹⁵⁵ **a)-1** Cyclohexanon (1 eq.), Thioharnstoff (2 eq.), I₂ (1 eq.), 105 °C; **a)-2** NaOH (aq.), DCM, RT (*crude*); **b)** **S-22** (1 eq.), Naphthoesäurechlorid (1 eq.), Pyridin (trocken), 40-50°C (27 %).

Route 2b: Synthese der Verbindung P-20

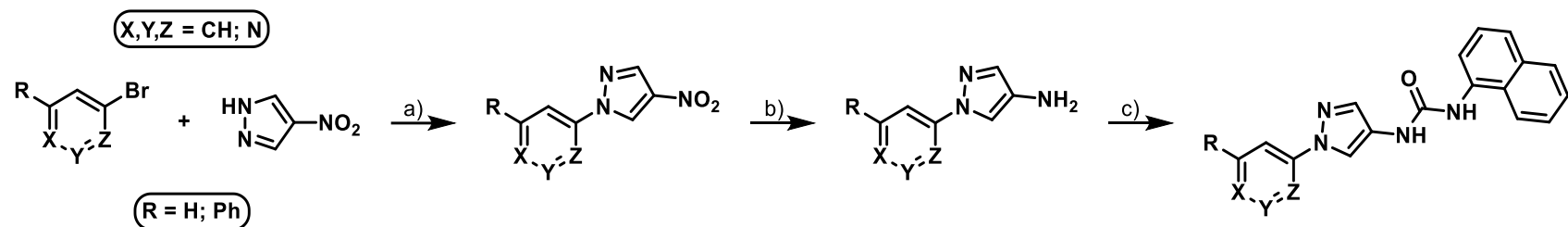
Schema 42: Syntheseroute der Endstufe **P-20**: **a)-1** **S-1** (1 eq.), Oxalylchlorid (3 eq.), DMF (kat.), DCM (trocken), RT; **a)-2** **S-11** (1 eq.), Pyridin, 0-80 °C (54 %); **b)** **S-20** (1 eq.), Fe(0) (10 eq.), NH₄Cl (10 eq.), EtOH:H₂O (3:1), 65-70 °C (*crude*); **c)** **S-21** (1 eq.), 2-Chlorphenylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (55 %).

Route 3: Synthese der Verbindung P-21

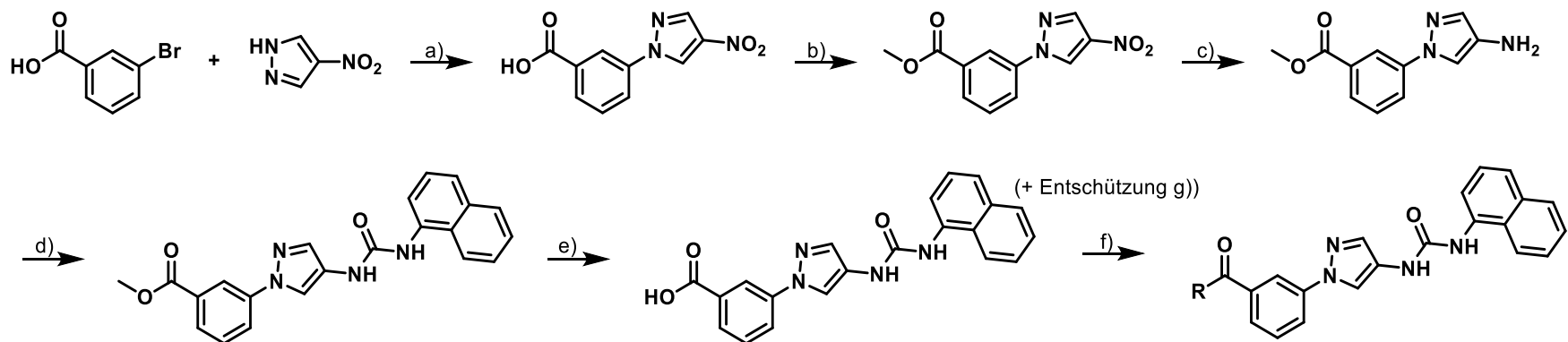
Schema 43: Syntheseroute der Endstufe **P-21**. Synthese der Zwischenstufe **S-78** nach Obuleso et al.¹⁶⁷ **a)** 3-Methyl-4-nitropyrazol (1 eq.), 3-Brom-4-formylbenzoesäure (1 eq.), K_2CO_3 (4 eq.), Cu(I) (0,1 eq.), 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin (0,2 eq.), DMSO, 120-125 °C (*crude*); **b)** **S-78** (1 eq.), H_2SO_4 (kat.), MeOH, Rückfluss (*crude*); **c)** **S-79** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH_4Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (5:1), 60 °C (78 %); **d)** **S-80** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (quant.); **e)** **S-81** (1 eq.), KOH (6 eq.), THF:MeOH:H₂O (10:10:1), 60 °C (22 %); **f)** **S-82** (1 eq.), **S-4** (2 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBt Monohydrat (enthält 14 % Wasser) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), THF (trocken); **g)** Produkt aus f) (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (10 eq.), EtOH, 60°C (60 %, über zwei Stufen).

Route 3a: Synthese der Verbindung P-22

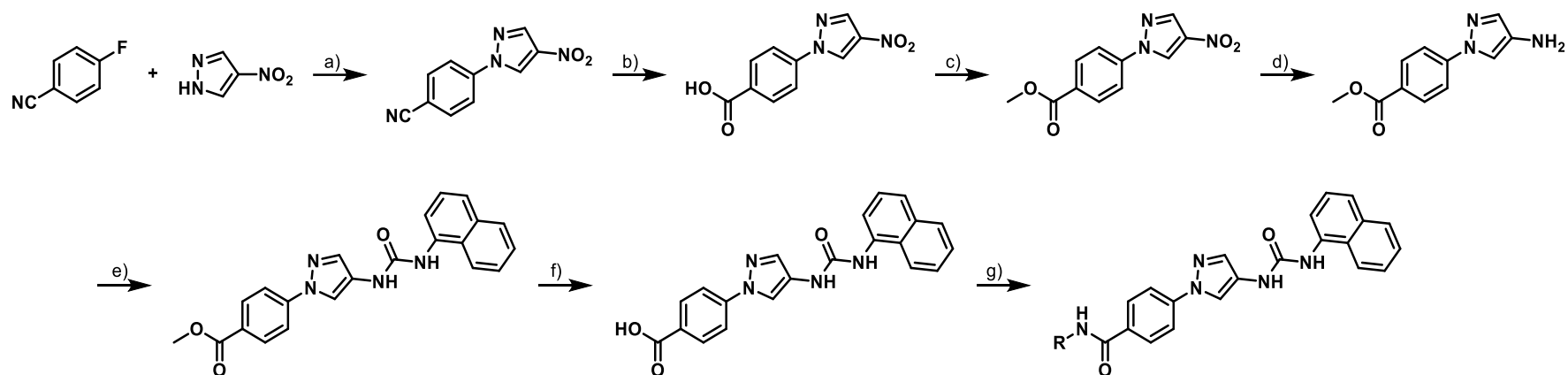
Schema 44: Syntheseroute der Endstufe **P-21**. Synthese der Zwischenstufe **S-76** nach Obuleso et al.¹⁶⁷ **a)** 3,5-Dimethyl-4-nitropyrazol (1 eq.), 2-Brombenzaldehyd (1 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), Cu(I) (0,1 eq.), 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin (0,2 eq.), DMSO, 120-125 °C (22 %); **b)** **S-76** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH_4Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 55-60 °C (80 %); **c)** **S-77** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (78 %).

Route 4: Synthese der Verbindung P-23-P-27

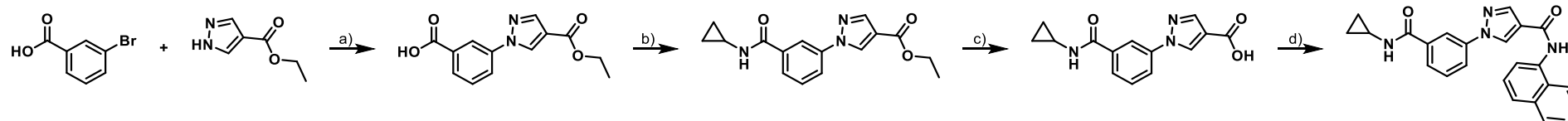
Schema 45: Syntheseroute der Endstufen **P-23-P-27**. Die Reaktionen sind für die Synthese von **P-24** beschrieben: **a)** 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 2-Brompyridin (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF, 95 °C (86 %); **b)** **S-37** (1 eq.), Fe(0), (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (93 %); **c)** **S-38** (1 eq.), 1 Naphthylisocyanat (1 eq.), THF, RT (62 %).

Route 5: Synthese der Verbindungen P-28-P-55

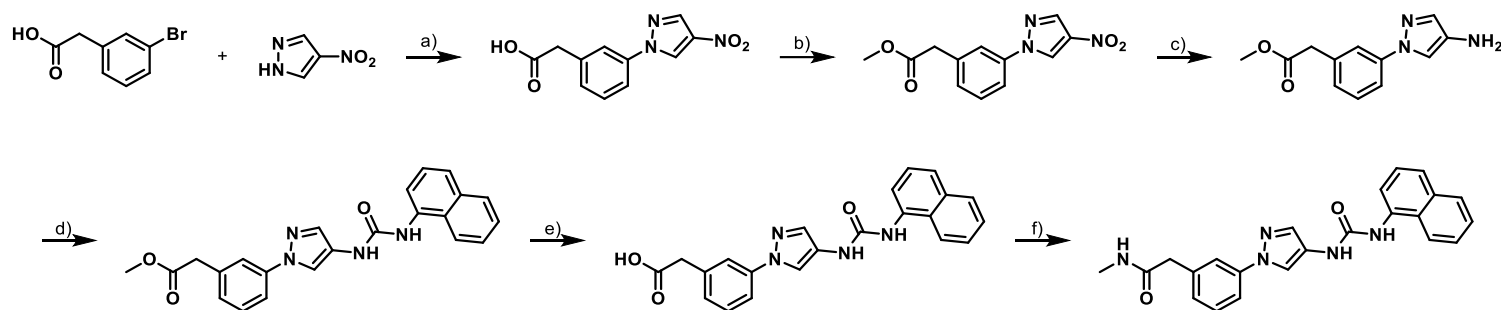
Schema 46: Syntheseroute der Endstufen **P-28-P-55**. Die Reaktionen sind für die Synthese von **P-38** beschrieben. Reaktion **g)** ist für Synthese von **P-40** beschrieben: **a)** **S-1** (1 eq.), H₂SO₄ (kat.), MeOH, Reflux (76 %); **b)** **S-23** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (3:1), 60 °C (91 %); **c)** **S-24** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM, 0 °C- RT (87 %); **d)** **S-25** (1 eq.), KOH (7,5 eq.), MeOH:H₂O (20:1), 60 °C (86 %); **e)** **P-35** (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (4 eq.), DMF (trocken), 0 °C-RT (92 %); **g)** Produkt aus f) (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (5 eq.), EtOH, 60°C (59 %, über zwei Stufen)

Route 6: Synthese der Verbindungen P-56-P-58

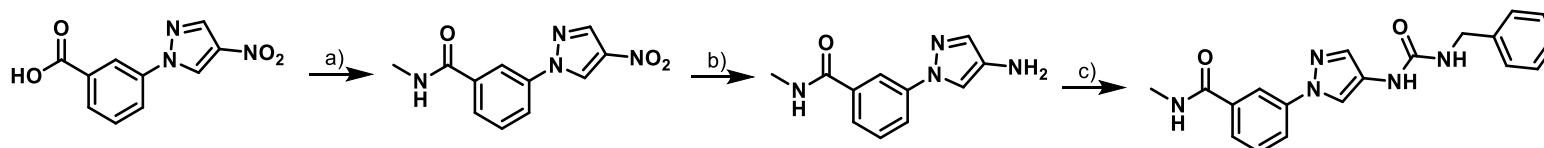
Schema 47: Syntheseroute der Endstufen **P-56-P-58**. Die Reaktion **g**) sind für die Synthese von **P-57** beschrieben: **a**) 4-Fluorbenzonitril (1 eq.), 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1,1 eq.), K₂CO₃ (2,5 eq.), DMSO, 120 °C (quant.); **b**) **S-83** (1 eq.), konz. HCl (aq.), 85 °C -Reflux (69 %); **c**) **S-84** (1 eq.), H₂SO₄ (kat.), MeOH, Reflux (79 %); **d**) **S-85** (1 eq.), Fe(0) (10 eq.), NH₄Cl (10 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (89 %); **e**) **S-86** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM, RT (92 %); **f**) **S-87** (1 eq.), KOH (6 eq.), MeOH:THF:H₂O (10:10:1), 60 °C (89 %); **g**) **S-88** (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), HATU (1,5 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (95 %).

Route 7: Synthese der Verbindungen P-62

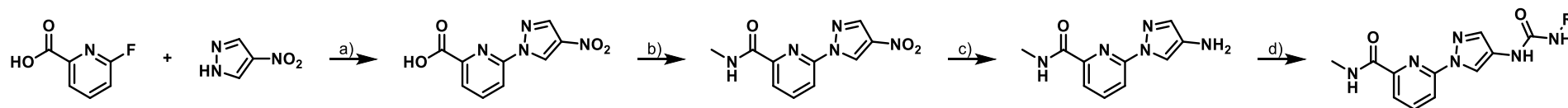
Schema 48: Syntheseroute der Endstufe **P-62**. Route leicht abgewandelt nach Zheng et al.¹³³ **a**) Ethyl-4-pyrazolcarboxylat (1 eq.), 3-Brombenzoesäure (1,2 eq.), Cs₂CO₃ (3 eq.), *trans*-*N,N*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,05 eq.), DMF (trocken), 100 °C (73 %); **b**) **S-7** (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBT Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (4 eq.), DMF (trocken), RT (72 %); **c**) **S-8** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (5 eq.), MeOH:H₂O (1:1), RT (83 %); **d-1**) **S-9** (1 eq.), Oxalylchlorid (2,4 eq.), DMF (kat.), THF:DCM (2:1), 35-40 °C; **d-2**) 1-Naphthylamin (1 eq.), Pyridin, 0°C-RT (46 %).

Route 8: Synthese der Verbindung P-63

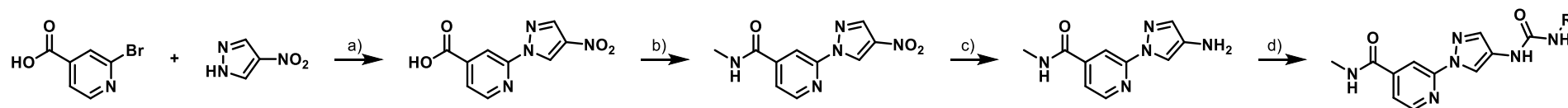
Schema 49: Syntheseroute der Endstufe **P-63**. **a)** 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 3-Brom-phenyllessigsäure (1 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF (trocken), 95 °C (*crude*); **b)** **S-26** (1 eq.), H_2SO_4 (kat.), MeOH, 65 °C (36 %, über zwei Stufen); **c)** **S-27** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH_4Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (94 %); **d)** **S-28** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM, RT (83 %); **e)** **S-29** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (5 eq.), MeOH:H₂O (1:1), RT (92 %); **f)** **S-30** (1 eq.), 2 M Methylamin (THF) (2 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBt Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (27 %).

Route 9: Synthese der Verbindung P-64

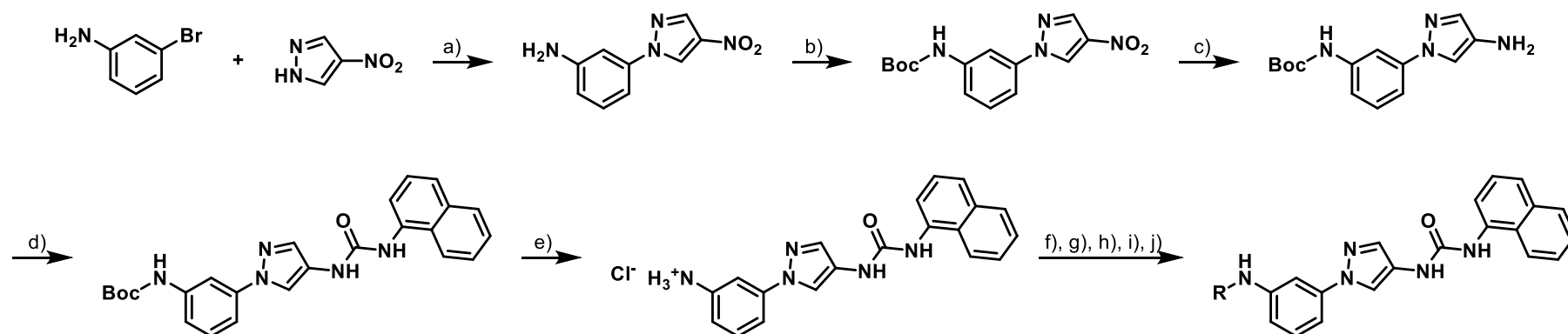
Schema 50: Syntheseroute der Endstufe **P-64**. **a)** **S-1** (1 eq.), 2 M Methylamin (THF) (1 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBt Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), 0 °C-RT (91 %); **b)** **S-31** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH_4Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (*crude*); **c)** **S-32** (1 eq.), Benzylisocyanat (1 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken), RT (29 %).

Route 9: Synthese der Verbindungen P-65+P-66

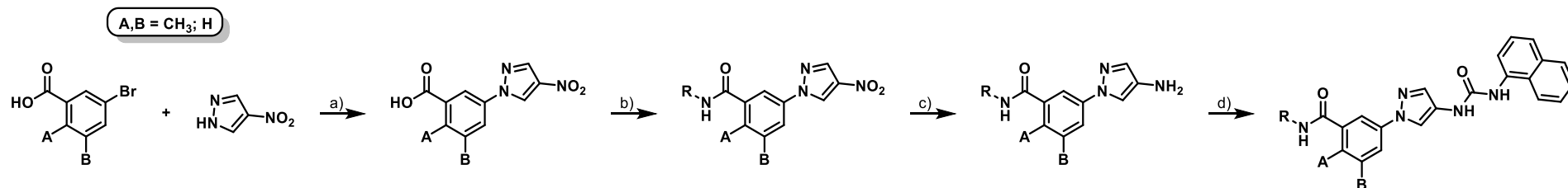
Schema 51: Syntheseroute der Endstufen **P-65+P-66**. Die Reaktion **d**) ist für die Synthese von **P-65** beschrieben: **a**) 4-Nitro-1H-pyrazol (1 eq.), 6-Fluorpicolinsäure (1 eq.), Methansulfonsäure (5 eq.), Dioxan, Rückfluss (66 %); **b**) **S-60** (1 eq.), 40 % MeNH₂ (aq.) (3 eq.), CDI (1,25 eq.), THF (trocken), 50 °C-RT (54 %); **c**) **S-61** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (75 %); **d**) **S-62** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), THF (trocken), RT (26 %).

Route 10: Synthese der Verbindungen P-67+P-68

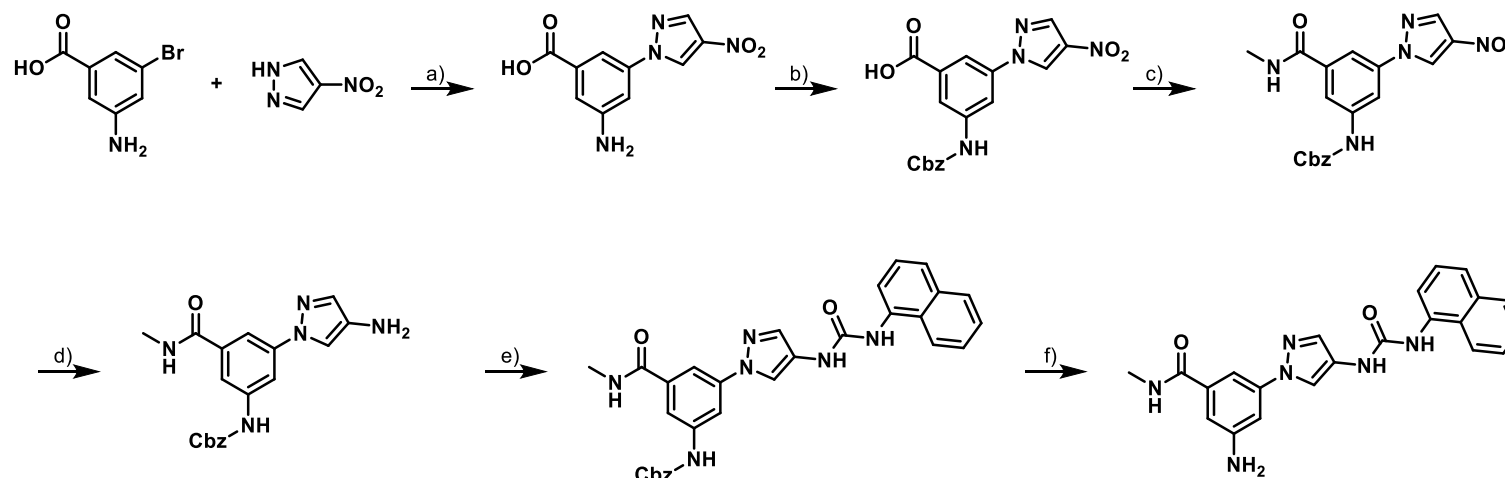
Schema 52: Syntheseroute der Endstufen **P-67+P-68**. Die Reaktion **d**) ist für die Synthese von **P-68** beschrieben: **a**) 4-Nitro-1H-pyrazol (1 eq.), 2-Bromisonicotinsäure (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), *trans*-N,N'-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF, 95 °C (95 %); **b**) **S-63** (1 eq.), 40 % MeNH₂ (aq.) (2,5 eq.), CDI (1,1 eq.), THF (trocken), RT (79 %); **c**) **S-64** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (65 %); **d**) **S-65** (1 eq.), 2,6-Difluorphenylisocyanat (1 eq.), THF (trocken), RT (64 %).

Route 11: Synthese der Verbindungen P-69-P-75 + P-91-P-94

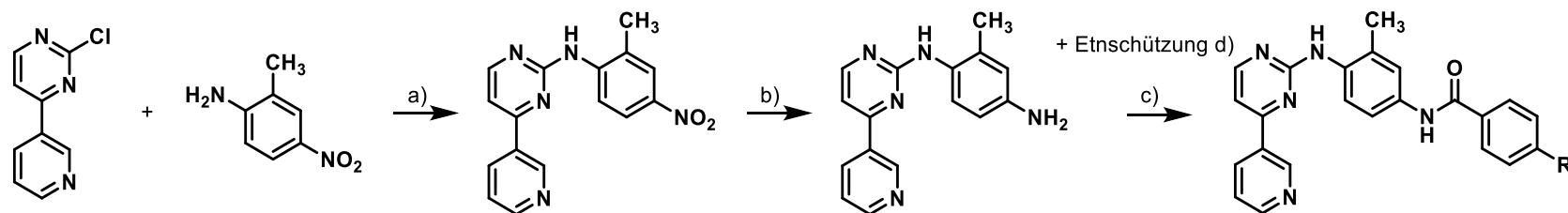
Schema 53: Syntheseroute der Endstufen **P-69-P-75 + P-91-P-94**. Die Reaktion **f**) ist für die Synthese von **P-73**, **g**) ist für die Synthese von **P-75**, **h**) ist für die Synthese von **P-71**, **i**) ist für die Synthese von **P-69** und **j**) ist für die Synthese von **P-74** beschrieben: **a**) 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 3-Bromanilin (1,2 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I)I (0,1 eq.), DMF, 100 °C (41 %); **b**) **S-109** (1 eq.), Di-*tert*-butyldicarbonat (1 eq.), *t*-BuOH, 40-50 °C (70 %); **c**) **S-110** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (3:1), 60 °C (76 %); **d**) **S-111** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (83 %); **e**) **S-112** (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH) (5 eq.), EtOH, 50-60 °C (80 %); **f**) **S-113** (1 eq.), Acetylchlorid (1 eq.), Pyridin (trocken), 0 °C-RT (60 %); **g**) **S-113** (1 eq.), Pyrrol-3-carbonsäure (1 eq.), HATU (1,25 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (6 %); **h**) **S-113** (1 eq.), Cyclopropansulfonylchlorid (1 eq.), THF:Pyridin (2:1), RT (20 %); **i**) **S-113** (1 eq.), Isonicotinaldehyd (1,05 eq.), NaCNBH₃ (1,5 eq.), MeOH (gepuffert auf pH 5 mit AcOH/AcONa) RT (74 %); **j**) **S-113** (1 eq.), Trifluoressigsäureanhydrid (1,2 eq.), TEA (2 eq.), THF (trocken), RT (37 %).

Route 12: Synthese der Verbindungen P-76-P-77+P-79+P-80

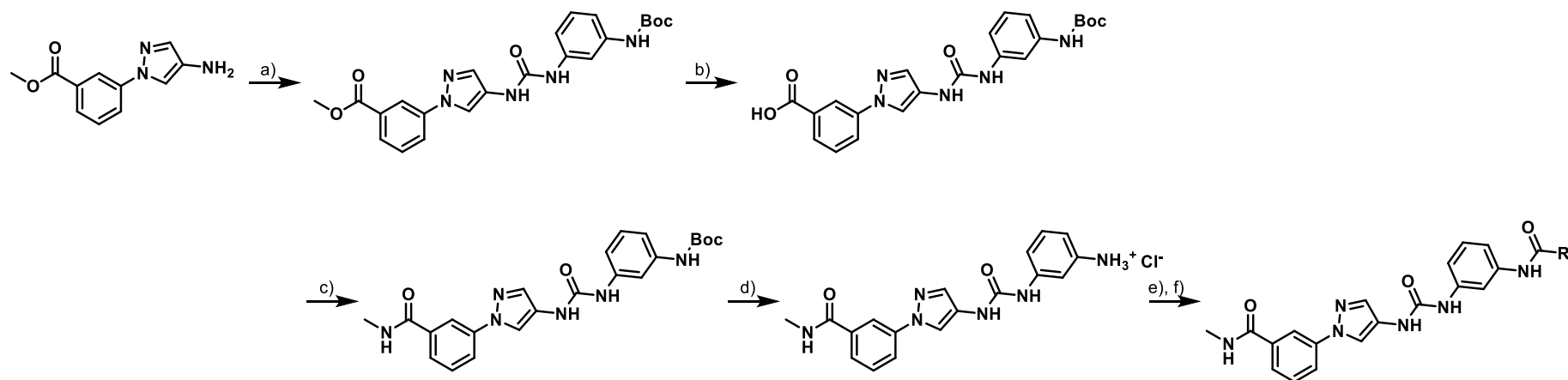
Schema 54: Syntheseroute der Endstufen **P-76+P-77+P-79+P-80**. Reaktionen hier sind für die Synthese von **P-79** beschrieben. **a**) 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 5-Brom-2-methylbenzoesäure (1,28 eq.), Cs₂CO₃ (3 eq.), Cu(I)I (0,3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,3 eq.), DMF (trocken), 100 °C (69 %); **b**) **S-45** (1 eq.), Cyclopropylamin (2 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (80 %); **c**) **S-51** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (4:1), 60 °C (*crude*). **d**) **S-52** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), DCM (trocken), RT (42 %).

Route 13: Synthese der Verbindung P-78

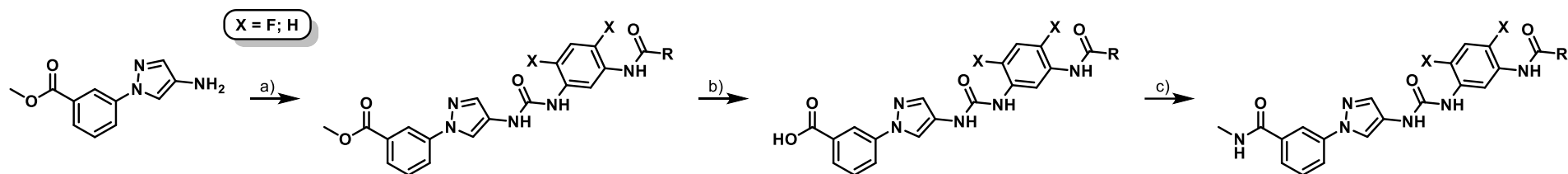
Schema 55: Syntheseroute der Endstufe **P-78**. **a)** 4-Nitro-1*H*-pyrazol (1 eq.), 3-Amino-5-brombenzoesäure (1 eq.), K_2CO_3 (3 eq.), *trans*-*N,N'*-Dimethylcyclohexan-1,2-diamin (0,2 eq.), Cu(I) (0,1 eq.), DMF, 100 °C (56 %); **b)** **S-54** (1 eq.), Chlorameisensäurebenzylester (1 eq.), $NaHCO_3$ (5 eq.), Dioxan:H₂O (1:1), 0 °C – RT (78 %); **c)** **S-55** (1 eq.), 40 % MeNH₂ (aq.) (2,5 eq.), CDI (1,5 eq.), THF, RT (69 %); **d)** **S-56** (1 eq.), Fe(0) (5 eq.), NH₄Cl (5 eq.), EtOH:H₂O (6:1), 60 °C (95 %); **e)** **S-57** (1 eq.), 1-Naphthylisocyanat (1 eq.), THF (trocken), RT (72 %); **f)** **S-58** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave® Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,1 eq.), MeOH, RT (40 %).

Route 14: Synthese der Verbindungen P-81-P-83

Schema 56: Syntheseroute der Endstufen **P-81-P-83**. Route leicht abgewandelt nach Liu et al. und Zimmermann et al.^{172, 173} Die Reaktionen **c)** + **d)** sind für die Synthese von **P-81** beschrieben: **a)** 1-Brom-2-methyl-4-nitrobenzen (1 eq.), 4-(Pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amin (1,1 eq.), K_2CO_3 (2 eq.), Cu(I) (0,25 eq.), (90 %) *N,N'*-Dimethylethylendiamin (0,25 eq.), Dioxan, 100 °C (28 %); **b)** **S-101** (1 eq.), H₂ (7 bar) via miniclave® Glasreaktor, Pd/C (10 %) (0,05 eq.), EtOAc, 50 °C (89 %); **c)** **S-102** (1 eq.), 4-(Methoxycarbonyl)benzoesäure (1 eq.), EDC·HCl (2 eq.), HOBt Monohydrat (enthält 14 wt % H₂O) (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DCM (trocken) (42 %); **d)** **S-105** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (5 eq.), MeOH:H₂O:THF (2:2:1), RT (94 %).

Route 15: Synthese der Verbindungen P-84-P-87

Schema 57: Syntheseroute der Endstufen **P-84-P-87**. Die Reaktionen **e** + **f** sind für die Synthese von **P-85** beschrieben: **a**) **S-24** (1 eq.), *tert*-Butyl(3-aminophenyl)carbammat (1 eq.), Phenylchlorformiat (1 eq.), Pyridin (1 eq.), DIPEA (2 eq.), ACN (trocken) 0°C -50 °C (49 %); **b**) **S-90** (1 eq.), 1 M LiOH (10 eq.), MeOH:THF:H₂O (2:2:1), RT (91 %); **c**) **S-91** (1 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (88 %); **d**) **S-92** (1 eq.), 1,25 M HCl (EtOH), EtOH, 60 °C (quant.); **e**) **S-93** (1 eq.), Cyclopropancarbonsäurechlorid (1 eq.), Pyridin (trocken), 0°C – RT (50 %); **f**) **S-93** (1 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (5 eq.), 3-Thiophencarbonsäure (2 eq.), DMF (trocken), RT (35 %).

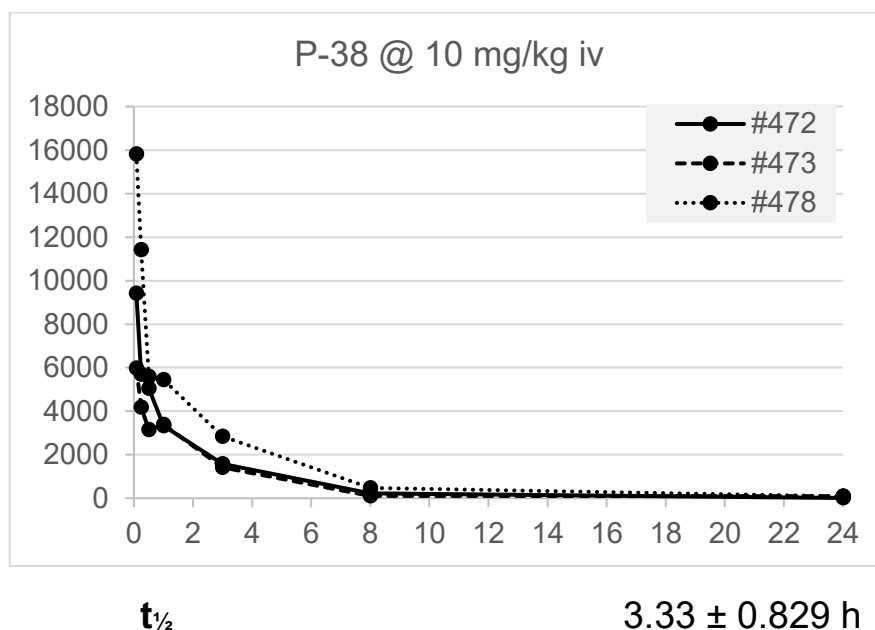
Route 16: Synthese der Verbindungen P-88-P-90

Schema 58: Syntheseroute der Endstufen **P-88-P-90**. Die Reaktionen sind für die Synthese von **P-89** beschrieben: **a**) **S-24** (1 eq.), *N*-(5-Amino-2-fluorphenyl)cyclopropancarbamid (1 eq.), Phenylchlorformiat (1 eq.), Pyridin (1 eq.), DIPEA (2 eq.), ACN 0°C- 55 °C (51 %); **b**) **S-94** (1 eq.), 1 M LiOH (aq.) (6 eq.), MeOH:THF:H₂O (10:10:1), RT (82 %); **c**) **S-95** (1 eq.), 40 % MeNH₂ (aq.) (5 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (3 eq.), DMF (trocken), RT (85 %).

8.4 Pharmakokinetische Rohdaten

Tabelle 35: PK-Kenndaten für Verbindung P-38*

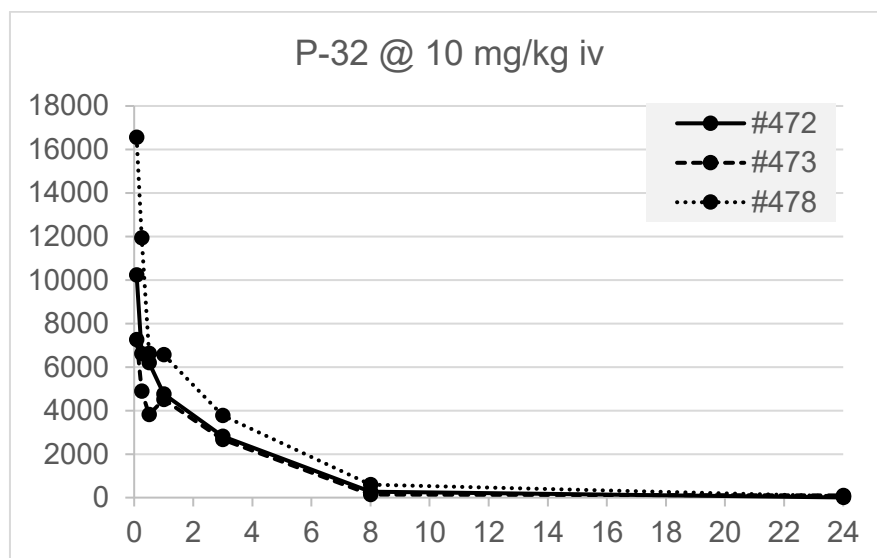
P-38 @ 10 mg/kg iv								
Zeit (h)	Maus ID	Blut konz- [ng/ml]	MW [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV%	Konz [µM]	Vielfaches von IC ₅₀	Vielfaches von IC ₉₀
0.083	#472	9425.5	10411.8	4996.0	48.0	25.3	347.6	33.6
	#473	5982.5						
	#478	15827.4						
0.25	#472	5702.3	7100.9	3821.4	53.8	17.3	237.1	22.9
	#473	4175.8						
	#478	11424.6						
0.5	#472	5058.0	4602.3	1283.2	27.9	11.2	153.7	14.8
	#473	3153.5						
	#478	5595.4						
1	#472	3334.7	4057.1	1206.7	29.7	9.9	135.5	13.1
	#473	3386.5						
	#478	5450.2						
3	#472	1575.2	1943.3	783.4	40.3	4.7	64.9	6.3
	#473	1411.6						
	#478	2842.9						
8	#472	231.1	272.9	191.0	70.0	0.7	9.1	0.9
	#473	106.2						
	#478	481.2						
24	#472	12.9	64.9	45.1	69.5	0.2	2.2	0.2
	#473	93.7						
	#478	88.2						

IC₉₀ (berechnet) = 754 nM

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE) erhoben und erstellt.

Tabelle 36: PK-Kenndaten für Verbindung P-32*

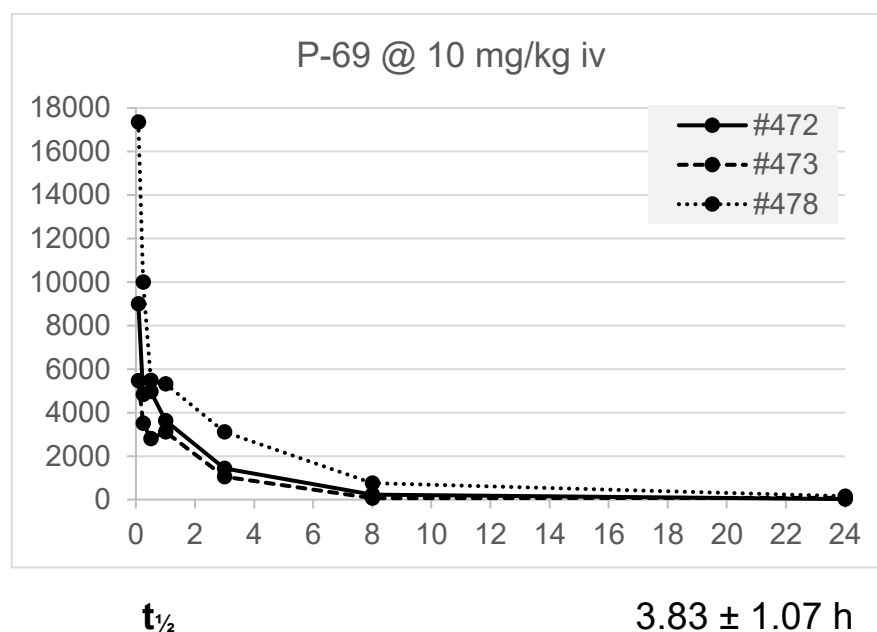
P-32 @ 10 mg/kg iv								
Zeit (h)	Maus ID	Blut-konz [ng/ml]	MW [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV%	Konz [μ M]	Vielfaches von IC ₅₀	Vielfaches von IC ₉₀
0.083	#472	10231.3	11349.9	4746.5	41.8	29.4	289.6	13.7
	#473	7262.6						
	#478	16555.8						
0.25	#472	6617.2	7817.6	3670.7	47.0	20.3	199.4	9.4
	#473	4897.5						
	#478	11938.2						
0.5	#472	6202.0	5552.7	1515.5	27.3	14.4	141.7	6.7
	#473	3820.8						
	#478	6635.3						
1	#472	4755.1	5279.6	1122.2	21.3	13.7	134.7	6.4
	#473	4515.6						
	#478	6568.0						
3	#472	2820.8	3085.6	599.2	19.4	8.0	78.7	3.7
	#473	2664.4						
	#478	3771.5						
8	#472	267.7	332.9	232.2	69.8	0.9	8.5	0.4
	#473	140.2						
	#478	590.7						
24	#472	6.4	55.1	46.8	84.9	0.1	1.4	0.1
	#473	99.7						
	#478	59.3						

IC₉₀ (berechnet) = 2151 nM

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE) erhoben und erstellt.

Tabelle 37: PK-Kenndaten für Verbindung P-69*

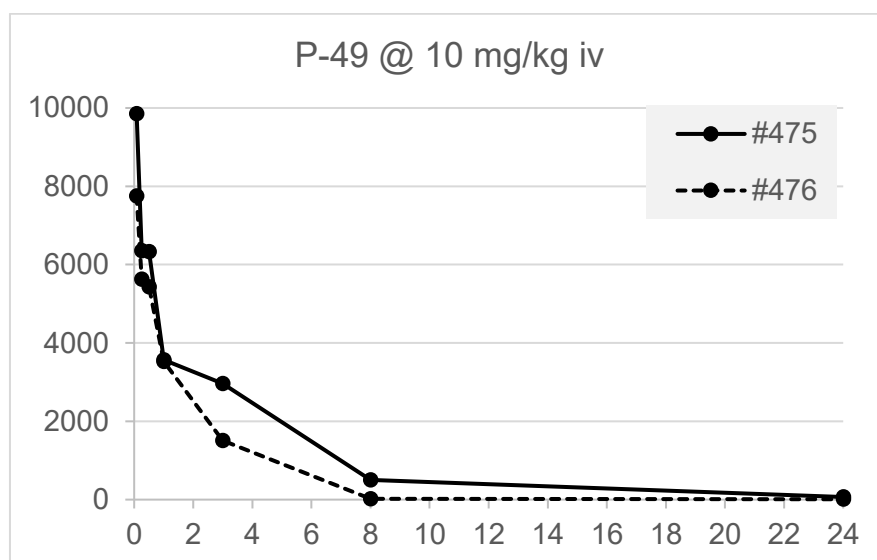
P-69 @ 10 mg/kg iv								
Zeit (h)	Maus ID	Blut-konz [ng/ml]	MW [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV%	Konz [μ M]	Vielfaches von IC ₅₀	Vielfaches von IC ₉₀
0.083	#472	8998.0	10605.8	6099.7	57.5	24.4	53.5	0.6
	#473	5471.0						
	#478	17348.4						
0.25	#472	4830.7	6112.8	3424.7	56.0	14.1	30.9	0.3
	#473	3514.2						
	#478	9993.6						
0.5	#472	4962.2	4417.9	1421.9	32.2	10.2	22.3	0.2
	#473	2804.2						
	#478	5487.3						
1	#472	3623.1	4020.9	1155.2	28.7	9.3	20.3	0.2
	#473	3117.1						
	#478	5322.4						
3	#472	1428.3	1864.2	1091.3	58.5	4.3	9.4	0.1
	#473	1058.4						
	#478	3106.1						
8	#472	220.8	347.5	361.9	104.2	0.8	1.8	0.0
	#473	65.9						
	#478	755.7						
24	#472	23.3	86.8	67.3	77.5	0.2	0.4	0.0
	#473	79.8						
	#478	157.3						

IC₉₀ (berechnet) = 44350 nM

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE) erhoben und erstellt.

Tabelle 38: PK-Kenndaten für Verbindung P-49*

P-49 @ 10 mg/kg iv								
Zeit (h)	Maus ID	Blut-konz [ng/ml]	MW [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV%	Konz [μ M]	Vielfaches von IC ₅₀	Vielfaches von IC ₉₀
0.083	#475	9851.3	8802.4	1483.3	16.9	21.4	170.3	5.5
	#476	7753.6						
	#477							
0.25	#475	6352.7	5990.1	512.8	8.6	14.6	115.9	3.7
	#476	5627.5						
	#477							
0.5	#475	6327.5	5879.1	634.1	10.8	14.3	113.8	3.7
	#476	5430.8						
	#477							
1	#475	3568.5	3549.2	27.3	0.8	8.6	68.7	2.2
	#476	3529.9						
	#477							
3	#475	2959.9	2233.2	1027.7	46.0	5.4	43.2	1.4
	#476	1506.4						
	#477							
8	#475	504.1	264.0	339.6	128.7	0.6	5.1	0.2
	#476	23.8						
	#477							
24	#475	65.6	37.2	40.1	107.7	0.1	0.7	0.0
	#476	8.9						
	#477							

IC₉₀ (berechnet) = 3890 nM $t_{1/2}$

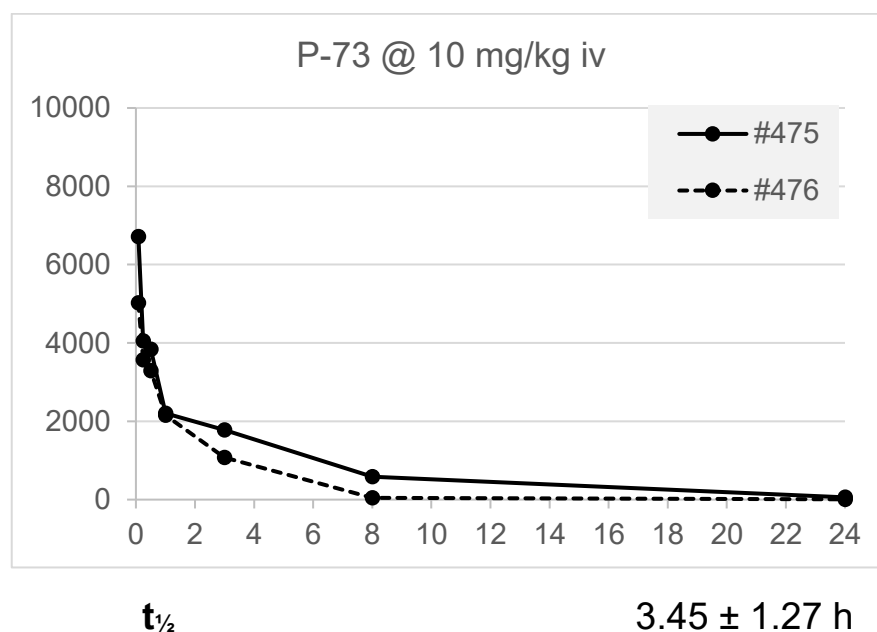
3.01 ± 0.879 h

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE) erhoben und erstellt.

Tabelle 39: PK-Kenndaten für Verbindung P-73*

P-73 @ 10 mg/kg iv								
Zeit (h)	Maus ID	Blut-konz [ng/ml]	MW [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV%	Konz [μ M]	Vielfaches von IC ₅₀	Vielfaches von IC ₉₀
0.083	#475	6718.9	5870.2	1200.2	20.4	15.2	51.8	0.4
	#476	5021.6						
	#477							
0.25	#475	4047.3	3807.9	338.6	8.9	9.9	33.6	0.2
	#476	3568.5						
	#477							
0.5	#475	3840.3	3566.4	387.3	10.9	9.3	31.5	0.2
	#476	3292.5						
	#477							
1	#475	2198.8	2177.6	29.9	1.4	5.6	19.2	0.1
	#476	2156.4						
	#477							
3	#475	1775.2	1422.9	498.1	35.0	3.7	12.6	0.1
	#476	1070.7						
	#477							
8	#475	581.2	312.6	380.0	121.6	0.8	2.8	0.0
	#476	43.9						
	#477							
24	#475	57.6	32.6	35.4	108.5	0.1	0.3	0.0
	#476	7.6						
	#477							

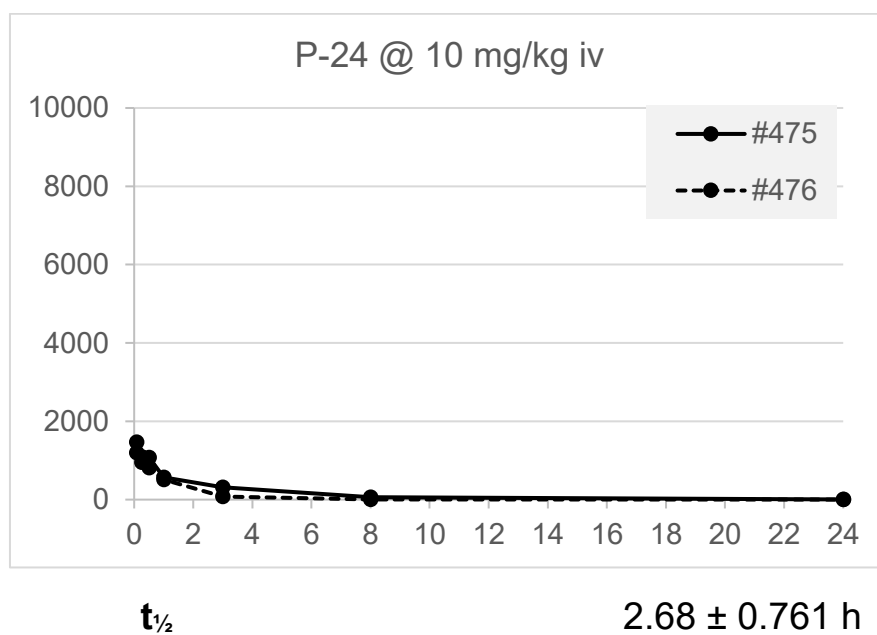
IC₉₀ (berechnet) = 43360 nM



* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE) erhoben und erstellt.

Tabelle 40: PK-Kenndaten für Verbindung P-24*

P-24 @ 10 mg/kg iv								
Zeit (h)	Maus ID	Blut-konz [ng/ml]	MW [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV%	Konz [μ M]	Vielfaches von IC ₅₀	Vielfaches von IC ₉₀
0.083	#475	1463.6	1330.0	189.0	14.2	4.0	12.1	0.7
	#476	1196.3						
	#477							
0.25	#475	1088.7	1019.7	97.6	9.6	3.1	9.3	0.5
	#476	950.7						
	#477							
0.5	#475	1073.8	943.4	184.4	19.5	2.9	8.6	0.5
	#476	813.0						
	#477							
1	#475	571.5	541.2	42.9	7.9	1.6	4.9	0.3
	#476	510.9						
	#477							
3	#475	316.4	198.6	166.6	83.9	0.6	1.8	0.1
	#476	80.8						
	#477							
8	#475	57.6	29.5	39.6	134.2	0.1	0.3	0.0
	#476	1.5						
	#477							
24	#475	3.6	2.1	2.1	100.8	0.0	0.0	0.0
	#476	0.6						
	#477							

IC₉₀ (berechnet) = 6011 nM

* Die Hier gezeigten Daten und Graphen wurden von der CRO Pharmacelcus GmbH (Saarbrücken, DE) erhoben und erstellt.

9 Literaturverzeichnis

(1) Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2025 update. *Pharmacological Research* **2025**, 216, 107723, DOI: 10.1016/j.phrs.2025.107723.

(2) Taylor, S. S.; Radzio-Andzelm, E.; Hunter, T. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *The FASEB Journal* **1995**, 9 (13), 1255-1266, DOI: 10.1096/fasebj.9.13.7557015.

(3) Karataeva, N. A.; Nevinsky, G. A. Enzymes phosphorylating lipids and polysaccharides. *Biochemistry (Moscow)* **2007**, 72 (4), 367-379, DOI: 10.1134/S0006297907040037.

(4) Dhanasekaran, N.; Reddy, E. P. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **1998**, 17 (11), 1447-1455, DOI: 10.1038/sj.onc.1202251.

(5) Köhn, M. Turn and Face the Strange: A New View on Phosphatases. *ACS Central Science* **2020**, 6 (4), 467-477, DOI: 10.1021/acscentsci.9b00909.

(6) Kumar, R.; Tao, M. Multiple forms of casein kinase from rabbit erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **1975**, 410 (1), 87-98, DOI: 10.1016/0005-2744(75)90209-0.

(7) Niefind, K.; Pütter, M.; Guerra, B.; Issinger, O.-G.; Schomburg, D. GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nature Structural Biology* **1999**, 6 (12), 1100-1103, DOI: 10.1038/70033.

(8) Burnett, G.; Kennedy, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1954**, 211 (2), 969-980, DOI: 10.1016/S0021-9258(18)71184-8.

(9) Krebs, E. G.; Fischer, E. H. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* **1956**, 20, 150-157, DOI: 10.1016/0006-3002(56)90273-6.

(10) Fischer, E. H.; Graves, D. J.; Crittenden, E. R. S.; Krebs, E. G. Structure of the Site Phosphorylated in the Phosphorylase b to a Reaction. *Journal of Biological Chemistry* **1959**, 234 (7), 1698-1704, DOI: 10.1016/S0021-9258(18)69910-7.

(11) Sutherland, E. W.; Wosilait, W. D. Inactivation and Activation of Liver Phosphorylase. *Nature* **1955**, 175 (4447), 169-170, DOI: 10.1038/175169a0.

(12) Ingebritsen, T. S.; Cohen, P. The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation. *European Journal of Biochemistry* **1983**, 132 (2), 255-261, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07357.x.

(13) Cohen, P. The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology* **2002**, *4* (5), E127-E130, DOI: 10.1038/ncb0502-e127.

(14) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912-1934, DOI: 10.1126/science.1075762.

(15) Hanks, S. K.; Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal* **1995**, *9* (8), 576-596, DOI: 10.1096/fasebj.9.8.7768349.

(16) Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *British Journal of Pharmacology* **2015**, *172* (11), 2675-2700, DOI: 10.1111/bph.13096.

(17) Boudeau, J.; Miranda-Saavedra, D.; Barton, G. J.; Alessi, D. R. Emerging roles of pseudokinases. *Trends in Cell Biology* **2006**, *16* (9), 443-452, DOI: 10.1016/j.tcb.2006.07.003.

(18) Johnson, L. N.; Barford, D. The Effects of Phosphorylation on the Structure and Function of Proteins. *Annual Review of Biophysics* **1993**, *22* (Volume 22, 1993), 199-232, DOI: 10.1146/annurev.bb.22.060193.001215.

(19) Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chemical Reviews* **2001**, *101* (8), 2271-2290, DOI: 10.1021/cr000230w.

(20) Nowell, C. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut: Zeitschrift für die Gesamte Blutforschung* **1962**, *8* (2), 65-66, DOI: 10.1007/BF01630378.

(21) Rowley, J. D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* **1973**, *243* (5405), 290-293, DOI: 10.1038/243290a0.

(22) Shtivelman, E.; Lifshitz, B.; Gale, R. P.; Canaani, E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **1985**, *315* (6020), 550-554, DOI: 10.1038/315550a0.

(23) Heisterkamp, N.; Jenster, G.; ten Hoeve, J.; Zovich, D.; Pattengale, P. K.; Groffen, J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* **1990**, *344* (6263), 251-253, DOI: 10.1038/344251a0.

(24) Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; et al. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344* (14), 1031-1037, DOI: 10.1056/NEJM200104053441401.

(25) Rowley, J. D. A Story of Swapped Ends. *Science* **2013**, *340* (6139), 1412-1413, DOI: 10.1126/science.1241318.

- (26) Taylor, S. S.; Knighton, D. R.; Zheng, J.; Ten Eyck, L. F.; Sowadski, J. M. Structural framework for the protein kinase family. *Annu Rev Cell Biol* **1992**, *8*, 429-462, DOI: 10.1146/annurev.cb.08.110192.002241. From NLM.
- (27) Kornev, A. P.; Taylor, S. S. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2010**, *1804* (3), 440-444, DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.10.017.
- (28) Knighton, D. R.; Zheng, J.; Ten Eyck, L. F.; Ashford, V. A.; Xuong, N.-H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science* **1991**, *253* (5018), 407-414, DOI: 10.1126/science.1862342.
- (29) Furet, P.; Caravatti, G.; Lydon, N.; Priestle, J. P.; Sowadski, J. M.; Trinks, U.; Traxler, P. Modelling study of protein kinase inhibitors: Binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1995**, *9* (6), 465-472, DOI: 10.1007/BF00124317.
- (30) Yang, J.; Cron, P.; Thompson, V.; Good, V. M.; Hess, D.; Hemmings, B. A.; Barford, D. Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation. *Molecular Cell* **2002**, *9* (6), 1227-1240, DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00550-6.
- (31) Taylor, S. S.; Kornev, A. P. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **2011**, *36* (2), 65-77, DOI: 10.1016/j.tibs.2010.09.006.
- (32) Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (47), 17783-17788, DOI: 10.1073/pnas.0607656103.
- (33) Nolen, B.; Taylor, S.; Ghosh, G. Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Molecular Cell* **2004**, *15* (5), 661-675, DOI: 10.1016/j.molcel.2004.08.024.
- (34) McClendon, C. L.; Kornev, A. P.; Gilson, M. K.; Taylor, S. S. Dynamic architecture of a protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (43), E4623-E4631, DOI: 10.1073/pnas.1418402111.
- (35) Zhang, F.; Strand, A.; Robbins, D.; Cobb, M. H.; Goldsmith, E. J. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **1994**, *367* (6465), 704-711, DOI: 10.1038/367704a0.
- (36) Diskin, R.; Engelberg, D.; Livnah, O. A Novel Lipid Binding Site Formed by the MAP Kinase Insert in p38 α . *Journal of Molecular Biology* **2008**, *375* (1), 70-79, DOI: 10.1016/j.jmb.2007.09.002.

(37) Zeke, A.; Misheva, M.; Reményi, A.; Bogoyevitch Marie, A. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2016**, *80* (3), 793-835, DOI: 10.1128/mubr.00043-14.

(38) Davis, R. J. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* **2000**, *103* (2), 239-252, DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00116-1.

(39) Johnson, L. N.; Noble, M. E. M.; Owen, D. J. Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* **1996**, *85* (2), 149-158, DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81092-2.

(40) Adams, J. A.; McGlone, M. L.; Gibson, R.; Taylor, S. S. Phosphorylation Modulates Catalytic Function and Regulation in the cAMP-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* **1995**, *34* (8), 2447-2454, DOI: 10.1021/bi00008a007.

(41) Kemp, B. E.; Parker, M. W.; Hu, S.; Tiganis, T.; House, C. Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity. *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19* (11), 440-444, DOI: 10.1016/0968-0004(94)90126-0.

(42) Huse, M.; Kuriyan, J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **2002**, *109* (3), 275-282, DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00741-9.

(43) Liu, Y.; Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature Chemical Biology* **2006**, *2* (7), 358-364, DOI: 10.1038/nchembio799.

(44) Modi, V.; Dunbrack, R. L. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, *116* (14), 6818-6827, DOI: 10.1073/pnas.1814279116.

(45) Nagar, B.; Bornmann, W. G.; Pellicena, P.; Schindler, T.; Veach, D. R.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J. Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571)1. *Cancer Research* **2002**, *62* (15), 4236-4243.

(46) Hubbard, S. R.; Wei, L.; Hendrickson, W. A. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **1994**, *372* (6508), 746-754, DOI: 10.1038/372746a0.

(47) Kornev, A. P.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F. A helix scaffold for the assembly of active protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (38), 14377-14382, DOI: 10.1073/pnas.0807988105.

(48) Röhm, S.; Krämer, A.; Knapp, S. Function, Structure and Topology of Protein Kinases. In *Proteinkinase Inhibitors*, Laufer, S. Ed.; Springer International Publishing, 2021; pp 1-24.

(49) Robinson, M. J.; Harkins, P. C.; Zhang, J.; Baer, R.; Haycock, J. W.; Cobb, M. H.; Goldsmith, E. J. Mutation of Position 52 in ERK2 Creates a Nonproductive Binding Mode

for Adenosine 5'-Triphosphate. *Biochemistry* **1996**, 35 (18), 5641-5646, DOI: 10.1021/bi952723e.

(50) Madhusudan; Trafny, E. A.; Xuong, N.-H.; Adams, J. A.; Eyck, L. F. T.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. cAMP-dependent protein kinase: Crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Science* **1994**, 3 (2), 176-187, DOI: 10.1002/pro.5560030203.

(51) Traxler, P. Tyrosine kinase inhibitors in cancer treatment (Part II). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **1998**, 8 (12), 1599-1625, DOI: 10.1517/13543776.8.12.1599.

(52) Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M. Through the "Gatekeeper Door": Exploiting the Active Kinase Conformation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53 (7), 2681-2694, DOI: 10.1021/jm901443h.

(53) Kyriakis, J. M.; Avruch, J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265 (28), 17355-17363, DOI: 10.1016/S0021-9258(17)44910-6.

(54) Barr, R. K.; Bogoyevitch, M. A. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2001**, 33 (11), 1047-1063, DOI: 10.1016/S1357-2725(01)00093-0.

(55) Kyriakis, J. M.; Brautigan, D. L.; Ingebritsen, T. S.; Avruch, J. pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266 (16), 10043-10046, DOI: 10.1016/S0021-9258(18)99183-0.

(56) Hibi, M.; Lin, A.; Smeal, T.; Minden, A.; Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **1993**, 7 (11), 2135-2148, DOI: 10.1101/gad.7.11.2135. From NLM.

(57) Dérjard, B.; Hibi, M.; Wu, I. H.; Barrett, T.; Su, B.; Deng, T.; Karin, M.; Davis, R. J. JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **1994**, 76 (6), 1025-1037, DOI: 10.1016/0092-8674(94)90380-8.

(58) Gupta, S.; Barrett, T.; Whitmarsh, A. J.; Cavanagh, J.; Sluss, H. K.; Dérjard, B.; Davis, R. J. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO Journal* **1996**, 15 (11), 2760-2770-2770, DOI: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00636.x.

(59) Kyriakis, J. M.; Banerjee, P.; Nikolakaki, E.; Dai, T.; Rubie, E. A.; Ahmad, M. F.; Avruch, J.; Woodgett, J. R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **1994**, 369 (6476), 156-160, DOI: 10.1038/369156a0.

(60) Kuan, C.-Y.; Yang, D. D.; Roy, D. R. S.; Davis, R. J.; Rakic, P.; Flavell, R. A. The Jnk1 and Jnk2 Protein Kinases Are Required for Regional Specific Apoptosis during Early Brain Development. *Neuron* **1999**, 22 (4), 667-676, DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80727-8.

(61) Graczyk, P. P. JNK Inhibitors As Anti-Inflammatory and Neuroprotective Agents. *Future Medicinal Chemistry* **2013**, *5* (5), 539-551, DOI: 10.4155/fmc.13.34.

(62) Ferrer, I.; Blanco, R.; Carmona, M.; Puig, B. Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *Journal of Neural Transmission* **2001**, *108* (12), 1397-1415, DOI: 10.1007/s007020100016.

(63) Resnick, L.; Fennell, M. Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discovery Today* **2004**, *9* (21), 932-939, DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03251-9.

(64) Mehan, S.; Meena, H.; Sharma, D.; Sankhla, R. JNK: A Stress-Activated Protein Kinase Therapeutic Strategies and Involvement in Alzheimer's and Various Neurodegenerative Abnormalities. *Journal of Molecular Neuroscience* **2011**, *43* (3), 376-390, DOI: 10.1007/s12031-010-9454-6.

(65) Li, Q. M.; Tep, C.; Yune, T. Y.; Zhou, X. Z.; Uchida, T.; Lu, K. P.; Yoon, S. O. Opposite Regulation of Oligodendrocyte Apoptosis by JNK3 and Pin1 after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience* **2007**, *27* (31), 8395, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2478-07.2007.

(66) Nagy, M. A.; Hilgraf, R.; Mortensen, D. S.; Elsner, J.; Norris, S.; Tikhe, J.; Yoon, W.; Paisner, D.; Delgado, M.; Erdman, P.; et al. Discovery of the c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitor CC-90001. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *64* (24), 18193-18208, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01716.

(67) Schattenberg, J. M.; Singh, R.; Wang, Y.; Lefkowitz, J. H.; Rigoli, R. M.; Scherer, P. E.; Czaja, M. J. Jnk1 but not jnk2 promotes the development of steatohepatitis in mice†. *Hepatology* **2006**, *43* (1), DOI: 10.1002/hep.20999.

(68) Guma, M.; Ronacher, L. M.; Firestein, G. S.; Karin, M.; Corr, M. JNK-1 deficiency limits macrophage-mediated antigen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **2011**, *63* (6), 1603-1612, DOI: 10.1002/art.30271.

(69) Gunawan, B. K.; Liu, Z. X.; Han, D.; Hanawa, N.; Gaarde, W. A.; Kaplowitz, N. c-Jun N-Terminal Kinase Plays a Major Role in Murine Acetaminophen Hepatotoxicity. *Gastroenterology* **2006**, *131* (1), 165-178, DOI: 10.1053/j.gastro.2006.03.045.

(70) Kodama, Y.; Taura, K.; Miura, K.; Schnabl, B.; Osawa, Y.; Brenner, D. A. Antiapoptotic Effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 Stabilization in TNF-Induced Hepatocyte Apoptosis. *Gastroenterology* **2009**, *136* (4), 1423-1434, DOI: 10.1053/j.gastro.2008.12.064.

(71) Wuestefeld, T.; Pesic, M.; Rudalska, R.; Dauch, D.; Longerich, T.; Kang, T.-W.; Yevsa, T.; Heinzmann, F.; Hoenicke, L.; Hohmeyer, A.; et al. A Direct In Vivo RNAi Screen Identifies MKK4 as a Key Regulator of Liver Regeneration. *Cell* **2013**, *153* (2), 389-401, DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.026.

- (72) Overturf, K.; Al-Dhalimy, M.; Tanguay, R.; Brantly, M.; Ou, C.-N.; Finegold, M.; Grompe, M. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nature Genetics* **1996**, *12* (3), 266-273, DOI: 10.1038/ng0396-266.
- (73) Das, A. M. Clinical utility of nitisinone for the treatment of hereditary tyrosinemia type-1 (HT-1). *The Application of Clinical Genetics* **2017**, *10* (null), 43-48, DOI: 10.2147/TACG.S113310.
- (74) Zayed, H.; Izsvák, Z.; Walisko, O.; Ivics, Z. Development of Hyperactive Sleeping Beauty Transposon Vectors by Mutational Analysis. *Molecular Therapy* **2004**, *9* (2), 292-304, DOI: 10.1016/j.ymthe.2003.11.024.
- (75) Hickman, M. A.; Malone, R. W.; Lehmann-Bruinsma, K.; Sih, T. R.; Knoell, D.; Szoka, F. C.; Walzem, R.; Carlson, D. M.; Powell, J. S. Gene Expression Following Direct Injection of DNA into Liver. *Human Gene Therapy* **1994**, *5* (12), 1477-1483, DOI: 10.1089/hum.1994.5.12-1477.
- (76) Iwakawa, H.-o.; Tomari, Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular Cell* **2022**, *82* (1), 30-43, DOI: 10.1016/j.molcel.2021.11.026.
- (77) Brecht, S.; Kirchhof, R.; Chromik, A.; Willesen, M.; Nicolaus, T.; Raivich, G.; Wessig, J.; Waetzig, V.; Goetz, M.; Claussen, M.; et al. Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *European Journal of Neuroscience* **2005**, *21* (2), 363-377, DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03857.x.
- (78) Sabapathy, K.; Hochedlinger, K.; Nam, S. Y.; Bauer, A.; Karin, M.; Wagner, E. F. Distinct Roles for JNK1 and JNK2 in Regulating JNK Activity and c-Jun-Dependent Cell Proliferation. *Molecular Cell* **2004**, *15* (5), 713-725, DOI: 10.1016/j.molcel.2004.08.028.
- (79) Tafolla, E.; Wang, S.; Wong, B.; Leong, J.; Kapila, Y. L. JNK1 and JNK2 Oppositely Regulate p53 in Signaling Linked to Apoptosis Triggered by an Altered Fibronectin Matrix: JNK LINKS FAK AND p53*. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (20), 19992-19999, DOI: 10.1074/jbc.M500331200.
- (80) Hu, M. C. T.; Qiu, W. R.; Wang, Y.-P. JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene* **1997**, *15* (19), 2277-2287, DOI: 10.1038/sj.onc.1201401.
- (81) Jaeschke, A.; Karasarides, M.; Ventura, J.-J.; Ehrhardt, A.; Zhang, C.; Flavell, R. A.; Shokat, K. M.; Davis, R. J. JNK2 Is a Positive Regulator of the cJun Transcription Factor. *Molecular Cell* **2006**, *23* (6), 899-911, DOI: 10.1016/j.molcel.2006.07.028.
- (82) Maik-Rachline, G.; Wortzel, I.; Seger, R. Alternative Splicing of MAPKs in the Regulation of Signaling Specificity. *Cells* **2021**, *10* (12), DOI: 10.3390/cells10123466.
- (83) Bogoyevitch, M. A. The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *BioEssays* **2006**, *28* (9), 923-934, DOI: 10.1002/bies.20458.

(84) Gao, M.; Labuda, T.; Xia, Y.; Gallagher, E.; Fang, D.; Liu, Y.-C.; Karin, M. Jun Turnover Is Controlled Through JNK-Dependent Phosphorylation of the E3 Ligase Itch. *Science* **2004**, *306* (5694), 271-275, DOI: 10.1126/science.1099414.

(85) Mayer, C.; Bierhoff, H.; Grummt, I. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* **2005**, *19* (8), 933-941, DOI: 10.1101/gad.333205. From NLM.

(86) Chang, L.; Kamata, H.; Solinas, G.; Luo, J.-L.; Maeda, S.; Venuprasad, K.; Liu, Y.-C.; Karin, M. The E3 Ubiquitin Ligase Itch Couples JNK Activation to TNF α -induced Cell Death by Inducing c-FLIPL Turnover. *Cell* **2006**, *124* (3), 601-613, DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.021.

(87) Plotnikov, A.; Zehorai, E.; Procaccia, S.; Seger, R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2011**, *1813* (9), 1619-1633, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.012.

(88) Angel, P.; Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1991**, *1072* (2), 129-157, DOI: 10.1016/0304-419X(91)90011-9.

(89) Kukekov, N. V.; Xu, Z.; Greene, L. A. Direct Interaction of the Molecular Scaffolds POSH and JIP Is Required for Apoptotic Activation of JNKs *. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (22), 15517-15524, DOI: 10.1074/jbc.M601056200.

(90) Whitmarsh, A. J.; Cavanagh, J.; Tournier, C.; Yasuda, J.; Davis, R. J. A Mammalian Scaffold Complex That Selectively Mediates MAP Kinase Activation. *Science* **1998**, *281* (5383), 1671-1674, DOI: 10.1126/science.281.5383.1671.

(91) Xu, Z.; Kukekov, N. V.; Greene, L. A. POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *The EMBO Journal* **2003**, *22* (2), 252-261-261, DOI: 10.1093/emboj/cdg021.

(92) Matsuura, H.; Nishitoh, H.; Takeda, K.; Matsuzawa, A.; Amagasa, T.; Ito, M.; Yoshioka, K.; Ichijo, H. Phosphorylation-dependent Scaffolding Role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK Signaling Pathway: A NEW MODE OF REGULATION OF THE MAP KINASE CASCADE*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (43), 40703-40709, DOI: doi.org/10.1074/jbc.M202004200.

(93) Deng, Y.; Ren, X.; Yang, L.; Lin, Y.; Wu, X. A JNK-Dependent Pathway Is Required for TNF α -Induced Apoptosis. *Cell* **2003**, *115* (1), 61-70, DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00757-8.

(94) Atfi, A.; Djelloul, S.; Chastre, E.; Davis, R.; Gespach, C. Evidence for a Role of Rho-like GTPases and Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase (SAPK/JNK) in Transforming Growth Factor β -mediated Signaling*. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (3), 1429-1432, DOI: 10.1074/jbc.272.3.1429.

- (95) Chiariello, M.; Visconti, R.; Carlomagno, F.; Melillo, R. M.; Bucci, C.; de Franciscis, V.; Fox, G. M.; Jing, S.; Coso, O. A.; Gutkind, J. S.; et al. Signalling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNKs): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret. *Oncogene* **1998**, *16* (19), 2435-2445, DOI: 10.1038/sj.onc.1201778.
- (96) Takeuchi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Takeda, K.; Akira, S. TLR6: A novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene* **1999**, *231* (1), 59-65, DOI: 10.1016/S0378-1119(99)00098-0.
- (97) Yamanaka, H.; Moriguchi, T.; Masuyama, N.; Kusakabe, M.; Hanafusa, H.; Takada, R.; Takada, S.; Nishida, E. JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO reports* **2002**, *3* (1), 69-75-75, DOI: 10.1093/embo-reports/kvf008.
- (98) Coso, O. A.; Chiariello, M.; Kalinec, G.; Kyriakis, J. M.; Woodgett, J.; Gutkind, J. S. Transforming G Protein-coupled Receptors Potently Activate JNK (SAPK): EVIDENCE FOR A DIVERGENCE FROM THE TYROSINE KINASE SIGNALING PATHWAY (*). *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (10), 5620-5624, DOI: 10.1074/jbc.270.10.5620.
- (99) Ichijo, H.; Nishida, E.; Irie, K.; Dijke, P. t.; Saitoh, M.; Moriguchi, T.; Takagi, M.; Matsumoto, K.; Miyazono, K.; Gotoh, Y. Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways. *Science* **1997**, *275* (5296), 90-94, DOI: 10.1126/science.275.5296.90.
- (100) Merritt, S. E.; Mata, M.; Nihalani, D.; Zhu, C.; Hu, X.; Holzman, L. B. The Mixed Lineage Kinase DLK Utilizes MKK7 and Not MKK4 as Substrate *. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (15), 10195-10202, DOI: 10.1074/jbc.274.15.10195.
- (101) Sánchez, I.; Hughes, R. T.; Mayer, B. J.; Yee, K.; Woodgett, J. R.; Avruch, J.; Kyriakis, J. M.; Zon, L. I. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **1994**, *372* (6508), 794-798, DOI: 10.1038/372794a0.
- (102) Tournier, C.; Dong, C.; Turner, T. K.; Jones, S. N.; Flavell, R. A.; Davis, R. J. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* **2001**, *15* (11), 1419-1426, DOI: 10.1101/gad.888501. From NLM.
- (103) U.S. FOOD & DRUG Administration. *Novel Drug Approvals for 2025*. FDA, 2025. <https://www.fda.gov/drugs/novel-drug-approvals-fda/novel-drug-approvals-2025> (accessed 25 August 2025).
- (104) Dar, A. C.; Shokat, K. M. The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2011**, *80* (Volume 80, 2011), 769-795, DOI: 10.1146/annurev-biochem-090308-173656.

(105) Yoshida, T.; Kakizuka, A.; Imamura, H. BTeam, a Novel BRET-based Biosensor for the Accurate Quantification of ATP Concentration within Living Cells. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 39618, DOI: 10.1038/srep39618.

(106) Schneider, E. V.; Böttcher, J.; Blaesse, M.; Neumann, L.; Huber, R.; Maskos, K. The Structure of CDK8/CycC Implicates Specificity in the CDK/Cyclin Family and Reveals Interaction with a Deep Pocket Binder. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *412* (2), 251-266, DOI: 10.1016/j.jmb.2011.07.020.

(107) 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. *Nature Chemical Biology* **2009**, *5* (6), 394-396, DOI: 10.1038/nchembio.162.

(108) Cox, K. J.; Shomin, C. D.; Ghosh, I. Tinkering Outside the Kinase ATP Box: Allosteric (Type IV) and Bivalent (Type V) Inhibitors of Protein Kinases. *Future Medicinal Chemistry* **2011**, *3* (1), 29-43, DOI: 10.4155/fmc.10.272.

(109) Roskoski, R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological Research* **2016**, *103*, 26-48, DOI: 10.1016/j.phrs.2015.10.021.

(110) van Linden, O. P. J.; Kooistra, A. J.; Leurs, R.; de Esch, I. J. P.; de Graaf, C. KLIFS: A Knowledge-Based Structural Database To Navigate Kinase-Ligand Interaction Space. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (2), 249-277, DOI: 10.1021/jm400378w.

(111) Koeberle, S. C.; Romir, J.; Fischer, S.; Koeberle, A.; Schattel, V.; Albrecht, W.; Grütter, C.; Werz, O.; Rauh, D.; Stehle, T.; et al. Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nature Chemical Biology* **2012**, *8* (2), 141-143, DOI: 10.1038/nchembio.761.

(112) Ferguson, F. M.; Nabet, B.; Raghavan, S.; Liu, Y.; Leggett, A. L.; Kuljanin, M.; Kalekar, R. L.; Yang, A.; He, S.; Wang, J.; et al. Discovery of a selective inhibitor of doublecortin like kinase 1. *Nature Chemical Biology* **2020**, *16* (6), 635-643, DOI: 10.1038/s41589-020-0506-0.

(113) Brandvold, K. R.; Steffey, M. E.; Fox, C. C.; Soellner, M. B. Development of a Highly Selective c-Src Kinase Inhibitor. *ACS Chemical Biology* **2012**, *7* (8), 1393-1398, DOI: 10.1021/cb300172e.

(114) Hanke, T.; Wong, J. F.; Berger, B.-T.; Abdi, I.; Berger, L. M.; Tesch, R.; Tredup, C.; Bullock, A. N.; Müller, S.; Knapp, S. A Highly Selective Chemical Probe for Activin Receptor-like Kinases ALK4 and ALK5. *ACS Chemical Biology* **2020**, *15* (4), 862-870, DOI: 10.1021/acscchembio.0c00076.

(115) Shuai, W.; Yang, P.; Xiao, H.; Zhu, Y.; Bu, F.; Wang, A.; Sun, Q.; Wang, G.; Ouyang, L. Selective Covalent Inhibiting JNK3 by Small Molecules for Parkinson's Diseases. *Angewandte Chemie International Edition* **2024**, *63* (50), e202411037, DOI: 10.1002/anie.202411037.

- (116) Wydra, V. R.; Plank, N.; Zwirner, S.; Selig, R.; Rasch, A.; Masberg, B.; Lämmerhofer, M.; Zender, L.; Koch, P.; Albrecht, W.; et al. A "Ligand First" Approach toward Selective, Covalent JNK2/3 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2025**, *68* (11), 12004-12028, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5c00884.
- (117) Chaikuad, A.; Koch, P.; Laufer, S. A.; Knapp, S. The Cysteinome of Protein Kinases as a Target in Drug Development. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (16), 4372-4385, DOI: 10.1002/anie.201707875.
- (118) Zhang, T.; Inesta-Vaquera, F.; Niepel, M.; Zhang, J.; Ficarro, Scott B.; Machleidt, T.; Xie, T.; Marto, Jarrod A.; Kim, N.; Sim, T.; et al. Discovery of Potent and Selective Covalent Inhibitors of JNK. *Chemistry & Biology* **2012**, *19* (1), 140-154, DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.11.010.
- (119) The UniProt, C. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research* **2025**, *53* (D1), D609-D617, DOI: 10.1093/nar/gkae1010.
- (120) Park, H.; Iqbal, S.; Hernandez, P.; Mora, R.; Zheng, K.; Feng, Y.; LoGrasso, P. Structural Basis and Biological Consequences for JNK2/3 Isoform Selective Aminopyrazoles. *Scientific Reports* **2015**, *5* (1), 8047, DOI: 10.1038/srep08047.
- (121) Lu, W.; Liu, Y.; Gao, Y.; Geng, Q.; Gurbani, D.; Li, L.; Ficarro, S. B.; Meyer, C. J.; Sinha, D.; You, I.; et al. Development of a Covalent Inhibitor of c-Jun N-Terminal Protein Kinase (JNK) 2/3 with Selectivity over JNK1. *Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, *66* (5), 3356-3371, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c01834.
- (122) Wang, G.; Seidler, N. J.; Röhm, S.; Pan, Y.; Liang, X. J.; Haarer, L.; Berger, B.-T.; Sivashanmugam, S. A.; Wydra, V. R.; Forster, M.; et al. Probing the Protein Kinases' Cysteinome by Covalent Fragments. *Angewandte Chemie International Edition* **2025**, *64* (8), e202419736, DOI: 10.1002/anie.202419736.
- (123) Kanev, G. K.; de Graaf, C.; Westerman, B. A.; de Esch, I. J. P.; Kooistra, A. J. KLIFS: an overhaul after the first 5 years of supporting kinase research. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49* (D1), D562-D569, DOI: 10.1093/nar/gkaa895.
- (124) Plantevin Krenitsky, V.; Nadolny, L.; Delgado, M.; Ayala, L.; Clareen, S. S.; Hilgraf, R.; Albers, R.; Hegde, S.; D'Sidocky, N.; Sapienza, J.; et al. Discovery of CC-930, an orally active anti-fibrotic JNK inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22* (3), 1433-1438, DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.12.027.
- (125) Combette, J.-M.; Deloche, C. Novel JNK inhibitory (poly-)peptides for treatment of various diseases. WO2013091670, 2013.
- (126) Messoussi, A.; Feneyrolles, C.; Bros, A.; Deroide, A.; Daydé-Cazals, B.; Chev e, G.; Van Hijfte, N.; Fauvel, B.; Bougrin, K.; Yasri, A. Recent Progress in the Design, Study, and Development of c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitors as Anticancer Agents. *Chemistry & Biology* **2014**, *21* (11), 1433-1443, DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.09.007.

- (127) Bennett, B. L.; Sasaki, D. T.; Murray, B. W.; O'Leary, E. C.; Sakata, S. T.; Xu, W.; Leisten, J. C.; Motiwala, A.; Pierce, S.; Satoh, Y.; et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (24), 13681-13686, DOI: 10.1073/pnas.251194298.
- (128) Szczepankiewicz, B. G.; Kosogof, C.; Nelson, L. T. J.; Liu, G.; Liu, B.; Zhao, H.; Serby, M. D.; Xin, Z.; Liu, M.; Gum, R. J.; et al. Aminopyridine-Based c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitors with Cellular Activity and Minimal Cross-Kinase Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (12), 3563-3580, DOI: 10.1021/jm060199b.
- (129) Angell, R. M.; Atkinson, F. L.; Brown, M. J.; Chuang, T. T.; Christopher, J. A.; Cichy-Knight, M.; Dunn, A. K.; Hightower, K. E.; Malkakorpi, S.; Musgrave, J. R.; et al. N-(3-Cyano-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothien-2-yl)amides as potent, selective, inhibitors of JNK2 and JNK3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17* (5), 1296-1301, DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.12.003.
- (130) Dou, X.; Huang, H.; Li, Y.; Jiang, L.; Wang, Y.; Jin, H.; Jiao, N.; Zhang, L.; Zhang, L.; Liu, Z. Multistage Screening Reveals 3-Substituted Indolin-2-one Derivatives as Novel and Isoform-Selective c-Jun N-terminal Kinase 3 (JNK3) Inhibitors: Implications to Drug Discovery for Potential Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62* (14), 6645-6664, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00537.
- (131) Jun, J.; Moon, H.; Yang, S.; Lee, J.; Baek, J.; Kim, H.; Cho, H.; Hwang, K.; Ahn, S.; Kim, Y.; et al. Carbamate JNK3 Inhibitors Show Promise as Effective Treatments for Alzheimer's Disease: In Vivo Studies on Mouse Models. *Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, *66* (9), 6372-6390, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c00393.
- (132) Feng, Y.; Park, H.; Ryu, J. C.; Yoon, S. O. K. N-Aromatic-Substituted Indazole Derivatives as Brain-Penetrant and Orally Bioavailable JNK3 Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2021**, *12* (10), 1546-1552, DOI: 10.1021/acsmchemlett.1c00334.
- (133) Zheng, K.; Iqbal, S.; Hernandez, P.; Park, H.; LoGrasso, P. V.; Feng, Y. Design and Synthesis of Highly Potent and Isoform Selective JNK3 Inhibitors: SAR Studies on Aminopyrazole Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (23), 10013-10030, DOI: 10.1021/jm501256y.
- (134) Feng, Y.; Park, H.; Bauer, L.; Ryu, J. C.; Yoon, S. O. K. Thiophene-Pyrazolourea Derivatives as Potent, Orally Bioavailable, and Isoform-Selective JNK3 Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2021**, *12* (1), 24-29, DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00533.
- (135) Muth, F.; El-Gokha, A.; Ansideri, F.; Eitel, M.; Döring, E.; Sievers-Engler, A.; Lange, A.; Boeckler, F. M.; Lämmerhofer, M.; Koch, P.; et al. Tri- and Tetrasubstituted Pyridinylimidazoles as Covalent Inhibitors of c-Jun N-Terminal Kinase 3. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (2), 594-607, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01180.
- (136) Kaoud, T. S.; Mitra, S.; Lee, S.; Taliaferro, J.; Cantrell, M.; Linse, K. D.; Van Den Berg, C. L.; Dalby, K. N. Development of JNK2-Selective Peptide Inhibitors That Inhibit Breast Cancer Cell Migration. *ACS Chemical Biology* **2011**, *6* (6), 658-666, DOI: 10.1021/cb200017n.

- (137) Stebbins, J. L.; De, S. K.; Machleidt, T.; Becattini, B.; Vazquez, J.; Kuntzen, C.; Chen, L.-H.; Cellitti, J. F.; Riel-Mehan, M.; Emdadi, A.; et al. Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (43), 16809-16813, DOI: 10.1073/pnas.0805677105.
- (138) De, S. K.; Stebbins, J. L.; Chen, L.-H.; Riel-Mehan, M.; Machleidt, T.; Dahl, R.; Yuan, H.; Emdadi, A.; Barile, E.; Chen, V.; et al. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship of Substrate Competitive, Selective, and in Vivo Active Triazole and Thiadiazole Inhibitors of the c-Jun N-Terminal Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (7), 1943-1952, DOI: 10.1021/jm801503n.
- (139) Stebbins, J. L.; De, S. K.; Pavlickova, P.; Chen, V.; Machleidt, T.; Chen, L.-H.; Kuntzen, C.; Kitada, S.; Karin, M.; Pellecchia, M. Design and Characterization of a Potent and Selective Dual ATP- and Substrate-Competitive Subnanomolar Bidentate c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (18), 6206-6214, DOI: 10.1021/jm200479c.
- (140) 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.; et al. Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *The EMBO Journal* **2004**, *23* (11), 2185-2195-2195, DOI: 10.1038/sj.emboj.7600212.
- (141) Bardwell, A. J.; Frankson, E.; Bardwell, L. Selectivity of Docking Sites in MAPK Kinases *. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (19), 13165-13173, DOI: 10.1074/jbc.M900080200.
- (142) Antolin, A. A.; Sanfelice, D.; Crisp, A.; Villasclaras Fernandez, E.; Mica, I. L.; Chen, Y.; Collins, I.; Edwards, A.; Müller, S.; Al-Lazikani, B.; et al. The Chemical Probes Portal: an expert review-based public resource to empower chemical probe assessment, selection and use. *Nucleic Acids Research* **2022**, *51* (D1), D1492-D1502, DOI: 10.1093/nar/gkac909.
- (143) Hartung, I. V.; Rudolph, J.; Mader, M. M.; Mulder, M. P. C.; Workman, P. Expanding Chemical Probe Space: Quality Criteria for Covalent and Degradable Probes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, *66* (14), 9297-9312, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c00550.
- (144) Hughes, E. D. 56. Mechanism of substitution at a saturated carbon atom. Part V. Hydrolysis of tert.-butyl chloride. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1935**, (0), 255-258, DOI: 10.1039/JR9350000255.
- (145) Hanhart, W.; Ingold, C. K. CXXXIX.—The nature of the alternating effect in carbon chains. Part XVIII. Mechanism of exhaustive methylation and its relation to anomalous hydrolysis. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1927**, 997-1020, DOI: 10.1039/JR9270000997.
- (146) McLennan, D. J. The carbanion mechanism of olefin-forming elimination. *Quarterly Reviews, Chemical Society* **1967**, *21* (4), 490-506, DOI: 10.1039/QR9672100490.
- (147) Hughes, E. D.; Ingold, C. K. The mechanism and kinetics of elimination reactions. *Transactions of the Faraday Society* **1941**, *37* (0), 657-685, DOI: 10.1039/TF9413700657.

(148) Laube, T. First Crystal Structure Analysis of an Aliphatic Carbocation—Stabilization of the 3,5,7-Trimethyl-1-adamantyl Cation by C=C Hyperconjugation. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25* (4), 349-350, DOI: 10.1002/anie.198603491.

(149) Mills, L. R.; Gygi, D.; Ludwig, J. R.; Simmons, E. M.; Wisniewski, S. R.; Kim, J.; Chirik, P. J. Cobalt-Catalyzed C(sp²)–C(sp³) Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Enabled by Well-Defined Precatalysts with L,X-Type Ligands. *ACS Catalysis* **2022**, *12* (3), 1905-1918, DOI: 10.1021/acscatal.1c05586.

(150) Gewalt, K.; Schinke, E.; Böttcher, H. Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, VIII. 2-Amino-thiophene aus methylenaktiven Nitrilen, Carbonylverbindungen und Schwefel. *Chemische Berichte* **1966**, *99* (1), 94-100, DOI: 10.1002/cber.19660990116.

(151) Sharma, J.; Champagne, P. A. Mechanisms of the Gewalt Synthesis of 2-Aminothiophenes from Elemental Sulfur. *The Journal of Organic Chemistry* **2024**, *89* (13), 9609-9619, DOI: 10.1021/acs.joc.4c01189.

(152) Sabnis, R. W. THE GEWALD SYNTHESIS. *Sulfur reports* **1994**, *16* (1), 1-17, DOI: 10.1080/01961779408048964.

(153) Fersht, A. R.; Jencks, W. P. Acetylpyridinium ion intermediate in pyridine-catalyzed hydrolysis and acyl transfer reactions of acetic anhydride. Observation, kinetics, structure-reactivity correlations, and effects of concentrated salt solutions. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92* (18), 5432-5442, DOI: 10.1021/ja00721a023.

(154) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63* (6), 2751-2788, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01541.

(155) King, L. C.; Hlavacek, R. J. The Reaction of Ketones with Iodine and Thiourea. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72* (8), 3722-3725, DOI: 10.1021/ja01164a110.

(156) Antilla, J. C.; Baskin, J. M.; Barder, T. E.; Buchwald, S. L. Copper–Diamine-Catalyzed N-Arylation of Pyrroles, Pyrazoles, Indazoles, Imidazoles, and Triazoles. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69* (17), 5578-5587, DOI: 10.1021/jo049658b.

(157) Yang, Q.; Zhao, Y.; Ma, D. Cu-Mediated Ullmann-Type Cross-Coupling and Industrial Applications in Route Design, Process Development, and Scale-up of Pharmaceutical and Agrochemical Processes. *Organic Process Research & Development* **2022**, *26* (6), 1690-1750, DOI: 10.1021/acs.oprd.2c00050.

(158) Ullmann, F.; Bielecki, J. Ueber Synthesen in der Biphenylreihe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34* (2), 2174-2185, DOI: 10.1002/cber.190103402141.

(159) Huang, A.; Wo, K.; Lee, S. Y. C.; Kneitschel, N.; Chang, J.; Zhu, K.; Mello, T.; Bancroft, L.; Norman, N. J.; Zheng, S.-L. Regioselective Synthesis, NMR, and Crystallographic

Analysis of N1-Substituted Pyrazoles. *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82* (17), 8864-8872, DOI: 10.1021/acs.joc.7b01006.

(160) Onodera, S.; Kochi, T.; Kakiuchi, F. Synthesis of N-Arylpyrazoles by Palladium-Catalyzed Coupling of Aryl Triflates with Pyrazole Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **2019**, *84* (10), 6508-6515, DOI: 10.1021/acs.joc.9b00673.

(161) Lam, P. Y. S. Chan–Lam Coupling Reaction: Copper-promoted C–Element Bond Oxidative Coupling Reaction with Boronic Acids. In *Synthetic Methods in Drug Discovery: Volume 1*, Blakemore, D. C., Doyle, P. M., Fobian, Y. M., Blakemore, D., Fobian, Y., Doyle, P. Eds.; Vol. 1; The Royal Society of Chemistry, 2016; p 0.

(162) Lasky, M. R.; Liu, E.-C.; Remy, M. S.; Sanford, M. S. Visible-Light Photocatalytic C–H Amination of Arenes Utilizing Acridine–Lewis Acid Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2024**, *146* (21), 14799-14806, DOI: 10.1021/jacs.4c02991.

(163) Mazaleyrat, J.-P.; Xie, J.; Wakselman, M. Selective hydrogenolysis of the benzyloxycarbonyl protecting group of N ϵ -lysine in cyclopeptides containing a benzylic phenyl ether function. Evidence for N ϵ -methylated lysine side products. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33* (30), 4301-4302, DOI: 10.1016/S0040-4039(00)74244-4.

(164) Filira, F.; Biondi, L.; Gobbo, M.; Rocchi, R. N-alkylation of amino acids during hydrogenolytic deprotection. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32* (50), 7463-7464, DOI: 10.1016/0040-4039(91)80135-S.

(165) Benoiton, N. L. On the side-reaction of N-alkylation of amino groups during hydrogenolytic deprotection in alcohol-containing solvents. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1993**, *41* (6), 611-611, DOI: 10.1111/j.1399-3011.1993.tb00484.x.

(166) Chen, F. M. F.; Benoiton, N. L. Reductive N,N-dimethylation of amino acid and peptide derivatives using methanol as the carbonyl source. *Canadian Journal of Biochemistry* **1978**, *56* (3), 150-152, DOI: 10.1139/o78-025.

(167) Obulesu, O.; Nanubolu, J. B.; Suresh, S. Tandem copper (Cu) catalysed N-arylation–vinylogous nitroaldol condensation of 3,5-disubstituted 4-nitropyrazoles. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, *13* (30), 8232-8240, DOI: 10.1039/C5OB01011J.

(168) Wentsch, H. K.; Walter, N. M.; Bührmann, M.; Mayer-Wrangowski, S.; Rauh, D.; Zaman, G. J. R.; Willemsen-Seegers, N.; Buijsman, R. C.; Henning, M.; Dauch, D.; et al. Optimized Target Residence Time: Type I Inhibitors for p38 α MAP Kinase with Improved Binding Kinetics through Direct Interaction with the R-Spine. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (19), 5363-5367, DOI: 10.1002/anie.201701185.

(169) Walter, N. M.; Wentsch, H. K.; Bührmann, M.; Bauer, S. M.; Döring, E.; Mayer-Wrangowski, S.; Sievers-Engler, A.; Willemsen-Seegers, N.; Zaman, G.; Buijsman, R.; et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Type I1/2 p38 α MAP Kinase Inhibitors with Excellent Selectivity, High Potency, and Prolonged Target Residence Time by Interfering with the R-Spine. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (19), 8027-8054, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00745.

(170) Kitteringham, J.; Shipton, M. R.; Voyle, M. A Simple Method for the Synthesis of Unsymmetrical Ureas. *Synthetic Communications* **2000**, *30* (11), 1937-1943, DOI: 10.1080/00397910008087243.

(171) Ramteke, P.; Gill, M. s. Synthesis of N,N'-diaryl unsymmetrical urea via diphenyl carbonate (DPC) based N-aryl-O-phenyl carbamate. *Journal of the Indian Chemical Society* **2025**, *102* (8), 101855, DOI: 10.1016/j.jics.2025.101855.

(172) Liu, Y.-F.; Wang, C.-L.; Bai, Y.-J.; Han, N.; Jiao, J.-P.; Qi, X.-L. A Facile Total Synthesis of Imatinib Base and Its Analogues. *Organic Process Research & Development* **2008**, *12* (3), 490-495, DOI: 10.1021/op700270n.

(173) Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B.; Traxler, P. Phenylamino-pyrimidine (PAP) — derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, *6* (11), 1221-1226, DOI: 10.1016/0960-894X(96)00197-7.

(174) Wang, Y.; Ma, H. Protein kinase profiling assays: a technology review. *Drug Discovery Today: Technologies* **2015**, *18*, 1-8, DOI: 10.1016/j.ddtec.2015.10.007.

(175) Biology, R. *Assay Protocol ³³PanQinase™*. Reaction Biology, 2025. <https://www.reactionbiology.com/assay-protocol-panqinase/> (accessed 25 July 2025).

(176) Smyth, L. A.; Collins, I. Measuring and interpreting the selectivity of protein kinase inhibitors. *J Chem Biol* **2009**, *2* (3), 131-151, DOI: 10.1007/s12154-009-0023-9. From NLM.

(177) Shults, M. D.; Imperiali, B. Versatile Fluorescence Probes of Protein Kinase Activity. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (47), 14248-14249, DOI: 10.1021/ja0380502.

(178) Luković, E.; González-Vera, J. A.; Imperiali, B. Recognition-Domain Focused Chemosensors: Versatile and Efficient Reporters of Protein Kinase Activity. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (38), 12821-12827, DOI: 10.1021/ja8046188.

(179) Mader, L. K.; Borean, J. E.; Keillor, J. W. A practical guide for the assay-dependent characterisation of irreversible inhibitors. *RSC Medicinal Chemistry* **2025**, *16* (1), 63-76, DOI: 10.1039/D4MD00707G.

(180) Hoyt, K. W.; Urul, D. A.; Ogboo, B. C.; Wittlinger, F.; Laufer, S. A.; Schaefer, E. M.; May, E. W.; Heppner, D. E. Pitfalls and Considerations in Determining the Potency and Mutant Selectivity of Covalent Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, *67* (1), 2-16, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c01502.

(181) Heppner, D. E.; Ogboo, B. C.; Urul, D. A.; May, E. W.; Schaefer, E. M.; Murkin, A. S.; Gehringer, M. Demystifying Functional Parameters for Irreversible Enzyme Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, *67* (17), 14693-14696, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.4c01721.

(182) Spassov, D. S. Binding Affinity Determination in Drug Design: Insights from Lock and Key, Induced Fit, Conformational Selection, and Inhibitor Trapping Models. In *International Journal of Molecular Sciences*, 2024; Vol. 25.

(183) Fabian, M. A.; Biggs, W. H.; Treiber, D. K.; Atteridge, C. E.; Azimioara, M. D.; Benedetti, M. G.; Carter, T. A.; Ciceri, P.; Edeen, P. T.; Floyd, M.; et al. A small molecule–kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature Biotechnology* **2005**, *23* (3), 329-336, DOI: 10.1038/nbt1068.

(184) Melamed, M. D.; Green, N. M. AVIDIN. 2. PURIFICATION AND COMPOSITION. *Biochem J* **1963**, *89* (3), 591-599, DOI: 10.1042/bj0890591.

(185) Green, N. M. AVIDIN. 1. THE USE OF [14C]BIOTIN FOR KINETIC STUDIES AND FOR ASSAY. *Biochemical Journal* **1963**, *89* (3), 585-591, DOI: 10.1042/bj0890585.

(186) Galvez, A. S.; Ulloa, J. A.; Chiong, M.; Criollo, A.; Eisner, V.; Barros, L. F.; Lavandero, S. Aldose Reductase Induced by Hyperosmotic Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis: DIFFERENTIAL EFFECTS OF SORBITOL AND MANNITOL*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (40), 38484-38494, DOI: doi.org/10.1074/jbc.M211824200.

(187) Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. L.; Randall, R. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, *193* (1), 265-275, DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

(188) Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem* **1949**, *177* (2), 751-766.

(189) Krohn, R. I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Cell Biology* **2011**, *52* (1), A.3H.1-A.3H.28, DOI: 10.1002/0471143030.cba03hs52.

(190) Folin, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. biol. Chem* **1927**, *73* (2), 627-650.

(191) Peterson, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Analytical Biochemistry* **1979**, *100* (2), 201-220, DOI: 10.1016/0003-2697(79)90222-7.

(192) Keeley, A.; Ábrányi-Balogh, P.; Keserű, G. M. Design and characterization of a heterocyclic electrophilic fragment library for the discovery of cysteine-targeted covalent inhibitors. *MedChemComm* **2019**, *10* (2), 263-267, DOI: 10.1039/C8MD00327K.

(193) Schwarz, M.; Kurkunov, M.; Wittlinger, F.; Rudalska, R.; Wang, G.; Schwalm, M. P.; Rasch, A.; Wagner, B.; Laufer, S. A.; Knapp, S.; et al. Development of Highly Potent and Selective Covalent FGFR4 Inhibitors Based on SNAr Electrophiles. *Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, *67* (8), 6549-6569, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c02483.

(194) Reaction Biology. *Protocol HotSpot Kinase Assay*. Reaction Biology, 2025. <https://www.reactionbiology.com/assay-protocol-hotspot/> (accessed 2025 29 September 2025).

(195) Corbett, J. F. Pseudo first-order kinetics. *Journal of Chemical Education* **1972**, *49* (10), 663, DOI: 10.1021/ed049p663.

(196) Pflieger, K. D. G.; Eidne, K. A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature Methods* **2006**, *3* (3), 165-174, DOI: 10.1038/nmeth841.

(197) Hall, M. P.; Unch, J.; Binkowski, B. F.; Valley, M. P.; Butler, B. L.; Wood, M. G.; Otto, P.; Zimmerman, K.; Vidugiris, G.; Machleidt, T.; et al. Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chemical Biology* **2012**, *7* (11), 1848-1857, DOI: 10.1021/cb3002478.

(198) Wu, P. G.; Brand, L. Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. *Analytical Biochemistry* **1994**, *218* (1), 1-13, DOI: 10.1006/abio.1994.1134.

(199) Dacres, H.; Michie, M.; Wang, J.; Pflieger, K. D. G.; Trowell, S. C. Effect of enhanced Renilla luciferase and fluorescent protein variants on the Förster distance of Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *425* (3), 625-629, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.133.

(200) Hoffelner, B. S.; Andreev, S.; Plank, N.; Koch, P. Photocaging of Pyridinylimidazole-Based Covalent JNK3 Inhibitors Affords Spatiotemporal Control of the Binding Affinity in Live Cells. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (2), DOI: 10.3390/ph16020264.

(201) Andreev, S.; Pantsar, T.; Tesch, R.; Kahlke, N.; El-Gokha, A.; Ansideri, F.; Grätz, L.; Romasco, J.; Sita, G.; Geibel, C.; et al. Addressing a Trapped High-Energy Water: Design and Synthesis of Highly Potent Pyrimidoindole-Based Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, *65* (2), 1283-1301, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c02146.

(202) GmbH, P. *NanoBRET® Target Engagement*. Promega GmbH, 2025. <https://www.promega.de/resources/technologies/nanoluc-luciferase-enzyme/cellular-target-engagement/> (accessed 08 Oktober 2025).

(203) Vasta, J. D.; Corona, C. R.; Wilkinson, J.; Zimprich, C. A.; Hartnett, J. R.; Ingold, M. R.; Zimmerman, K.; Machleidt, T.; Kirkland, T. A.; Huwiler, K. G.; et al. Quantitative, Wide-Spectrum Kinase Profiling in Live Cells for Assessing the Effect of Cellular ATP on Target Engagement. *Cell Chemical Biology* **2018**, *25* (2), 206-214.e211, DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.10.010.

(204) Robers, M. B.; Dart, M. L.; Woodroffe, C. C.; Zimprich, C. A.; Kirkland, T. A.; Machleidt, T.; Kupcho, K. R.; Levin, S.; Hartnett, J. R.; Zimmerman, K.; et al. Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. *Nature Communications* **2015**, *6* (1), 10091, DOI: 10.1038/ncomms10091.

- (205) Copeland, R. A.; Basavapathruni, A.; Moyer, M.; Scott, M. P. Impact of enzyme concentration and residence time on apparent activity recovery in jump dilution analysis. *Analytical Biochemistry* **2011**, *416* (2), 206-210, DOI: 10.1016/j.ab.2011.05.029.
- (206) Robers, M. B.; Vasta, J. D.; Corona, C. R.; Ohana, R. F.; Hurst, R.; Jhala, M. A.; Comess, K. M.; Wood, K. V. Quantitative, Real-Time Measurements of Intracellular Target Engagement Using Energy Transfer. In *Systems Chemical Biology: Methods and Protocols*, Ziegler, S., Waldmann, H. Eds.; Springer New York, 2019; pp 45-71.
- (207) Kamenecka, T.; Habel, J.; Duckett, D.; Chen, W.; Ling, Y. Y.; Frackowiak, B.; Jiang, R.; Shin, Y.; Song, X.; LoGrasso, P. Structure-Activity Relationships and X-ray Structures Describing the Selectivity of Aminopyrazole Inhibitors for c-Jun N-terminal Kinase 3 (JNK3) over p38*. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (19), 12853-12861, DOI: 10.1074/jbc.M809430200.
- (208) Kim, M.-h.; Lee, J.; Jung, K.; Kim, M.; Park, Y.-J.; Ahn, H.; Kwon, Y. H.; Hah, J.-M. Syntheses and biological evaluation of 1-heteroaryl-2-aryl-1H-benzimidazole derivatives as c-Jun N-terminal kinase inhibitors with neuroprotective effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (8), 2271-2285, DOI: 10.1016/j.bmc.2013.02.021.
- (209) Iqbal, S.; Sebhaoui, J.; Ashraf, S.; Ozcan, M.; Kim, W.; Belmen, B.; Yeşilyurt, G.; Hanashalshahaby, E.; Zhang, C.; Uhlen, M.; et al. Design and synthesis of novel JNK inhibitors targeting liver pyruvate kinase for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Bioorganic Chemistry* **2024**, *147*, 107425, DOI: 10.1016/j.bioorg.2024.107425.
- (210) Mardinoglu, A.; Uhlen, M.; Boren, J.; Sebhaoui, J.; Ashraf, S.; Iqbal, S. Preparation of benzothiophenyl and thienopyridinyl compounds for the treatment of fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. WO2024170693, 2024.
- (211) Blanch, J. H. Determination of the Hammett substituent constants for the 2-, 3-, and 4-pyridyl and -pyridinium groups. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1966**, (0), 937-939, DOI: 10.1039/J29660000937.
- (212) Cheng, B.; Wang, W.; Liu, T.; Cao, H.; Pan, W.; Xiao, Y.; Liu, S.; Chen, J. Bifunctional small molecules targeting PD-L1/CXCL12 as dual immunotherapy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2023**, *8* (1), 91, DOI: 10.1038/s41392-022-01292-5.
- (213) Teng, M.; Gray, N. S. The rise of degrader drugs. *Cell Chemical Biology* **2023**, *30* (8), 864-878, DOI: 10.1016/j.chembiol.2023.06.020.
- (214) AssayQuant Technologies, I. *KinSight™ Time-Dependent Inhibition Services*. AssayQuant, 2024. <https://www.assayquant.com/kinsight-services/time-dependent-inhibition/> (accessed 15 Oktober 2025).
- (215) Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22* (23), 3099-3108, DOI: 10.1016/0006-2952(73)90196-2.

(216) Schwartz, P. A.; Kuzmic, P.; Solowiej, J.; Bergqvist, S.; Bolanos, B.; Almaden, C.; Nagata, A.; Ryan, K.; Feng, J.; Dalvie, D.; et al. Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (1), 173-178, DOI: 10.1073/pnas.1313733111.

(217) Hillebrand, L.; Liang, X. J.; Serafim, R. A. M.; Gehringer, M. Emerging and Re-emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: An Update. *Journal of Medicinal Chemistry* **2024**, *67* (10), 7668-7758, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c01825.

(218) Stepan, A. F.; Mascitti, V.; Beaumont, K.; Kalgutkar, A. S. Metabolism-guided drug design. *MedChemComm* **2013**, *4* (4), 631-652, DOI: 10.1039/C2MD20317K.

(219) Zhang, L.; Holmes, I. P.; Hochgräfe, F.; Walker, S. R.; Ali, N. A.; Humphrey, E. S.; Wu, J.; de Silva, M.; Kersten, W. J. A.; Connor, T.; et al. Characterization of the Novel Broad-Spectrum Kinase Inhibitor CTx-0294885 As an Affinity Reagent for Mass Spectrometry-Based Kinome Profiling. *Journal of Proteome Research* **2013**, *12* (7), 3104-3116, DOI: 10.1021/pr3008495.

(220) Mersal, K. I.; Abdel-Maksoud, M. S.; Ali, E. M. H.; Ammar, U. M.; Zarai, S.-O.; Haque, M. M.; Das, T.; Hassan, N. F.; Kim, E. E.; Lee, J.-S.; et al. Evaluation of novel pyrazol-4-yl pyridine derivatives possessing arylsulfonamide tethers as c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitors in leukemia cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, *261*, 115779, DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115779.

(221) Loughnan, P. M.; Sitar, D. S.; Ogilvie, R. I.; Neims, A. H. The two-compartment open-system kinetic model: A review of its clinical implications and applications. *The Journal of Pediatrics* **1976**, *88* (5), 869-873, DOI: 10.1016/S0022-3476(76)81135-3.

(222) chemicalprobes.org. *JNK2_3 COV56d: Covalent Inhibitor of MAPK9, MAPK10*. chemicalprobes.org, 2025. https://www.chemicalprobes.org/jnk2_3-cov56d?q=JNK (accessed 15 September 2025).

(223) Sander, P.; Schwalm, M. P.; Krämer, A.; Elson, L.; Rasch, A.; Masberg, B.; Selig, R.; Sievers-Engler, A.; Lämmerhofer, M.; Müller, S.; et al. Design, Synthesis, and Biochemical Evaluation of Novel MLK3 Inhibitors: A Target Hopping Example. *Journal of Medicinal Chemistry* **2025**, *68* (1), 674-694, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.4c02552.