

**Design, Synthese und biologische Evaluation strukturell  
neuer K-Ras-Inhibitoren sowie *in silico*-basierte Studien  
zum Wirkmechanismus**



**BERGISCHE  
UNIVERSITÄT  
WUPPERTAL**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.

angefertigt

an der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von Sascha Koller

2026



Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck  
Arbeitsgruppe für organische Chemie  
Bergische Universität Wuppertal

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Fabian Mohr  
Arbeitsgruppe für anorganische Chemie  
Bergische Universität Wuppertal



## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Design, Synthese und biologische Evaluation strukturell neuer K-Ras-**

**Inhibitoren sowie *in silico*-basierte Studien zum Wirkmechanismus**

selbstständig am Institut für Organische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck ohne unzulässige fremde Hilfe und unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis verfasst habe. Alle direkt oder indirekt aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind entsprechend gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde außerdem an keiner anderen Stelle eingereicht.

Halstenbek, den

---

Sascha Koller



*“Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better.”*

Samuel Beckett

In Liebe und Dankbarkeit meiner Mutter gewidmet.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die mich auf meinem Weg begleitet, unterstützt und damit einen wertvollen Beitrag zu dieser Dissertation geleistet haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck für die Betreuung dieser Arbeit. Die Gespräche und wissenschaftlichen Diskussionen waren stets konstruktiv und haben maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Zudem bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und dafür, dass ich mich in der zweiten Promotionshälfte in einem neuen Themengebiet frei entfalten durfte.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Fabian Mohr für die Übernahme des Zweitgutachtens und Frau Prof. Dr. Julia Bornhorst sowie Herrn Prof. Dr. Robert Göstl als Mitglieder der Prüfungskommission.

Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. Markus Roggel für die großartige Unterstützung nicht nur bei organisatorischen Dingen, sondern vor allem auch bei fachlichen Fragen. Mein Dank gilt zudem Andreas, Ilka und Boris für das Messen sämtlicher Spektren sowie meinen studentischen Unterstützern Mike, Gero, Luise, Victor und Robert.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei den Menschen bedanken, die mir die Laborzeit deutlich einfacher und schöner gestaltet haben. Aus anfänglichen Kollegen wurden im Laufe der Zeit Freunde. Vielen Dank an meinen Projekt-Partner Ben, meinen Bench-Partner Gerrit, meine Fensterbank-Partnerin Manuela, meinen Diskussions-Partner Oliver und unseren Dungeon Master Daniel für die unzähligen unvergesslichen und witzigen Stunden, die wir innerhalb und außerhalb des Labors verbracht haben. Daneben danke ich Timo und Basti, ohne die ich wahrscheinlich viele meiner Reaktionen wegen fehlender Chemikalien nicht hätte durchführen können.

Dazu möchte ich mich bei meinen neuen Kollegen Alex, Giam, Manu, Joelle, Katrin, Sascha und Dat bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter Angela, meiner besseren Hälfte Anna, meinen Großeltern Hildegard & Günther, meiner Tante und meinem Onkel Petra & Heiko und meiner Cousine Lisa. Es gibt keine Worte, die eurem Rückhalt und der bedingungslosen Unterstützung gerecht werden. Ohne euch wäre nichts von dem, was ich erreicht habe, möglich gewesen.

Danke!



## Inhaltsverzeichnis

Projekt A: Synthese und biologische Evaluation neuer Pyridazinon-basierter Inhibitoren sowie Aufklärung des Wirkmechanismus über <i>in silico</i> -Methoden .....	1
1. Theoretischer Hintergrund .....	1
1.1 Einleitung .....	1
1.2 Strukturelle Eigenschaften und Funktion der Ras-Proteine.....	3
1.3 Onkogenes Ras im Zusammenhang mit den Signaltransduktionskaskaden.....	7
1.4 Ras-Inhibierung über <i>Small Molecules</i> .....	12
1.4.1 Kovalente und indirekte K-Ras-Inhibitoren .....	12
1.4.2 Direkte, nicht kovalente K-Ras-Inhibitoren .....	17
2. Motivation und Zielsetzung .....	22
3. Ergebnisse und Diskussion .....	23
3.1 Pyridazinone .....	23
3.1.1 Synthesen .....	26
3.1.2 Biologische Daten.....	36
3.1.3 <i>In silico</i> -Analyse des Bindungsmodus .....	44
3.2 Rabbits-Hybride .....	63
3.2.1 Synthesen .....	67
3.2.2 Synthese einer Biphenylbibliothek.....	70
3.2.3 Biologische Daten und Molecular Modeling.....	76
3.3 Pyrazolpyridine und Isoxazolpyridine .....	87
3.3.1 Synthesen .....	88
3.3.2 Biologische Daten.....	91
3.4 MRTX-0902-Hybrid und Scaffold-Variation .....	93
3.4.1 Synthesen .....	94
3.4.1 Biologische Daten.....	96
4. Zusammenfassung und Ausblick .....	98

Projekt B: Design und Synthese von trisubstituierten Kohlenhydraten für die SII-Bindestelle .....	101
5. Theoretischer Hintergrund .....	101
6. Motivation und Zielsetzung .....	102
7. Ergebnisse und Diskussion .....	103
7.1 <i>In silico</i> -Arbeiten.....	108
7.1.1 Anfertigung einer <i>in silico</i> -Bibliothek und Analyse des chemischen Raums .....	108
7.1.2 Vorhersage der biologischen Aktivität und Docking Analyse .....	119
7.2 Synthesen.....	124
7.2.1 Syntheseplanung.....	124
7.2.2 Synthese der Zucker-MRTX-Hybridsubstanzen .....	126
8. Zusammenfassung und Ausblick .....	143
9. Experimenteller Teil .....	146
9.1 Allgemeiner Angaben zu Materialien und Methoden .....	146
9.2 Synthesevorschriften.....	148
9.2.1 Projekt A: Synthese (hetero-)zyklen-basierter Inhibitoren.....	148
9.2.2 Projekt B: Synthese von trisubstituierten Kohlenhydraten für die SII-Bindestelle .....	246
9.3 <i>In silico</i> -Methoden .....	268
9.4 Biologische Assays .....	269
10. Abkürzungsverzeichnis.....	274
11. Literaturverzeichnis.....	276
12. Anhang .....	298



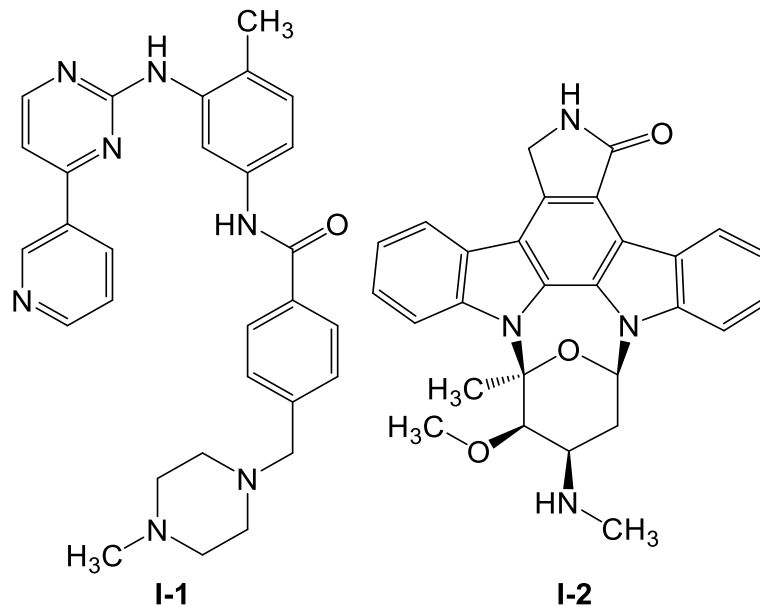
# Projekt A: Synthese und biologische Evaluation neuer Pyridazinon-basierter Inhibitoren sowie Aufklärung des Wirkmechanismus über *in silico*-Methoden

## 1. Theoretischer Hintergrund

### 1.1 Einleitung

Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen Krebserkrankungen laut der Weltgesundheitsorganisation WHO zu den zweithäufigsten Todesursachen weltweit.<sup>[1,2]</sup> Angesichts der 19.3 Millionen neu diagnostizierten Krebserkrankungen mit 10 Millionen tödlichen Verläufen (Mortalitätsrate = 48%) im Jahr 2020, besteht eine große Notwendigkeit für die Entwicklung neuer Pharmazeutika. Wird eine Erkrankung nicht frühzeitig erkannt und reicht die chirurgische Entfernung des Tumorgewebes, in Kombination mit der Strahlentherapie nicht aus, werden Chemotherapeutika zur Behandlung eingesetzt. Mit Verabreichung dieser Zytostatika, wobei Cisplatin den bekanntesten Vertreter dieser Gruppe darstellt, gehen jedoch aufgrund fehlender Selektivität viele Nebenwirkungen einher. Da die Arzneistoffe der sogenannten Erstlinientherapie bei Zellen mit hoher Proliferationsrate über verschiedene Mechanismen die Apoptose einleiten, betrifft diese auch die Zellen des Knochenmarks, der Schleimhaut sowie der Haarfollikel. Einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt bot 1979 das Postulat von WEINSTEIN<sup>[3]</sup>, wonach das Überleben von Krebszellen von einer einzigen abweichenden Proteinaktivität in der Signaltransduktion abhängt (*oncogene addiction*). Die selektive Inhibition dieses fehlgesteuerten Proteins (Onkogen) durch einen Wirkstoff führt zur Apoptose der mutierten Zellen. Gesunde Zellen bleiben davon unberührt, da diese bei der Signalübertragung auf alternative Wege zurückgreifen können (*oncogenic shock*).<sup>[4]</sup> Diese Art der Therapie wird als Präzisionsmedizin oder *targeted Therapy* betitelt. Eines der ersten und bekanntesten Beispiele dieser Therapie ist der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Imatinib (**I-1**, Glivec®, Novartis, Abb. 1). Dies markiert einen Meilenstein in der Entwicklung von Wirkstoffen gegen Kinasen, da deren selektive Adressierung jahrelang als undurchführbar galt.<sup>[5]</sup> Grund dafür waren die Selektivitätsprobleme, die bei den 518 humanen Kinasen mit hoher struktureller Ähnlichkeit auftraten. So erregte das Alkaloid Staurosporin (**I-2**) 1986 größere Aufmerksamkeit, da es neben der antimykotischen und blutdrucksenkenden Wirkung vor allem sehr potent die Proteinkinase C ( $IC_{50} = 2.7 \text{ nM}$ ) hemmt und damit stark zytotoxisch gegen Krebszellen wirkt.<sup>[6,7]</sup> Da Staurosporin (**I-2**) allerdings unselektiv alle im Genom kodierten Kinasen (Kinom) inhibiert und somit auch auf gesunde Zellen toxisch wirkt, ist es für die Anwendung

als Arzneistoff ungeeignet.<sup>[8]</sup> Diese Selektivitätsprobleme umging Imatinib (**I-1**) als erster zugelassener Kinase-Inhibitor, der seit 2001 zur Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie (CML) eingesetzt wird. Dabei inhibiert es durch Bindung an der ATP-Bindestelle die Phosphorylierung von Tyrosin.<sup>[9,10]</sup>



**Abb. 1:** Strukturformeln der Kinase-Inhibitoren Imatinib (**I-1**) und Staurosporin (**I-2**).

Zwar sorgten weiter auftretende Mutationen und Resistenzen für die Notwendigkeit der Weiterentwicklung von Kinase-Inhibitoren, diese Beispiele zeigen jedoch, dass auch als *undruggable* betitelte Proteine mit gezielter Forschung und Entwicklung selektiv adressiert werden und schließlich als pharmazeutische Targets dienen können.

Im Zusammenhang der *druggability* stellten HOPKINS und GROOM 2002 die These auf, dass die Anzahl der Bindestellen an einem Protein abhängig von der Gesamtanzahl kleiner Moleküle eines Organismus (Metabolom) ist.<sup>[11]</sup> Während ca. 19500 Gene des humanen Genoms Proteine kodieren, von denen ~90% funktionelle Proteine darstellen, werden lediglich 3000 (~15%) als *druggable* angesehen.<sup>[12,13]</sup> Ein zusätzlicher Faktor der Pharmaindustrie ist, dass potenzielle Zielmoleküle an Krankheiten direkt beteiligt sein müssen („*disease modifying genes*“), sodass lediglich 600-1500 Zielproteine für die Medikamentation übrigbleiben.<sup>[11]</sup> Wie einst die Kinasen galt auch die GTPase *Rat sarcoma virus* (Ras) jahrelang aufgrund struktureller und biochemischer Eigenschaften als schwer pharmakologisch adressierbar. Das als *undruggable* betitelte Protein Ras bietet jedoch aufgrund ihrer essenziellen Funktion in der Transduktionskaskade ein vielversprechendes Ziel für die Präzisionsmedizin. Im weiteren Verlauf wird der Aufbau sowie die Funktion von Ras umfassend erörtert.

### 1.2 Strukturelle Eigenschaften und Funktion der Ras-Proteine

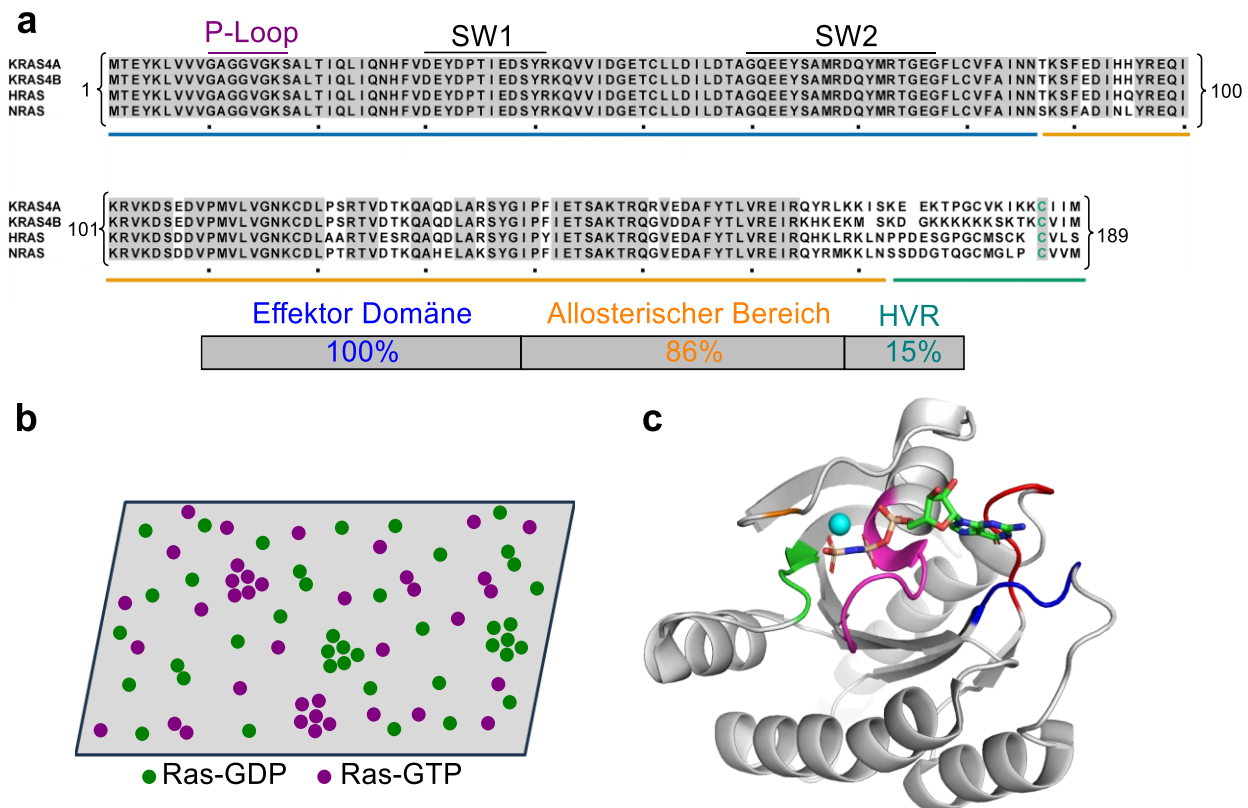
Einst in den retroviralen Sarkomen der Ratte entdeckt und nach ihnen benannt, bilden mehr als 150 Mitglieder die Ras-Superfamilie. Ihre fünf Unterfamilien Ras, Rho, Rab, Arf und Ran sind jeweils an verschiedenen Funktionen innerhalb der Zelle beteiligt. Ras reguliert durch Signaltransduktion die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung. Die humanen Gene codieren mit H-Ras (Harvey Ras)<sup>[14]</sup>, N-Ras (Neuroblastoma Ras)<sup>[15]</sup> und K-Ras (Kirsten Ras)<sup>[16]</sup> drei Proteine, die große Übereinstimmungen in ihrer Struktur und ihren biochemischen Eigenschaften zeigen. K-Ras tritt dabei in den Isoformen K-Ras4A und K-Ras4B auf, die neben der unterschiedlichen Expression zusätzlich unterschiedliche zelluläre Aufgaben erfüllen.<sup>[17]</sup> K-Ras4A reguliert die Apoptose, die im Gegensatz dazu von K-Ras4B inhibiert wird. Zusätzlich leitet K-Ras4B die Zellproliferation ein.<sup>[18]</sup> Aufgrund der signifikant erhöhten Expression von K-Ras4B im Vergleich zu K-Ras4A, stand ersteres im Mittelpunkt der wissenschaftlichen Forschung, weshalb in dieser Arbeit K-Ras als Synonym für die K-Ras4B Isoform verwendet wird.

Die als molekulare Schalter wirkenden kleinen GTPasen (21 kDa) binden in ihrer aktivierten Form GTP ( $Ras_{on}$ ), während in ihrer inaktiven Form GDP gebunden ist ( $Ras_{off}$ ). Die Bindungsdomäne der Nukleotide, auch als G-Domäne bezeichnet, zeigt eine hohe Sequenzidentität in der gesamten Ras-Superfamilie. (Abb. 2a).<sup>[19]</sup> Innerhalb der hypervariablen Region (HVR) befindet sich eine Region, die sogenannte CAAX-Box, deren Aufbau im Gegensatz zum Rest der HVR in allen Isoformen konserviert ist. Ihre Sequenz setzt sich aus C = Cystein, A = aliphatische AS, X = Serin oder Methionin zusammen und ist von entscheidender Bedeutung für die Bindung von Ras an die Plasmamembran. Dabei wird die Cystein-Einheit der CAAX-Box reversibel farnesyliert, während weitere Cystein-Einheiten der HVR palmitoyliert werden.

Die zweite, reversible posttranslationale Modifikation findet dabei bei allen Isoformen außer der K-Ras4B Variante statt.<sup>[20]</sup> Diese besitzt keine zweite Cystein-Einheit, sondern eine Abfolge von sechs Lysin-Einheiten, welche als weiteres Signal der Membraneinbettung dienen.<sup>[21,22]</sup> Dafür vermittelt die GMP-Phosphodiesterase 6 delta Untereinheit (PDE $\delta$ ) einen dynamisch, räumlich regulierten Zyklus bestehend aus Bindung und Lösung des prenylierten K-Ras4B. Dieser ist essenziell für die räumliche Ausrichtung und anschließende Einbettung in die Plasmamembran.<sup>[23]</sup> Innerhalb dieses biologischen Vorganges bindet eine hydrophobe Bindetasche des PDE $\delta$  die zuvor angebrachte Farnesylgruppe. Dadurch wird die Löslichkeit von Ras im Cytoplasma

# 1. Theoretischer Hintergrund

erhöht. An der Plasmamembran sorgt Arl2 durch eine allosterische Veränderung für die Auflösung des PDEδ/Ras-Komplexes, mit der Folge, dass Ras in der Plasmamembran verankert wird. Die GDP (grün) oder GTP (lila) beladenen Ras-Proteine verbreiten sich lateral und bilden Nanocluster aus. Diese bestehen aus bis zu sechs Ras-Proteinen (Abb. 2b). Die Nanocluster der beiden Nukleotidformen treten dabei unabhängig voneinander auf, haben einen etwa 9 nm großen Radius und existieren in einer Zeitspanne von >1 s. Etwa 56% der Ras-Proteine kommen als Monomere vor, die verbleibenden 44% liegen als Dimere oder Oligomere vor.<sup>[24]</sup>



**Abb. 2:** a) Prozentuale Sequenzübereinstimmung der vier Ras-Isoformen in der Effektor- (blau) und allosterischen- (gelb) sowie der hypervariablen Region (grün). b) Schematische Rekrutierung von Ras an die Plasmamembran in Monomeren, Dimeren und Nanoclustern. c) Darstellung der einzelnen G-Motive in der Ribbon-Form von Ras (PDB: 6GOD). [Abbildung modifiziert nach O'BRYAN *et al.*, ZHOU *et al.* und GOODY *et al.*]<sup>[24-26]</sup>

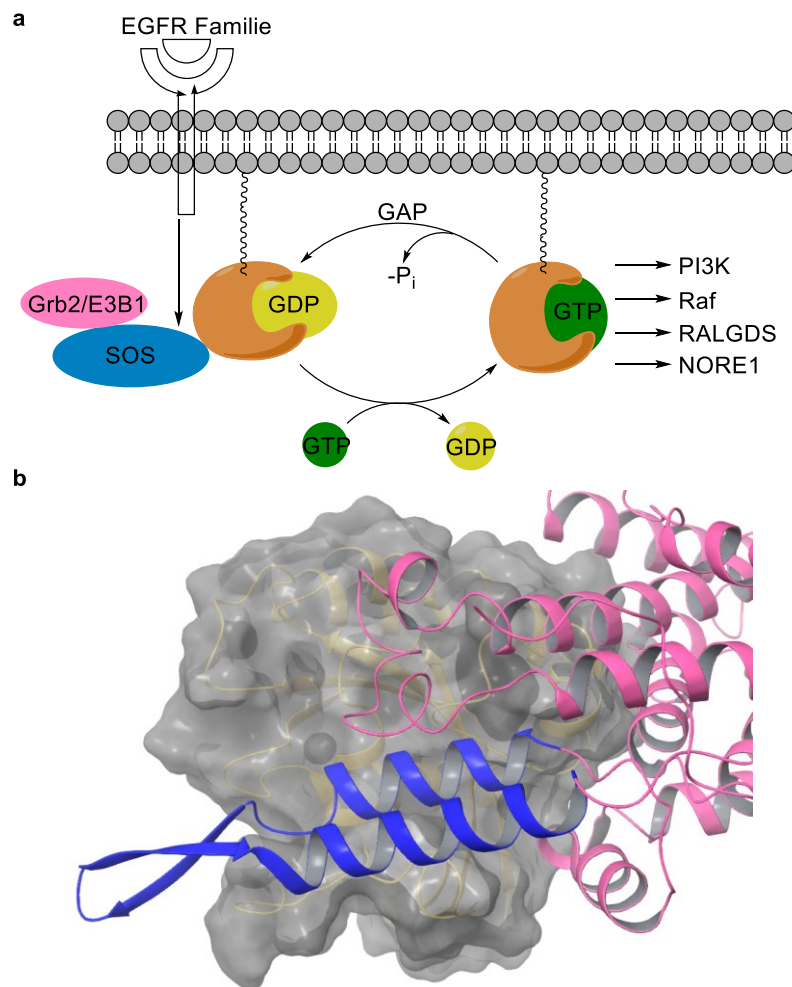
Die Allosterische- und die Effektor-Domäne besitzen insgesamt fünf Motive (G1-G5, Abb. 2c). Sie sind aus sechs  $\beta$ -Faltblättern und fünf  $\alpha$ -Helices zusammengesetzt und binden in dieser Region GTP. Diese Bindung wird durch  $Mg^{2+}$  vermittelte Interaktionen stabilisiert.<sup>[27]</sup> Koordiniert wird das Mg-Kation dabei von dem G1-Motiv (Abb. 2c pink), oder auch P-loop, das zusätzlich das  $\beta$ - sowie das  $\gamma$ -Phosphat des Nukleotids bindet. Verantwortlich für die Hydrolyse und somit die Schalterfunktion des Proteins ist eine Rotation des  $\alpha$ -Phosphats hin zu einer sichelartigen Konformation („*eclipsed conformation*“)<sup>[28]</sup>, sodass die Bindungsspaltung durch die Abstoßung der

Sauerstoffatome aller Phosphatgruppen begünstigt wird.<sup>[28,29]</sup> Darüber hinaus werden das  $Mg^{2+}$  und das Nukleotid von dem G2- und dem G3-Motiv koordiniert bzw. gebunden. Während das G2-Motiv (orange) in Form eines Threonins ein Fragment der Switch I-Region bildet, formt das G3-Motiv (grün) einen Teil der Switch II-Region von Ras. Die ausgebildeten Wechselwirkungen haben zur Folge, dass der räumliche Aufbau beider Regionen in starker Relation zu dem gebundenen Nukleotid steht. Die Autoinaktivierung von K-Ras<sup>GTP</sup> durch intrinsische Hydrolyse verläuft mit einer Geschwindigkeitsrate von  $6.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  sehr langsam.<sup>[30]</sup> Diese wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), wie P120GAP oder NF1, deutlich erhöht. Innerhalb dieses Ablaufs wird das Gln61 (Q61) durch den RAS/GAP-Komplex in der Switch II-Region verankert und koordiniert dabei das hydrolysierende Wassermolekül. Der sogenannte *Arginin-Finger* (Arg789) des GAPs wechselwirkt mit dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat und führt so schließlich zum Bindungsbruch.<sup>[31]</sup>

Bei der Inaktivierung von Ras sind vor allem der P-Loop und die Switch II-Region von immenser Bedeutung. Gly12, Gly13 und Gln61 sind innerhalb dieser beiden benannten Bereiche lokalisiert. Aus einer Punktmutation dieser Aminosäuren folgt eine Beeinträchtigung der intrinsischen sowie GAP-vermittelten Hydrolysefähigkeit, sodass Ras im aktiven Zustand verbleibt. Indem der Arginin-Finger durch die G12 und G13-Mutationen sterisch gehindert wird, ist die Hydrolyse des Triphosphats nicht möglich. Mutationen der Position 61 verhindern die Komplexierung des notwendigen Wassermoleküls.<sup>[32]</sup> Infolge der fehlenden Inaktivierung von Ras<sup>GTP</sup> kommt es zur ungehinderten Signaltransduktion und letztendlich zu unkontrolliertem Zellwachstum. Daher werden die G12, G13 und Q61-Varianten als onkogene Schlüsselfaktoren eingestuft und stellen einen zentralen Forschungsansatz der Präzisionsmedizin dar, der im Kapitel 1.3 näher erläutert wird.

Aufgrund der hohen Affinität von GDP für Ras und die Dissoziationskonstante im pikomolaren Bereich werden für die Aktivierung von Ras *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) benötigt. Der bekannteste ist das Protein *son of sevenless* (SOS), das den Nukleotidaustausch katalysiert.<sup>[33]</sup> Im Gegensatz zu anderen GEFs, die über sekundäre Botenstoffe wie cAMP oder Diacylglycerol aktiviert werden, wird SOS von epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) durch die Tyrosinphosphorylierung an die Plasmamembran gebunden und so aktiviert (Abb. 3a).<sup>[34]</sup> Vermittelt wird die Bindung von Adapterproteinen wie Grb2 oder E3B1 (pink).<sup>[35]</sup> Die Lokalisierung von Ras (orange) und SOS (blau) an der Membran führt dazu, dass die Assoziationsrate beider Proteine um das 1000-fache höher ist als im Cytoplasma. Obwohl es mit SOS1 und SOS2 zwei

Homologe gibt, die beide als GEF an der Ras-Aktivierung beteiligt sind, nimmt SOS1 eine übergeordnete Rolle gegenüber SOS2 ein. Es ist stärker an der Zellproliferation und -migration beteiligt, mit der Folge, dass bei Testversuchen ausschließlich der Einsatz von SOS1-Knockout-Zellen in Mäusen den Embryotod verursacht hat.<sup>[36]</sup> Zusätzlich besitzt lediglich SOS1 eine negative Rückkopplung innerhalb der K-Ras Transduktionswege.<sup>[37,38]</sup>



**Abb. 3:** a) SOS (blau) -vermittelter Austausch von Ras (orange) gebundenem GDP (gelb) und GAP-vermittelte Hydrolyse von GTP (grün). b) Öffnung der Switch I/II-Region von Ras (beige) durch *helical hairpin* (blau) von SOS (pink) (PDB Code: 1BKD). [Abbildung modifiziert nach MOORE *et al.* und BANDARU *et al.*]<sup>[34,39]</sup>

Das SOS-Protein ermöglicht als Katalysator die Überwindung zweier kritischer Schritte. Zum einen dringt ein spiralförmiges Element („*helical hairpin element*“, blau) der Cdc25 Domäne zwischen die Switch I- und Switch II-Region des Ras-Proteins (Abb. 3b, beige). Zum anderen stabilisiert der Ras:SOS<sup>cat</sup>-Komplex die Bindetasche, da die nukleotidfreie Ras-Form instabil ist. Das helikale SOS-Motiv wirkt wie ein Hebel, der die Switch I-Region beiseite drückt. Infolgedessen öffnet sich die aktive Seite von Ras. Aus der fehlenden Koordination der Phosphatgruppen und des Magnesium-Kations resultiert schließlich die

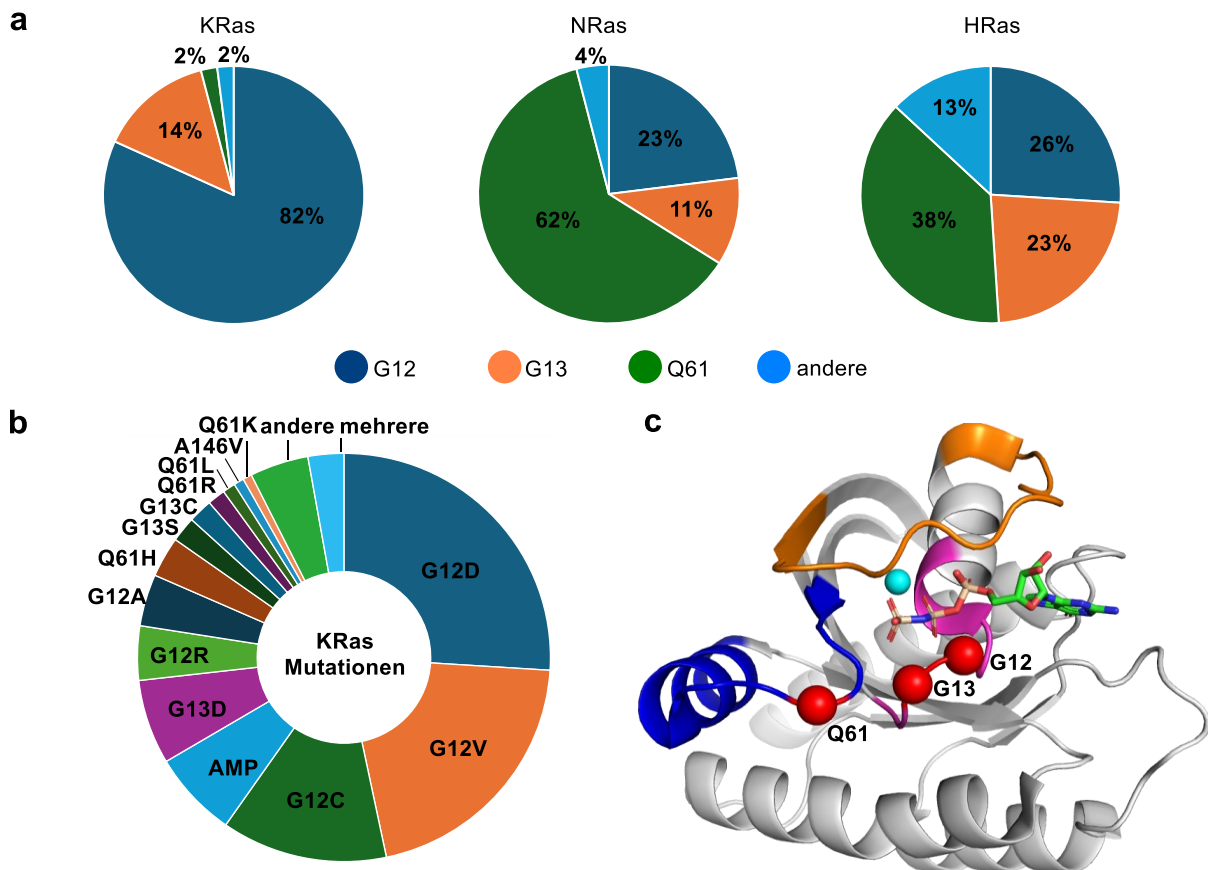
Freisetzung des GDPs.<sup>[40]</sup> Im Rahmen dieses Mechanismus nehmen die Aminosäuren Leu938 und Glu942 eine wichtige Funktion ein. So verhindert die unpolare Seitenkette des Leu938 die Bindung des Magnesium-Kations. Gleichzeitig orientiert sich die Carboxylatgruppe des Glu942 analog der  $\alpha$ -Phosphatgruppe des Nukleotids durch den Ausbau einer Wasserstoffbrücke zum Ser17. Da das im P-Loop lokalisierte Ser17 ebenfalls das Magnesium komplexiert, führt die H-Brücke zwischen Glu942 und Ser17 zu einer Destabilisierung der Phosphate und des Magnesiums. Im Anschluss wird die geöffnete Bindetasche mit einem Nukleotid beladen. Dabei bevorzugt SOS nicht die Beladung mit GTP,<sup>[41,42]</sup> sondern die Bindung des Triphosphats ist eine Folge aus der ca. zehnfach höheren Konzentration im Cytoplasma.<sup>[43]</sup>

Eine Konformationsänderung der Switch I-Region schwächt die Bindung von Ras an SOS und führt schließlich zur Teilung des Komplexes. Das stöchiometrische Verhältnis von Ras:SOS beträgt 2:1, da zusätzlich zu dem katalytischen Ras (Ras<sup>cat</sup>) ein allosterisches Ras (Ras<sup>allo</sup>) gebunden ist.<sup>[44]</sup> Dieses erhöht drastisch die Austauschgeschwindigkeit des Nukleotids von Ras<sup>cat</sup>.<sup>[45]</sup> Zusätzlich wird das Gleichgewicht des konformationsdynamischen SOS durch das Ras<sup>allo</sup> auf die Seite der aktiven Konformationen verschoben.<sup>[46]</sup> Im aktivierten Zustand binden Effektorproteine an Ras und initiieren weitere Downstreamkaskaden. Im Folgenden werden der Ral-, der *mitogen-activated protein kinase*- (MAPK) sowie der Phosphoinositid-3-kinasen- (PI3K) Weg diskutiert.

### 1.3 Onkogenes Ras im Zusammenhang mit den Signaltransduktionskaskaden

Wie im Vorfeld erwähnt, treten in den Ras-Proteinen Mutationen an den Aminosäuren Glycin und Glutamin in den Positionen 12,13 und 61 auf. Die Relevanz dieser Mutationen wird bei der Betrachtung des Gesamtanteils von Ras an Krebserkrankungen deutlich. Insgesamt weisen ca. 30% aller Tumore eine Mutation innerhalb des Ras-Gens auf. Dabei dominiert K-Ras mit 85% die mutierten Isoformen und ist vorrangig bei Krebsvarianten mit hoher Mortalität wie Darm- oder Bauchspeicheldrüsenkrebs vertreten.<sup>[47]</sup> N-Ras und H-Ras tragen 11% bzw. 4% bei. Ersteres ist vor allem in Lymphknotenkrebs und bei myeloischer Leukämie und zweiteres bei Blasen- bzw. Nierenkrebs vertreten.<sup>[39]</sup> In Abb. 4a ist die Verteilung der einzelnen onkogenen Punktmutationen aufgeführt. Bei K-Ras tritt eine Mutation des Gly12 mit einer Häufigkeit von 82% auf, gefolgt von dem Gly13 mit 14%. Im Gegensatz dazu entfällt lediglich ein Drittel aller Mutationen im N-Ras auf diese Positionen. Das zweite Drittel der N-Ras-

Mutationen repräsentiert Gln61. In der dritten Isoform verteilen sich die drei Positionen mit 26%, 23% sowie 38% gleichmäßiger, wobei zusätzlich 13% auf andere Punktmutationen zurückgehen. Mehr als die Hälfte des Gly12 der K-Ras-Isoform ist zu Asparaginsäure, Valin oder Cystein mutiert. Aufgrund dessen gab und gibt es in der Vergangenheit und Gegenwart verstärkt Forschungsansätze zur gezielten Inhibition dieser Punktmutationen (Abb. 4b).<sup>[39]</sup>

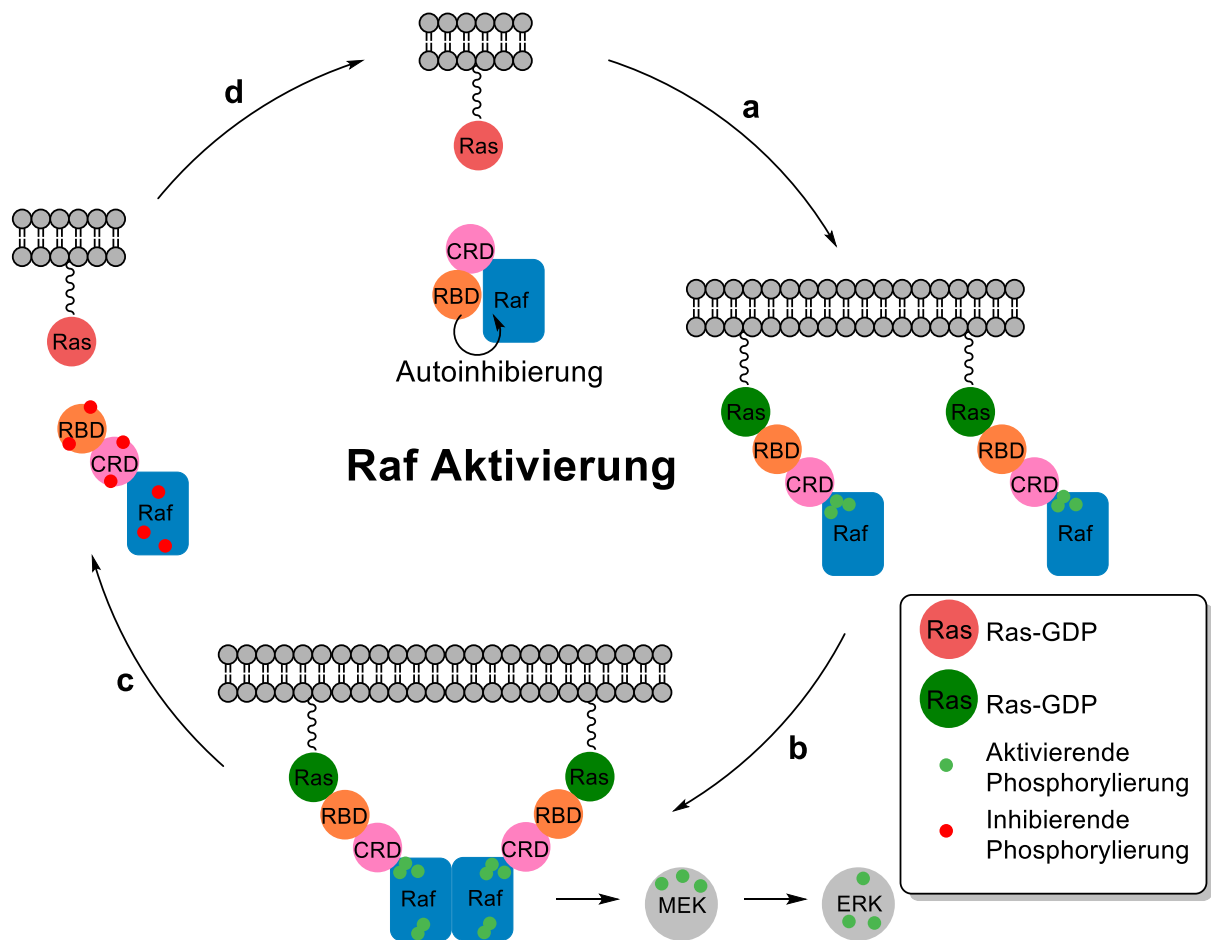


**Abb. 4:** a) Prozentuale Verteilung der einzelnen Punktmutationen in K-Ras, N-Ras und H-Ras. b) Verteilung der onkogenen Varianten von K-Ras. c) Lokalisierung der Punktmutationen Gly12, Gly13 und Gln61 (rote Kugeln) in dem K-Ras Protein (pink = p-Loop, orange = Switch I, blau = Switch II). [Abbildung modifiziert nach PRIOR *et al.*, HARDEIS *et al.* und MOORE *et al.*]<sup>[39,48,49]</sup>

Die benannten Punktmutationen bewirken sowohl eine verminderte intrinsische Hydrolyseaktivität als auch eine verminderte GAP-Affinität der Ras-Proteine und sind ursächlich für den onkogenen Charakter verantwortlich. Zusätzlich zeigt die G13D-Mutante eine signifikant erhöhte Austauschrate von GDP zu GTP ohne GEF-Beteiligung und somit eine erhöhte Signaltransduktion auf die Effektor Proteine der Downstreamkaskaden.<sup>[30]</sup>

Der Ras/Raf/MAPK- oder ERK-Weg stellt einen hochkonservierten, intrazellulären Signalweg dar, der von außerordentlicher Bedeutung in der gesamten Entwicklung von Säugetieren ist. Diese Downstreamkaskade ist sowohl an der Embryonalentwicklung als

auch an der multipotenten Selbsterneuerung der Zellen („*tissue-specific cellular homoeostasis*“)<sup>[50]</sup> im Erwachsenenalter beteiligt. Bei diesen biologischen Vorgängen sind die Kinasen ARaf/BRaf/CRaf, MEK1/2 und ERK1/2 involviert.<sup>[51]</sup> Initiiert wird die Kaskade durch Membran-gebundenes, GTP-geladenes Ras (grün), dessen Nanocluster als Signalplattformen dienen (Abb. 5).<sup>[52]</sup> Dies führt zur Rekrutierung von *Rapidly accelerated fibrosarcoma* (Raf, blau) an die Plasmamembran. Raf Proteine gehören zu den Serin/Threonin Kinasen und besitzen drei Isoformen: ARaf, BRaf sowie CRaf, auch Raf1 genannt. Innerhalb dieses Prozesses nehmen die Ras-bindende Domäne (RBD, orange) sowie die Cystein-reiche Domäne (CRD, pink) eine wesentliche Rolle ein.



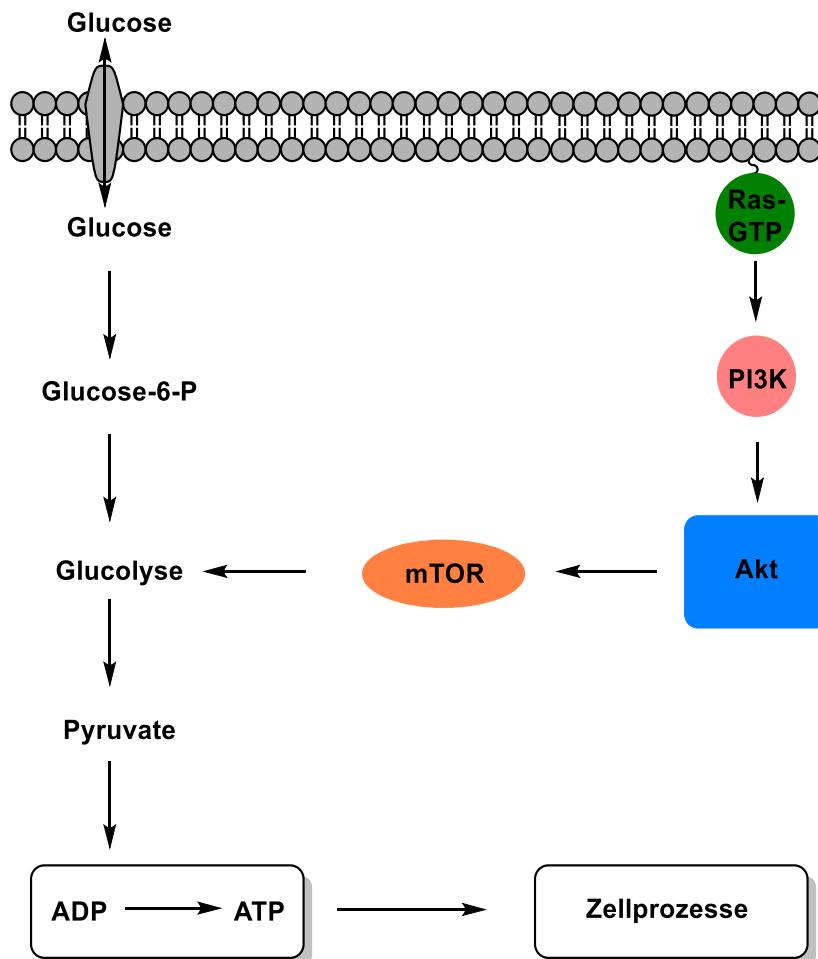
**Abb. 5:** Schematischer Kreislauf des MAPK-Signalweges. [Abbildung modifiziert nach LAVOIE *et al.*]<sup>[53]</sup>

Die aus Ubiquitin bestehende RBD bindet an den *effector loop* von Ras (Schritt a). Ihr Aufbau gleicht dem anderer Ras-bindender Domänen, wie der PI3K p110 Einheit, deren Kaskade weiter unten erläutert wird. Die CRD von Raf hingegen ist in ein Netzwerk von Wechselwirkungen mit Phospholipiden, die an der Membraneinbettung beteiligt sind, und den Farnesylgruppen der Ras-Proteine eingebunden.<sup>[54,55]</sup> Infolgedessen wird eine Dimerisierung zweier Raf-Proteine induziert (Schritt b). Unter physiologischen Bedingungen ist die Bildung eines BRaf oder CRaf Homodimers zwar möglich, jedoch

zeigen die Heterodimere eine deutlich höhere Effizienz. Die Heterodimerisierung ist daher präferiert.<sup>[56,57]</sup> Zusätzlich kann die Dimerisierung durch andere Proteine, bspw. das *kinase suppressor of Ras* (KSR1) oder 14-3-3 Proteine eingeleitet werden.<sup>[53]</sup> Die katalytische Aktivierung von Raf basiert nun auf der Phosphorylierung dreier Bereiche. Neben der negativ-geladenen N-Region, können auch das Aktivierungssegment sowie die C-terminale 14-3-3 Region adressiert werden. Zur Vereinfachung wird hier nur auf erstere eingegangen. Die N-Region der einzelnen Raf Isoformen variiert in ihrer Primärsequenz und erlaubt abweichende regulatorische Mechanismen. So unterliegt die CRaf-Isoform einer Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung, während in BRaf lediglich Serin phosphoryliert wird. Der Asp448- und Asp449-Rest stellen dabei die notwendigen negativen Ladungen der Kinaseaktivität zur Verfügung.<sup>[58]</sup> Die Raf-Phosphorylierung ist im weiteren Verlauf ausschlaggebend für die Phosphorylierung der MAPK/ERK-Kinase (MEK1). Diese gehören den Proteinkinasen an, die eine duale Substratspezifität für Serin/Threonin und Tyrosin aufweisen. Die Aktivierung wird in diesem Zusammenhang über die Phosphorylierung eines spezifischen Serin-Restes durch die C-terminale katalytische Domäne von Raf realisiert.<sup>[47]</sup> Obschon alle drei Raf-Isoformen in der Lage sind MEK1 und MEK2 zu phosphorylieren, gibt es Unterschiede in den ablaufenden Prozessen. Da diese auf die anschließende ERK-Aktivierung keinen Einfluss besitzen, suggeriert dies eine funktionelle Spezialisierung innerhalb der Raf-Familie.<sup>[59]</sup> Im letzten Schritt vermittelt MEK die Phosphorylierung der Threoninreste des im Cytoplasma befindlichen, inaktivierten ERKs an den Positionen 185 und 187 (Schritt c). Die Aktivierung bewirkt ein schnelles Eindringen von ERK in den Zellkern und reguliert darauffolgend Zell-Proliferation, -Wachstum, -Stoffwechsel, -Migration und -Differenzierung.<sup>[60]</sup> Außerdem führt eine ERK-basierte negative Rückkopplungsschleife durch eine SOS-Phosphorylierung und einer Dissoziation des SOS/Grb2-Komplexes zu einer gehinderten Ras-Aktivierung.<sup>[61]</sup>

Eine zweite sehr bedeutsame Kaskade ist der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)-Akt-Weg (Abb. 6), der zu den am häufigsten aktivierten Wegen bei menschlichen Krebserkrankungen zählt.<sup>[62]</sup> Die zentrale regulatorische Funktion beruht auf der Koordination von essenziellen metabolischen Prozessen als Reaktion auf Insulin, Wachstumsfaktoren oder Zytokinen. Dazu gehören der Glucosestoffwechsel, die Biosynthese von Makromolekülen und die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts für die Unterstützung der metabolischen Homöostase.<sup>[63]</sup> In Säugetieren ist die PI3K in zwei Klassen unterteilt, die mehrere Isoformen besitzen und spezifische Funktionalitäten

in der zellulären Signaltransduktion aufweisen. Infolge der Ras-Aktivierung und der Membranrekrutierung der Klasse I PI3Ks wird die p110 freigesetzt und bildet aus dem sekundären Botenstoff Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Pip2) das zugehörige Triphosphat (Pip3).<sup>[64]</sup>



**Abb. 6:** Schematischer Ablauf des PI3K/Akt-Signalwegs. [Abbildung modifiziert nach HENESSY *et al.*]<sup>[65]</sup>

Eine der vielen Möglichkeiten der Signalweitergabe ist die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt (blau) durch Bindung an PI3K (rosa). Die Bindung löst eine unmittelbare Phosphorylierung des Thr308 durch die Phosphoinositid-basierte Protein Kinase 1 (PDPK1) aus. Auf dieses Ereignis folgt eine zweite Phosphorylierung des Ser473 durch den Rapamycin Komplex 2 (mTOR2, orange), sodass die Akt-Aktivität weiter erhöht wird.<sup>[66]</sup> Die drei Akt-Isoformen 1 (PKB $\alpha$ ), 2 (PKB $\beta$ ) und 3 (PKB $\gamma$ ) werden alle auf diese Art aktiviert und nehmen in verschiedenen Gewebearten eine essenzielle Funktion ein. Das vollständig aktivierte Akt verlagert sich anschließend in andere zelluläre Bereiche, in denen es nachgeschaltete Substrate phosphoryliert und somit eine Vielzahl von biologischen Funktionen induziert (Abb. 6).<sup>[67]</sup>

### 1.4 Ras-Inhibierung über *Small Molecules*

#### 1.4.1 Kovalente und indirekte K-Ras-Inhibitoren

Die Ras-bezogene Wirkstoffsuche steht vor mehreren großen Herausforderungen. Einen entscheidenden Umstand stellen die hohen Zellkonzentrationen von GDP und GTP mit ~50 bzw. ~500  $\mu\text{M}$  dar.<sup>[68]</sup> Gepaart mit der Tatsache, dass beide Nukleotide die Bindetasche von Ras spezifisch mit pikomolarer Bindungsaffinität adressieren, erscheint die Suche nach einem Antagonisten aussichtslos. Dies stellt einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Identifikation von ATPase-Inhibitoren dar, da die intrazelluläre ATP-Konzentration etwa 5  $\mu\text{M}$  beträgt und das Nukleotid mit einer Affinität 10-100  $\mu\text{M}$  gebunden wird. Aufgrund dessen eignen sich ATPasen im Gegensatz zu GTPasen als Ziel orthosterischer Inhibierung.<sup>[69]</sup>

Trotz dieser Herausforderungen wurden mehrere Strategien für die Entwicklung von GDP-Analoga verfolgt. Insbesondere die Kombination mit kovalenten *Warheads* für die G12C-Variante galt als vielversprechender Ansatz. Im Gegensatz zum Wildtyp (wt) ist die selektive Adressierung der Cysteineinheit mit kovalenten Inhibitoren aufgrund der außergewöhnlichen Nukleophilie des Thiols möglich. XIONG *et al.* publizierten das Nukleotid-Analoga SML-8-73-1, das ein Chloracetamid-Motif gebunden an der  $\beta$ -Phosphatgruppe besaß (1-3, Abb. 7).<sup>[70]</sup> Zwar besaß der Inhibitor *in vitro* eine hohe biologische Aktivität ( $\text{IC}_{50} = 0.009 \mu\text{M}$ ), erwies sich allerdings zu den unmodifizierten Nukleotiden ( $K_D(\text{GDP}) = 2.5 \mu\text{M}$ ) *in vivo* als nicht konkurrenzfähig.<sup>[71,72]</sup> Dies ist auf die fehlende Magnesium-Komplexierung sowie die ausbleibenden essenziellen Interaktionen mit dem Protein zurückzuführen.

Einen Inhibitor, der diese Interaktionen beibehält, entwickelten WIEGANDT *et al.* mit dem sogenannten aGDP. Dieses Nukleotid-Analogen trägt die Acrylamid-Einheit an der 2-Amino-Position des Guanins und ist daher in der Lage die physiologische Mg-Komplexierung über die Phosphatgruppen zu erhalten. Allerdings besitzt der kovalente *Warhead* eine zu große Entfernung zum aktiven Zentrum, sodass keine kovalente Bindung des Cys12 erfolgen kann.<sup>[73]</sup>

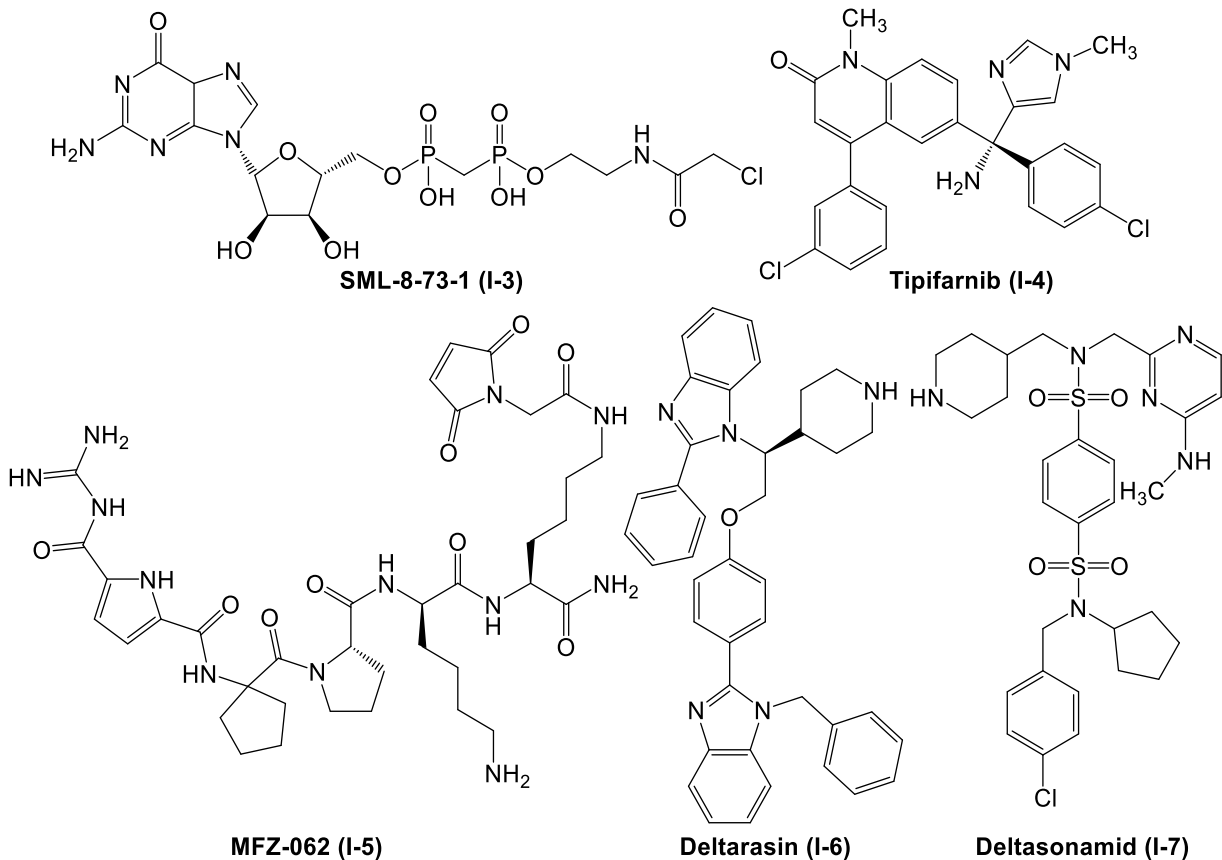
Ein weiterer bedeutender Faktor in der Adressierung von Ras ist die Oberflächenstruktur der apo-Form des Proteins. Diese besitzt außer der Nukleotid-bindenden Pocket keine weitere tiefe, hydrophobe Bindetasche, die einen geeigneten Angriffspunkt für *Small Molecules* bietet. Der letzte Punkt ist die Weiterleitung der Signale über Protein-Protein-Wechselwirkungen („*protein-protein interaction*“ PPI). Diese Wechselwirkungen werden

maßgeblich durch sogenannte ‚Hot Spots‘ vermittelt – definierte Bereiche innerhalb der Interaktionsflächen, die einen überproportionalen Beitrag zur Bindungsenergie leisten. Typischerweise erstrecken sich diese Interaktionsflächen über eine Fläche von ca. 1000-6000 Å<sup>2</sup>. Zur Inhibition dieser weitläufigen Flächen müssen *Small Molecules* die Schlüsselinteraktionen imitieren. Dies erfordert die präzise Positionierung funktioneller Gruppen innerhalb dieser energetisch relevanten Bereiche, damit eine kompetitive Bindung ausgebildet und schließlich die Signalweiterleitung effektiv unterbrochen wird.<sup>[74]</sup>

Eine Strategie, diese Problematiken zu umgehen, bestand in der Verhinderung der Membranrekrutierung über die CAAX-Box (Kapitel 1.2). Zu diesem Zweck wurden die FTase-Inhibitoren Lonafarnib und Tipifarnib (**I-4**, Abb. 1) entwickelt, welche die Prenylierung und somit die Membraneinbettung von Ras verhinderten.<sup>[75,76]</sup> Ein alternativer Prenylierungsmechanismus über die Geranylgeranyltransferase I (GGTase) ermöglichte jedoch die Modifikation über ein C20-Isoprenoid, sodass diese Möglichkeit der Inaktivierung von K-Ras umgangen wurde. Es war möglich auch für diesen Prozess Inhibitoren zu entwickeln, jedoch fanden diese aufgrund von Toxizität keine pharmazeutische Anwendbarkeit.<sup>[77,78]</sup>

Auch innerhalb der Arbeitsgruppe SCHERKENBECK wurden CAAX-Box Inhibitoren untersucht. Zunächst wurde eine Bibliothek aus peptidischen Strukturen von nicht kovalenten CAAX-Box Liganden synthetisiert. Im Gegensatz zu den oben erwähnten FTase-Inhibitoren maskieren diese Substanzen den C-Terminus und verhindern so die Farnesylierung des Ras-Proteins. Da die zentrale Triebkraft der molekularen CAAX-Erkennung im Aufbau einer Wasserstoffbrücke zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe und einer protonierten Gruppe des Liganden liegt, enthielten alle Substanzen der Bibliothek eine Guanidiniopyrrol-Einheit als Kopfgruppe.<sup>[79]</sup> Diese gehört zu den effizientesten Carboxylat-erkennenden Gruppen und wurde von SCHMUCK *et. al* entwickelt.<sup>[80-82]</sup> Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden die Strukturen mit Acrylamid-, Maleimid- und Thiol-Einheiten als reversibles kovalentes Motiv erweitert. Die Guanidiniopyrrol-Einheit als Kopfgruppe blieb dabei erhalten. Durch die kovalente Adressierung wurde die Farnesylierung der CAAX-Box mit einstellig mikromolaren Konzentrationen inhibiert. Die Einführung der kovalenten *Warheads* erhöhte die biologische Aktivität gegenüber den nicht-kovalenten Vorstufen um das Zehn- bis Zwanzigfache. Das Guanidin-Derivat MFZ-062 (**I-5**) inhibierte die FTase-Aktivität mit einem IC<sub>50</sub> = 4.7 µM (Abb. 7). Darüber hinaus wurde eine Aktivität in Zellversuchen an Lungenkrebs und Darmkrebs nachgewiesen. Die unzureichende Zellpenetration stellte

jedoch den limitierenden Faktor dar und verhinderte eine pharmakologische Anwendung.<sup>[83]</sup>



**Abb. 7:** Strukturen von SML-8-73-1 (I-3), Tipifarnib (I-4), MFZ-062 (I-5), Deltarasin (I-6) und Deltasonamid (I-7).

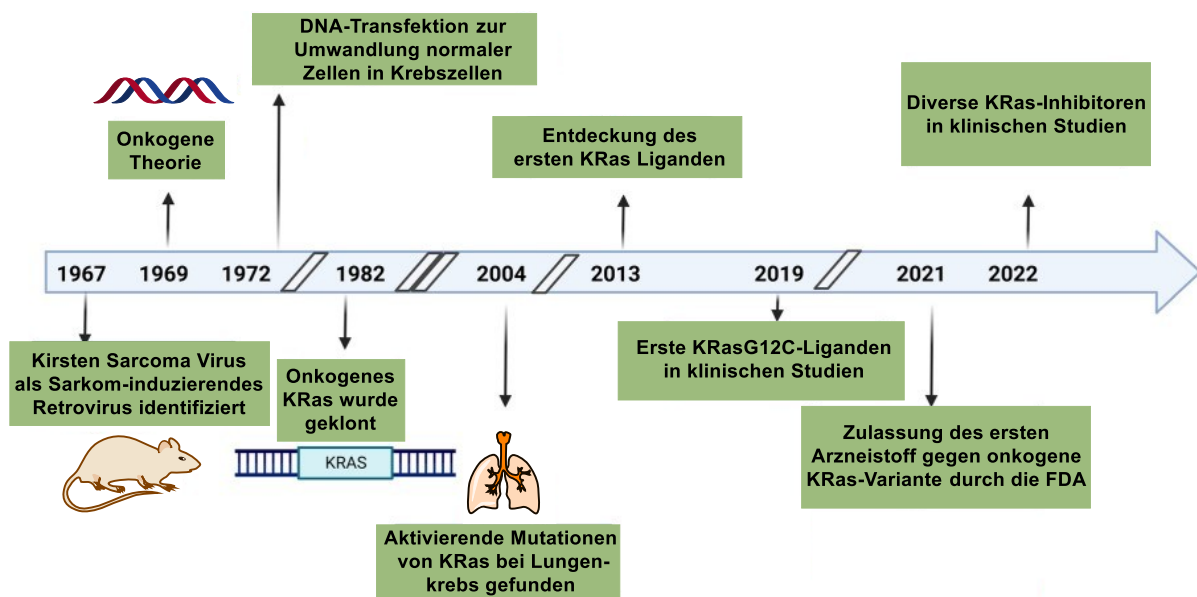
Die PDE $\delta$  erfüllt in diesem zellulären Ablauf eine fundamentale Funktion. Nach der Bindung des farnesylierten Ras und der Lösung im Cytoplasma vermittelt der Releasefaktor Arl2 die Dissoziation der beiden Proteine. Dies führt zu einer erhöhten Konzentration von Ras im perinuclearen Bereich. Infolgedessen wird Ras von dem Recycling-Endosom eingefangen und durch vesikulären Transport an der Zellmembran angereichert.<sup>[23]</sup> Wird die PDE $\delta$ /K-Ras-Wechselwirkung beeinträchtigt, folgt nicht nur eine direkte Verminderung der K-Ras-Konzentration an der Zellmembran, sondern auch im weiteren Verlauf eine geringere Phosphorylierung von ERK1 und ERK2.<sup>[84]</sup>

Diese Auswirkung nutzten WALDMANN *et al.*, um Pyridazinone, Benzimidazole sowie Sulfonamide im Rahmen einer ausgiebigen SAR („*structure-activity-relationship*“ SAR) als PDE $\delta$ -Inhibitoren zu untersuchen. Während das Benzimidazol-Derivat Deltarasin (I-6, Abb. 7) gegenüber dem PDE $\delta$ /Ras-Komplex eine inhibitorische Wirkung von 38 nM zeigte, konnte diese bei dem Deltasonamid 1 (I-7, Abb. 7) durch strukturelle Modifikationen auf 238 pM optimiert werden. Die hohe biologische Potenz resultiert aus einem Netzwerk von fünf direkten und zwei Wasser-vermittelten

## 1. Theoretischer Hintergrund

Wasserstoffbrückenbindungen, zwei aromatischen  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen sowie einer Aryl- $\pi$ -Wechselwirkung.<sup>[85]</sup> Der hohen *in vitro* Aktivität steht jedoch ein äußerst geringer Verteilungskoeffizient von lediglich 0.2-0.6% zwischen extrazellulärer Umgebung und Zytoplasma gegenüber.<sup>[85-87]</sup>

Vor diesen Hintergründen ist es wenig überraschend, dass von der ursprünglichen Entdeckung bis hin zur ersten behördlichen Zulassung eines Ras-Arzneistoffs 55 Jahre vergangen sind (Abb. 8).<sup>[88]</sup> Erst der Forschungsansatz über die selektive Adressierung der G12C Mutante brachte den entscheidenden Durchbruch.

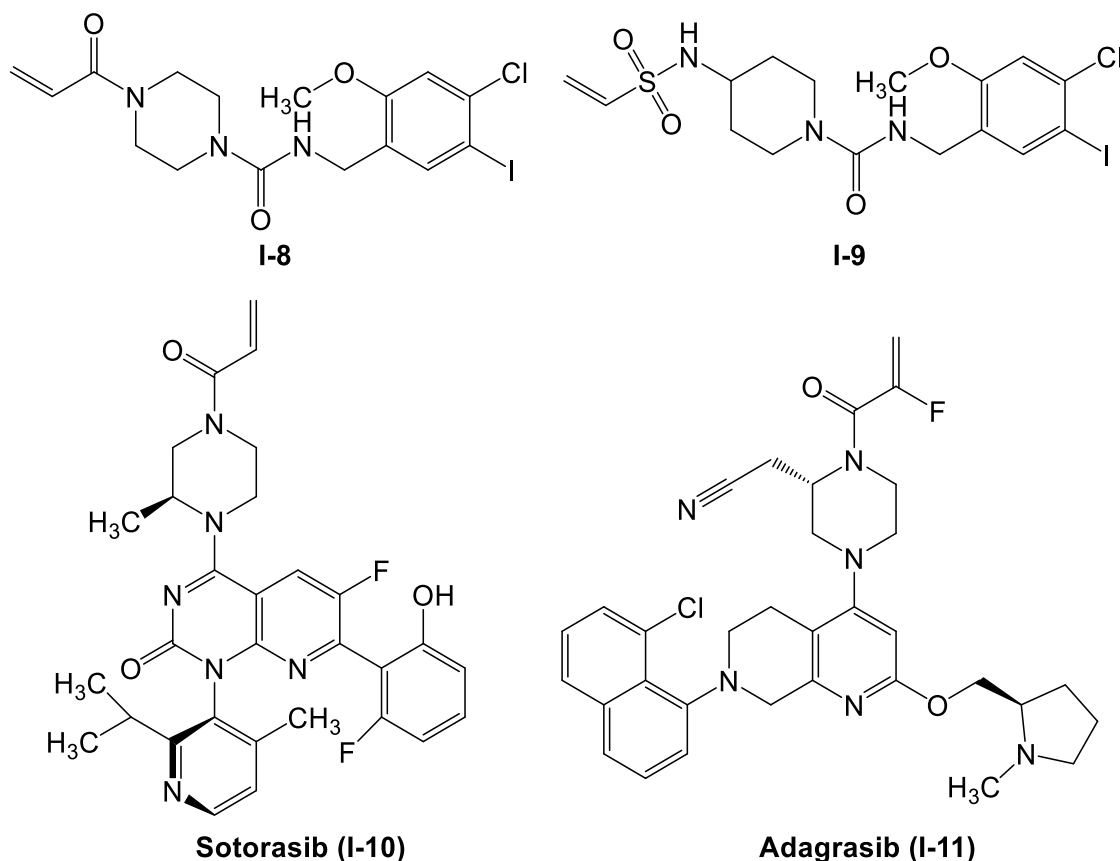


**Abb. 8:** Zeitliche Einordnung der wichtigsten Meilensteine seit der Entdeckung von K-Ras. [Abbildung modifiziert nach PARIKH *et al.*]<sup>[88]</sup>

Den fundamentalen Grundstein der G12C-Adressierung legte die Identifikation der SII-Bindetasche von OSTREM *et al.* unter der Leitung von KEVAN SHOKAT. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Auswirkungen einer Bibliothek von 480 Disulfidsubstanzen über Massenspektrometrie auf GDP-geladenes K-Ras<sup>G12C</sup> analysiert.

Im weiteren Verlauf ermöglichte eine SAR die Optimierung erster Hits und kristallographische Untersuchungen gaben tiefere Einblicke über den Bindungsmodus. Die Kristallstrukturen wiesen eine durch die kovalent gebundenen Liganden induzierte Umstrukturierung der Switch II-Region nach, ohne dass die Switch I-Region vergleichbare Konformationsänderungen aufwies. Fortan wurde diese Bindetasche als SII-Tasche betitelt. Weitere Optimierungsarbeiten führten zu den Amiden **I-8** und **I-9**, deren kovalenter Charakter durch die Acrylamid- bzw. die Vinylsulfonylamid-Einheit definiert wird (Abb. 9).<sup>[89]</sup> Folge der Bindung an die SII-Bindetasche ist die Erhaltung der GDP-Konformation und eine gehemmte Aktivierung. Essenzielle Interaktionen mit

Effektor-Proteinen werden dadurch verhindert und die Signaltransduktion gehemmt.<sup>[90]</sup> Da eine umfassende Diskussion der kovalenten Liganden für die G12C-Mutante den hier gesteckten Dissertationsrahmen überschreitet, werden im Folgenden Sotorasib (**I-10**) und Adagrasib (**I-11**) diskutiert (Abb. 9). Im Zusammenhang dieser Forschungsstrategie erhielten diese Inhibitoren bereits eine klinische Zulassung.



**Abb. 9:** Strukturen der kovalenten G12C-Inhibitoren **I-8**, und **I-9**, Sotorasib (**I-10**) und Adagrasib (**I-11**).

Die fundamentale Bedeutung der von SHOKAT entdeckten Bindetasche zeigte sich im Jahr 2018, in dem mit AMG-510 oder auch Sotorasib (**I-10**) der erste K-Ras<sup>G12C</sup>-Inhibitor für klinische Studien zugelassen wird. Der von LANMAN *et al.* bei der Firma *Amgen* (Applied Molecular Genetics) entwickelte Arzneistoff ist eine Optimierung eines Chinazolin-basierten kovalenten Binders.<sup>[91]</sup> AMG-510 (**I-10**) weist neben der Acrylamid-Einheit, die an ein Methylpiperazin gebunden ist, zwei weitere Substituenten am Chinazolinon-Gerüst auf: einen substituierten Phenyl- sowie einen Pyridin-Rest (Abb. 9). Die Einführung der Substituenten führten gegenüber der Ursprungsverbindung zu einer zehnfachen Steigerung der biologischen Aktivität ( $IC_{50}(pERK) = 68 \text{ nM}$ ). Dieser Anstieg resultiert aus der Adressierung einer weiteren Bindestelle (H95/Y96/Q99). Seit 2021 wird *LumaK-Ras*<sup>®</sup> für die Behandlung von Lungenkarzinomen eingesetzt.<sup>[92]</sup>

Im darauffolgenden Jahr (2019) erhielt MRTX849 oder Adagrasib (**I-11**) die Zulassung durch die *Food and Drug Administration* (FDA) als weiterer K-Ras<sup>G12C</sup>-Inhibitor. Wie Sotorasib (**I-10**) wird dieser zur Behandlung von Lungenkarzinomen und zusätzlich bei kolorektalem Karzinom (Darmkrebs) eingesetzt.<sup>[93]</sup> Der von der Firma *Mirati Therapeutics* entwickelte Inhibitor **I-11** weist die kovalent bindende Acrylamid-Einheit ebenfalls an einem Piperazin-Ring auf. Mit einem *N*-methylierten Prolin und einem Chloronaphthalin sind zwei weitere Substituenten an dem Tetrahydropyrimidopyrimidin gebunden (Abb. 9). Die biologische Aktivität des Acrylamids im einstellig nanomolaren Bereich ( $IC_{50} = 1 \pm 0.3 \text{ nM}$ ) brachte eine geringe metabolische Stabilität mit sich. Durch die Einführung eines Fluorsubstituenten wurde zwar eine geringe Reduktion der inhibitorischen Wirkung ( $IC_{50} = 14 \pm 3 \text{ nM}$ ) verzeichnet, jedoch führte diese Modifikation zu einer exorbitanten Steigerung der metabolischen Stabilität um zwei Größenordnungen.<sup>[94]</sup> Mit den zwei zugelassenen Inhibitoren und diversen weiteren Kandidaten in den klinischen Testphasen 1-3 bietet die G12C-Variante nur noch begrenzten Optimierungsspielraum. Darüber hinaus entfallen lediglich 12% der mutierten Varianten auf die G12C-Variante (Abb. 4b). Dieser Anteil tritt vor allem bei induziertem Lungenkrebs, etwa durch Rauchen, in Erscheinung und ist bei anderen Krebsformen nur selten nachzuweisen.<sup>[48]</sup>

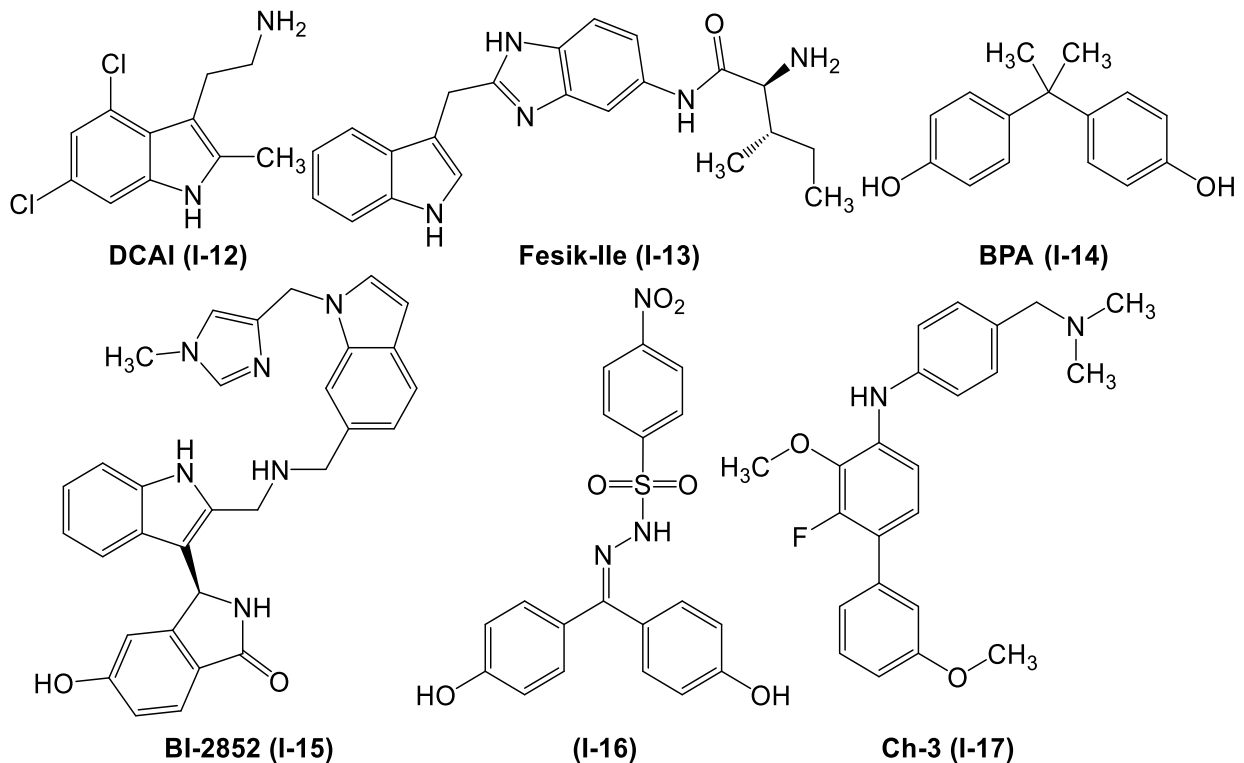
### 1.4.2 Direkte, nicht kovalente K-Ras-Inhibitoren

Ein weiterer fundamentaler Ansatzpunkt für die Evaluierung potenzieller Arzneistoffe ist neben der kovalenten G12C Inhibition die Adressierung des G12D Onkogens, da dieses etwa 25% der Punktmutationen ausmacht. Wie andere Ras-Proteine auch besitzt K-Ras4B keine ausgeprägten Bindetaschen, allerdings wurde im Jahr 2012 von zwei unabhängigen Forschungsgruppen eine kleine, hydrophobe Einbuchtung zwischen der Switch I und Switch II-Region registriert.<sup>[95,96]</sup> Diese ist in der apo-Ras<sup>off</sup>-Form nicht vorhanden und muss durch Liganden induziert werden. Bindetaschen, die in der apo-Form eines Proteins nicht auftreten und erst durch einen Liganden induziert werden, werden auch als *cryptic binding sites* oder *hidden binding sites* bezeichnet.<sup>[97]</sup> Während dieses Vorgangs exponiert eine Drehung des Tyr71 die Aminosäuren Lys5, Glu37, Asp54, Leu56 sowie Thr74 und legt die durch ihre Lokalisation benannte SI/II-Pocket auf der  $\alpha$ -Helix frei. Die mittels NMR durchgeführten Untersuchungen wiesen eine ausgeprägte Affinität der analysierten Region gegenüber Indol-Liganden nach.

Auf diesen Ergebnissen basieren das 4,6-Dichlor-2-methyl-3-aminoethyl-indol (DCAI, **I-12**) von SUN *et al.* sowie das von MAURER *et al.* synthetisierte Indol-Benzimidazol-Derivat **I-13** (Abb. 10). DCAI (**I-12**) senkt dabei die biologische Aktivität von Ras, indem es den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch mit einem  $IC_{50} = 342 \pm 22 \mu\text{M}$  und die CRaf-vermittelte Aktivierung an der Zellmembran mit einem  $EC_{50} = 15.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$  hemmt.<sup>[96]</sup> Der Indol-Benzimidazol-Ile-Hybrid **I-13** hingegen weist eine Bindungsaffinität von  $190 \mu\text{M}$  auf und inhibiert den Nukleotidaustausch bei einer  $c(\mathbf{13}) = 1\text{mM}$  mit  $78 \pm 8\%$ . Zwar besaßen andere Aminosäure-Derivate des Benzimidazols **I-13**, bspw. Glycin und  $\beta$ -Alanin, eine potentere Inhibition des GDP/GTP-Austauschs, die jedoch mit einer verminderten Bindungsaffinität einhergingen.<sup>[95]</sup>

Die SAR-Optimierung des Indols **I-13** führte zu dem bis heute potentesten SI/II-Binders BI-2852 (**I-15**, Abb. 10).<sup>[98]</sup> In Zusammenhang mit der Firma *Böhringer-Ingelheim* erweiterten KESSLER *et al.* zwei methylaminverbrückte Indole um eine Isoindolineinheit und einen Methylimidazol-Rest und erreichten so eine Bindungsaffinität von  $K_D = 770 \text{ nM}$  für die onkogene G12D Variante. Damit zeigt der Inhibitor eine für damalige Verhältnisse gute Selektivität gegenüber der G12D-Mutante, da die Inhibitionsfähigkeit für den *wt* mit  $K_D = 7.5 \mu\text{M}$  um eine Größenordnung geringer ausfällt. Aufgrund der Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen wirkt BI-2852 als Inhibitor für alle drei Isoformen. Die lediglich einstellig mikromolare Inhibition der ERK-Downstreamkaskade ( $IC_{50} = 6.7 \mu\text{M}$ ) qualifizierte BI-2852 (**I-15**) allerdings nicht als Kandidat für die klinische Entwicklung.<sup>[98]</sup>

Im Arbeitskreis SCHERKENBECK wurde 2013 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe STOLL ein NMR-Screening von 100 Substanzen an Rheb durchgeführt, das den Grundstein für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen onkogene Ras-Varianten legte. Liganden mit niedrigen Bindungsaffinitäten wurden zusätzlich an Ras getestet. Unter diesen fiel Bisphenol A (BPA, **I-14**) mit einem  $K_D$ -Wert von  $600 \pm 200 \mu\text{M}$  auf (Abb. 10). Des Weiteren ergaben die NMR-Analysen, dass das BPA ebenso wie die zuvor diskutierten Strukturen die SI/II-Bindestelle adressiert.<sup>[99]</sup> Durch weitere biochemische Derivatisierungen der Grundstruktur, bspw. Bisphenol S (BPS),<sup>[100,101]</sup> wurde eine Substanzbibliothek von Hydrazone und Oximen generiert, die den SOS-katalysierten GDP/GTP-Austausch mit einer Aktivität von bis zu  $IC_{50}(\mathbf{I-16}) = 255 \mu\text{M}$  hemmen. Dabei zeigen einige der *Small Molecules* eine  $\sim 3$ -fach stärkere Inhibition der Mutante im Vergleich zum *Wildtyp*.<sup>[102]</sup> Allerdings sind Hydrazone aufgrund der Hydrolysanfälligkeit instabil und Benzophenone bekannte *pan assay interference compounds* (PAINS).

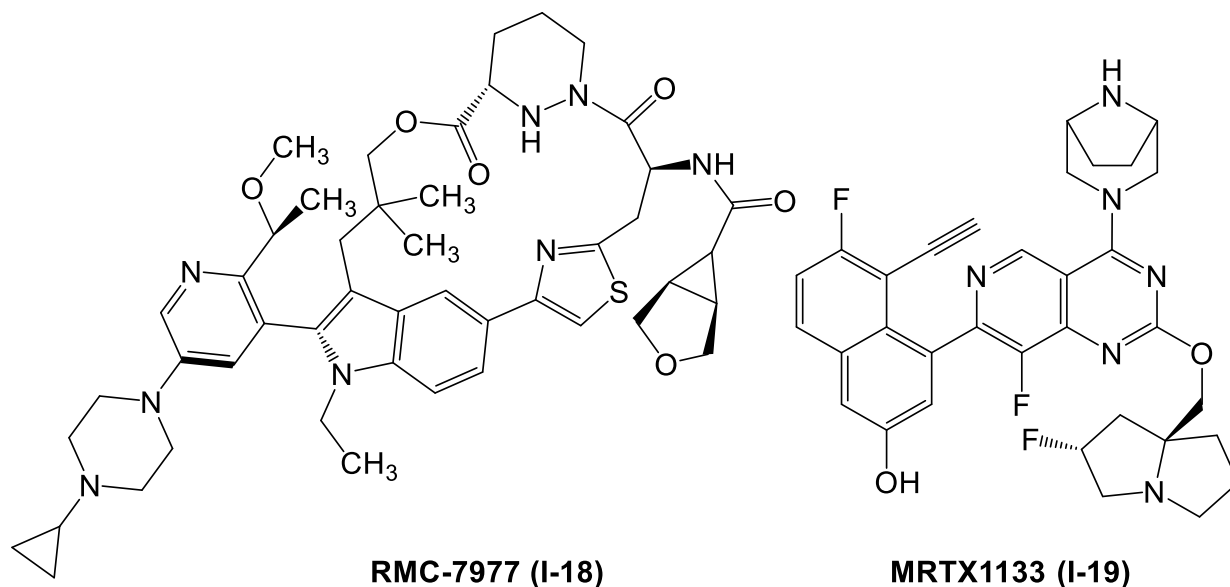


**Abb. 10:** Strukturen von allosterischen K-Ras4B Inhibitoren.

Ein anderes Konzept verfolgte die Arbeitsgruppe um TERENCE RABBITS, indem sie zunächst Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Messungen für die Suche nach potenziellen Ras-Liganden nutzte.<sup>[103]</sup> Die identifizierten Strukturen wurden anschließend über NMR-Analytik und Kristallstrukturen derivatisiert, besaßen allerdings nicht die Fähigkeit die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Ras und seinen Effektor-Proteinen zu unterbinden. Die Kombination mit einem bereits bekannten SI/II-Liganden (Abd-7) ergab schlussendlich den Inhibitor Ch-3 (**I-17**).<sup>[104]</sup> Charakteristisch für diesen Liganden ist seine selektive Bindung an die aktive K-Ras<sub>on</sub>-Form, infolgedessen die Interaktionen mit Effektorproteinen gezielt gehemmt werden. Das Biphenyl **I-17** zeigt ab einer Konzentration von  $c(\mathbf{I-17}) = 10 \mu\text{M}$  eine vollumfängliche Inhibierung sowohl des Akt- als auch des ERK-Signalweges. Während Ch-3 (**I-17**) als SI/II-Ligand analog zu BI-2852 (**I-15**) ebenfalls alle Isoformen adressiert, werden keine Aussagen über die mutationsspezifische Selektivität getroffen.<sup>[103]</sup>

Eine weitere Strukturklasse, die ebenfalls die GTP-geladene Ras-Form adressiert, sind die aus einem Indol, einem Thiazol und einem Hexahydropyridazin bestehenden Zyklen der Firma *Resolution Medicine*. Der molekulare Kleber („*molecular glues*“) RMC-7977 (**I-18**, Abb. 11) besitzt dabei eine hohe Bindungsaffinität sowohl für CyclophilinA (CYPA,  $K_D = 195 \text{ nM}$ ) als auch für K-Ras ( $K_D = 85 \text{ nM}$ ).<sup>[105]</sup> Infolgedessen wird ein Komplex bestehend aus CYPA- **I-18**-K-RAS gebildet. Das Resultat ist ebenso wie bei Ch-3 (**I-17**)

die Verhinderung der Interaktionen mit Effektor-Proteinen, sodass die Downstreamkaskade unterbrochen wird. Ein wesentlicher Vorteil von RMC-7977 (**I-18**) liegt in seiner hohen Bioverfügbarkeit von 63%. Zudem inhibiert der Wirkstoff **I-18** die onkogene G12C-Variante, die aufgrund einer Signalweg-Regeneration eine Resistenz gegenüber bisherigen G12C-Inhibitoren aufweist.<sup>[106,107]</sup>

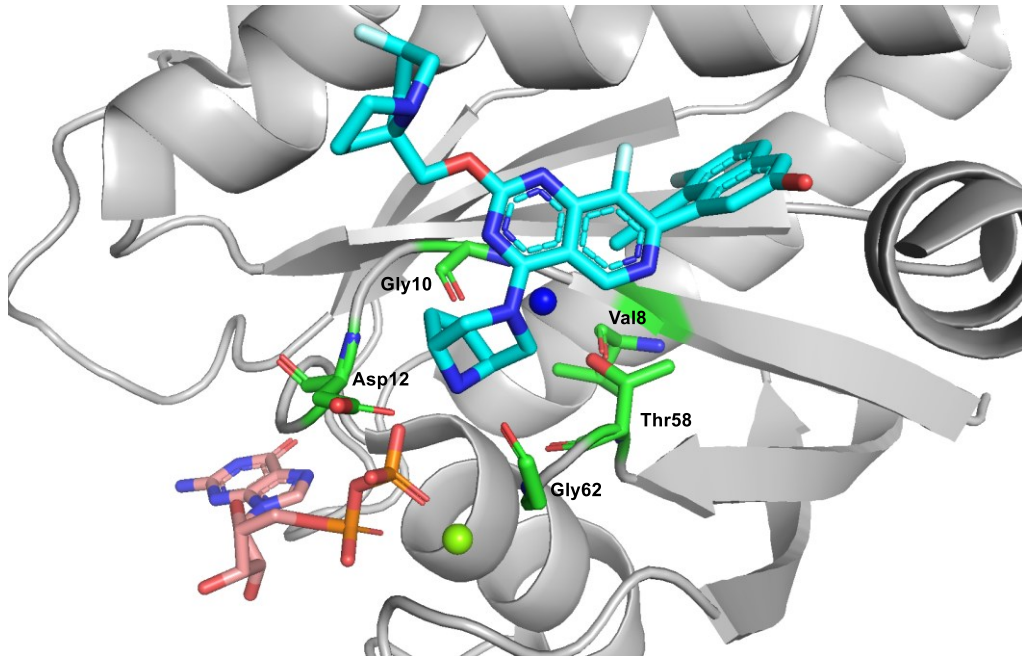


**Abb. 11:** Strukturen von RMC-7977 (**I-18**) und MRTX1133 (**I-19**).

Auf Grundlage ihres kovalenten G12C-Binders entwickelte die Firma *Mirati Therapeutics* im Jahr 2021 einen hochpotenten Inhibitor der G12D-Mutation. Auf Basis von kristallographischen Strukturanalysen wurde jede strukturelle Einheit des Vorläufermoleküls MRTX849 (**I-11**) systematisch optimiert. Daraus resultierte mit MRTX1133 (**I-19**, Abb. 11) ein K-Ras-Ligand mit einer Bindungsaffinität im sub-nanomolaren Bereich.<sup>[108]</sup> Die Abhängigkeit der biologischen Aktivität von den einzelnen Strukturmotiven wird deutlich anhand der Substitution des Scaffolds durch einen Pyridopyrimidin-Bizyklus und der kovalent bindenden Einheit durch ein verbrücktes Piperazin. Diese beiden strukturellen Modifikationen bedingen allein eine Affinitätssteigerung um das 50 000-fache im Vergleich zu dem nicht kovalenten G12D-Analogon von MRTX849 (**I-11**).

Zu der bemerkenswerten *in vitro* Aktivität trägt zusätzlich ein Acetylenylsubstituent bei, der über wasservermittelte Wasserstoffbrücken mit Val8, Gly10 sowie Thr58 wechselwirkt (Abb. 12). Des Weiteren interagiert ein Fluoropyrrolizidin ebenfalls über Wasserstoffbrücken zu dem Glu62, die durch den elektronenziehenden Effekt des Fluors noch verstärkt wird. Durch eine H-Brücke des sekundären Amins der Piperazineinheit zu Gly60 und Asp12 wird eine nie dagewesene, ~500-fache Selektivität für die onkogene

Mutante erreicht. Dieses Netzwerk aus Wechselwirkungen führt zu einer Hemmung des ERK-Signalweges mit  $IC_{50} = 2 \text{ nM}$ , sodass MRTX1133 (**I-19**) gegenwärtig der biologisch aktivste K-Ras-Inhibitor ist. Derzeit befindet er sich in der zweiten klinischen Testphase (NCT05737706).<sup>[109]</sup>



**Abb. 12:** Interaktionen zwischen MRTX1133 (**I-19**, blau) und den Aminosäuren der SwitchII-Region (grün); GDP = rosa, Magnesium = grün.

Zu der Aufklärung des zeitlichen Verlaufs der K-Ras<sup>G12D</sup>-Inhibition durch MRTX1133 (**I-19**) führten TU *et al.* eine besonders umfangreiche Moleküldynamik-Analyse ausgehend von 42 Kristallstrukturen über insgesamt 99  $\mu\text{s}$  durch.<sup>[110]</sup> Die Ergebnisse belegen, dass die Ausbildung der MRTX1133-Bindetasche spezifisch von den Startbedingungen abhängt. In den Moleküldynamiksimulationen der 42 Proteinstrukturen ergaben lediglich fünf Läufe die Bindungskonformation des Liganden aus der 7RPZ mit einer mittleren quadratischen Abweichung („*root mean square deviation*“ RMSD) von  $<3.5 \text{ \AA}$ . In den weiteren 36 Simulationen lagen die RMSD-Werte nicht nur höher, sondern zusätzlich betrug auch die Bindungsabstände zwischen den spezifischen Aminosäuren der SII-Bindetasche und dem MRTX1133 Zentrum über  $5 \text{ \AA}$ . Die Zeit, in der MRTX1133 (**I-19**) die Bindetasche geöffnet hatte, betrug in den sechs Simulationen  $0.2\text{-}2.7 \mu\text{s}$ . Aus diesen Ergebnissen ergab sich eine theoretische Assoziationskonstante von  $2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , die mit dem experimentellen Wert von  $K_{\text{on}} = 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  weitestgehend übereinstimmt.<sup>[108]</sup>

### 2. Motivation und Zielsetzung

Analog zu den anfangs erwähnten Kinasen zeigte die Firma *Mirati Therapeutics* mit MRTX1133 (**I-19**), dass es möglich ist, die als *undruggable* geltenden Ras-Proteine im nanomolaren Bereich zu adressieren. Obwohl die klinische Zulassung des Wirkstoffs in naher Zukunft absehbar ist, bleibt die Suche nach weiteren Inhibitoren ein wichtiges Thema. Denn angesichts der bekannten Resistenzbildung bei Krebserkrankungen gegenüber neuen Therapeutika sind zusätzliche Leitstrukturen und Entwicklungskandidaten unverzichtbar. Diese Problematik ist sowohl für bereits etablierte Kinaseinhibitoren wie Imatinib<sup>[111]</sup> als auch bei den beiden diskutierten G12C-Inhibitoren Sogograsib (**I-10**) und Adagrasib (**I-11**) von hoher Relevanz.<sup>[112,113]</sup> Auch bei der Behandlung von Pankreaskrebs mit MRTX1133 (**I-19**) wurden bereits Resistenzbildungen beobachtet,<sup>[114,115]</sup> sodass weitere Ausweichmöglichkeiten für den Einsatz in der K-Ras<sup>G12D</sup>-Präzisionsmedizin von essenzieller Bedeutung sind.

Von der Partnerfirma *Lead Discovery Center* (LDC) wurden innerhalb eines *High-Throughput-Screenings* (HTS) die Pyridazinon-Tetrazole LDC043210 (**I-21**) und LDC044287 (**I-22**) identifiziert. Diese sind Derivate des PDE $\delta$ -Inhibitors NPD-001 (**I-20**), bei denen lediglich die Methoxygruppe in *para*-Position zum Scaffold und die Doppelbindung des Bicyklus fehlen (Abb. 13). Die einstellig mikromolare Inhibition des Nukleotidaustauschs der G12D-Variante ( $IC_{50}$  (**I-21**) = 6.05  $\mu$ M bzw.  $IC_{50}$  (**I-22**) = 7.81  $\mu$ M) legte den Startpunkt für diese Arbeit fest. Ziel des Projekts war die Erweiterung des SAR-Raums der Verbindung **I-22** (Abb. 13) über wirkstoffbasiertes Strukturdesign. Die Propyl-Linkereinheit (lila), der Tetrazol-Substituent (grün) sowie der Cycloheptylring (rot) sollten jeweils strukturell variiert werden, um den Einfluss elektronischer, sterischer und konformationeller Effekte auf die Wechselwirkungen im Bindungsbereich und damit auf die biologische Aktivität systematisch zu untersuchen.

Pyridazinon-Scaffolds finden eine breitgefächerte Verwendung im pharmakologischen Bereich, da sich der Ring leicht funktionalisieren lässt und der Grundkörper durch einfache Kondensationsreaktionen aufgebaut werden kann.<sup>[116]</sup> Die Anwendung von Pyridazinonen bei diversen Krankheitsbildern sowie die bereits gute Aktivität im GDP/GTP-Austauschassay machen das Pyridazinon **I-22** zu einer idealen Ausgangsstruktur für SAR-Studien.<sup>[117,118]</sup>

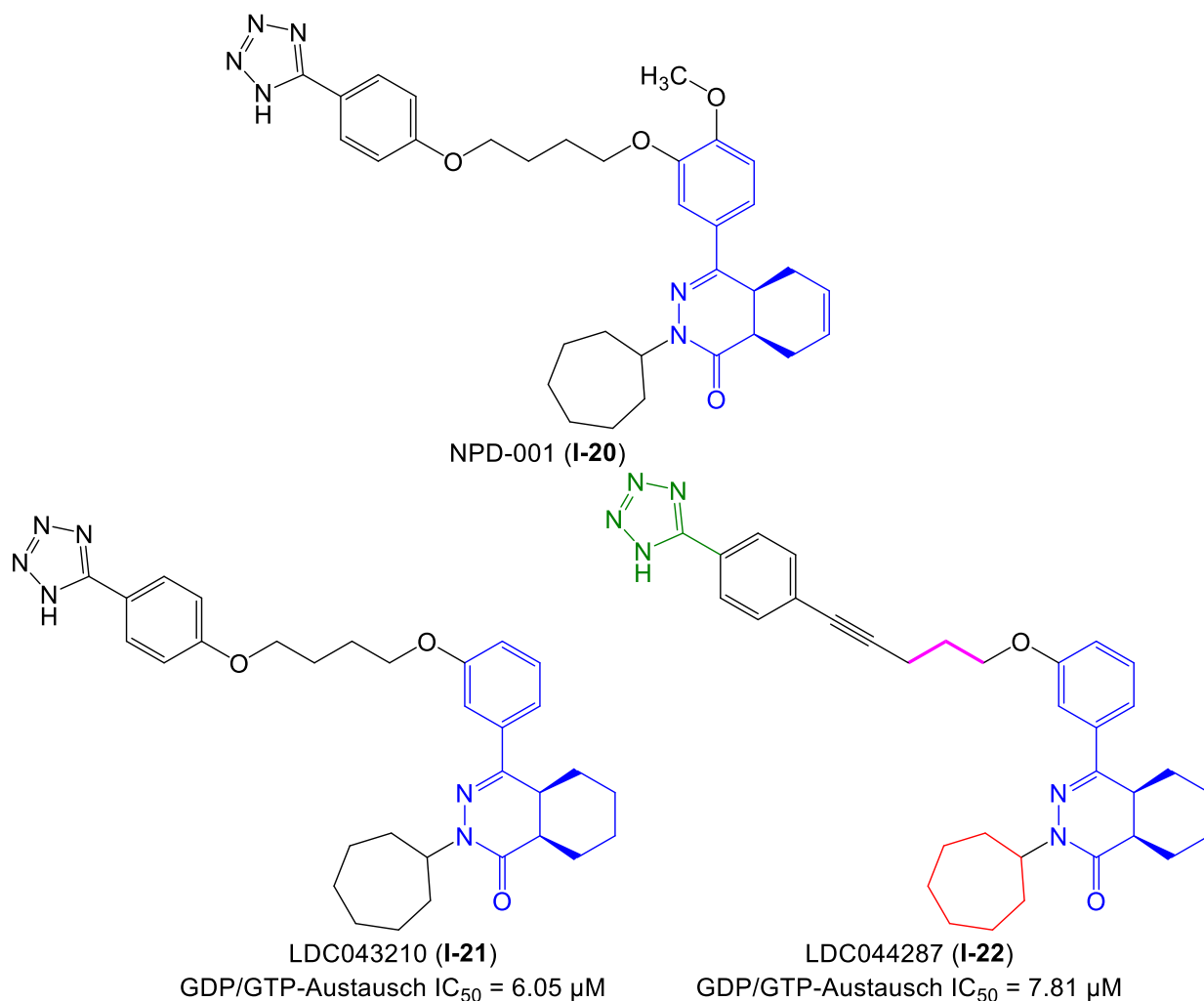


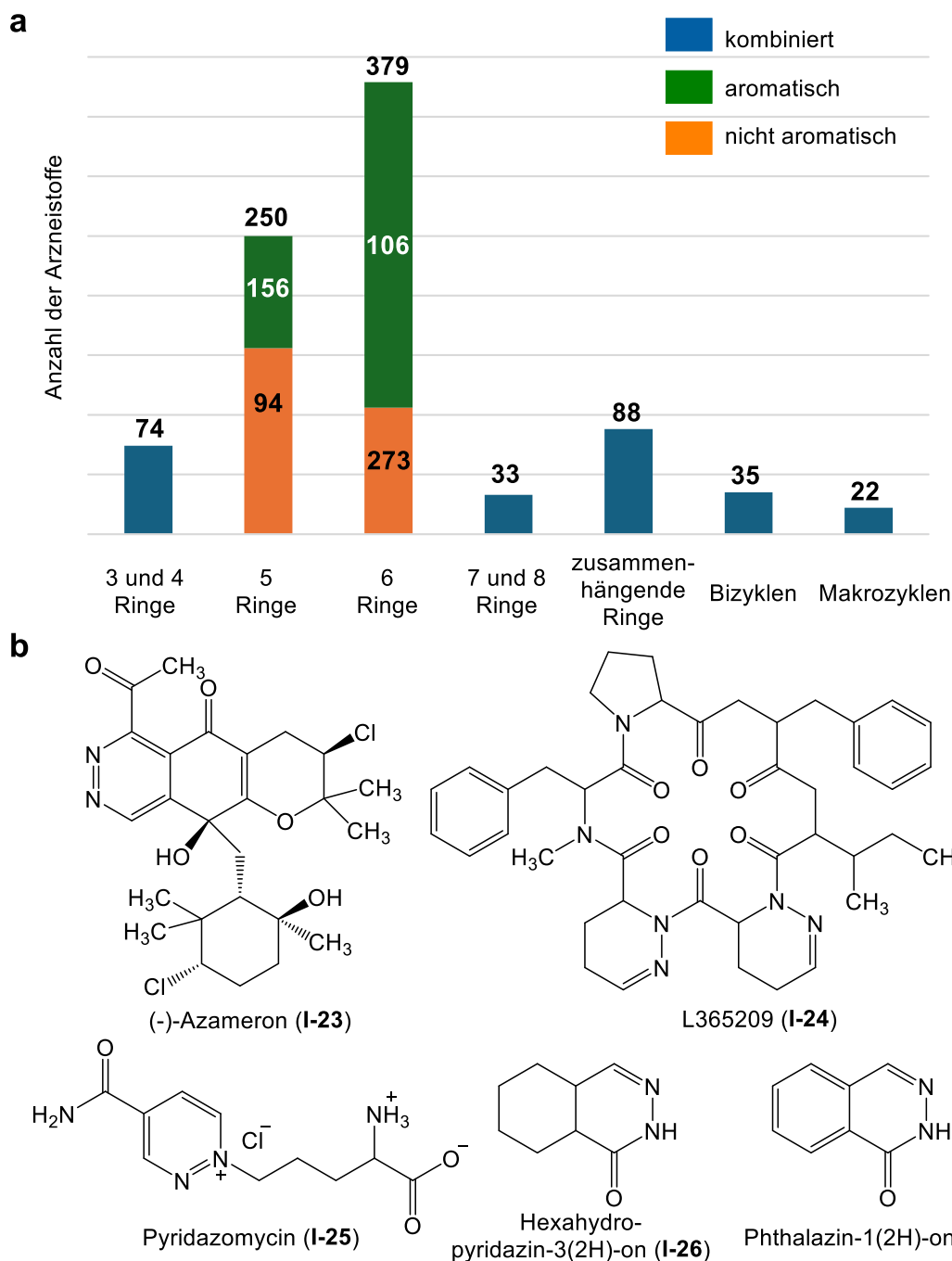
Abb. 13: Strukturen der Pyridazinone I-20, I-21 sowie I-22.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Pyridazinone

In der pharmazeutischen Welt werden Heterozyklen sowohl als vielseitige Biomimetika als auch als funktionale Scaffolds komplexer Strukturen eingesetzt. Darüber hinaus ermöglichen Heterozyklen die gezielte Regulierung des Protonierungszustands im physiologischen Milieu sowie die Lipophilie. Daraus resultieren teils erhebliche Unterschiede in den pharmakokinetischen Eigenschaften.<sup>[119]</sup> Die fundamentale Bedeutung von stickstoffhaltigen Heterozyklen belegten VITAKU *et al.* in einer Studie, in der sie aufzeigten, dass 59% aller von der FDA zugelassenen *Small Molecules* mindestens einen dieser Heterozyklen enthalten.<sup>[120]</sup> Während Indole, Chinoline oder Chinazoline häufig als Grundstrukturen in Naturstoffen vorkommen, sind nur wenige natürliche Vertreter bekannt, die auf 1,2-Diazin-Ringen basieren. Dazu gehören unter anderem Azamerone (I-23), L365209 (I-24) oder Pyridazomycin (I-25) (Abb. 14b).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

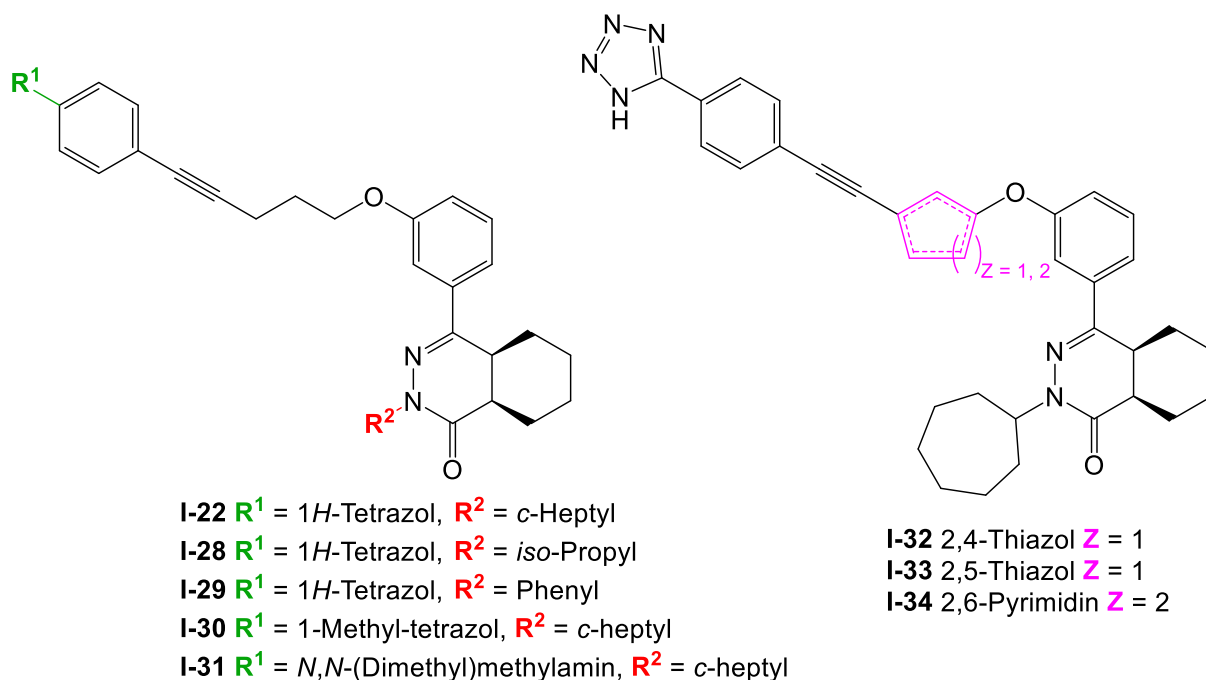


**Abb. 14:** a) Anzahl der heterozyklischen Pharmazeutika in Abhängigkeit von Ringgröße und -struktur. [Abbildung modifiziert nach EBENEZER *et. al.*<sup>[119]</sup> b) Strukturen der natürlichen Diazine I-23, I-24 und I-25 sowie der synthetischen Pyridazinone I-26 und I-27.

Zwei nicht natürlich vorkommende Beispiele für die Stoffklasse der 1,2-Diazine sind das Hexahydro-pyridazin-3(2H)-on (I-26) und das Phthalazin-1(2H)-on (I-27). Diese wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt und haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, da sie breite Anwendungsmöglichkeiten gegen eine Reihe von biologischen Zielproteinen besitzen.<sup>[121]</sup> So konnten diese *privileged scaffolds* bereits als Inhibitoren der Aldose Reduktase (AR), Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) und der Phosphodiesterase (PDE) eingesetzt werden.<sup>[122–124]</sup>

Nachdem die Verbindungen **I-21** und **I-22** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $6.05 \mu\text{M}$  bzw.  $7.81 \mu\text{M}$  gute Ergebnisse in dem SOS-katalysierten Nukleotidaustauschassay von Ras besaßen, soll das Pyridazinon-Scaffold nachsynthetisiert werden. Für die Ableitung einer SAR sollen verschiedene Molekülbereiche (Abb. 15  $R^1$  grün,  $R^2$  rot, lila) derivatisiert werden. Mit dem aliphatischen Linker besitzt das Pyridazinon **I-21** fünf frei drehbare Bindungen. Zur vollständigen Einschränkung der konformationellen Freiheit des Linkers dient das Pyridazinon mit Dreifachbindung (**I-22**) als Ausgangspunkt. Die verbleibenden drehbaren Bindungen sollen im weiteren Verlauf über drei Ringsysteme (lila) konformationell eingeschränkt werden (**I-32** - **I-34**).

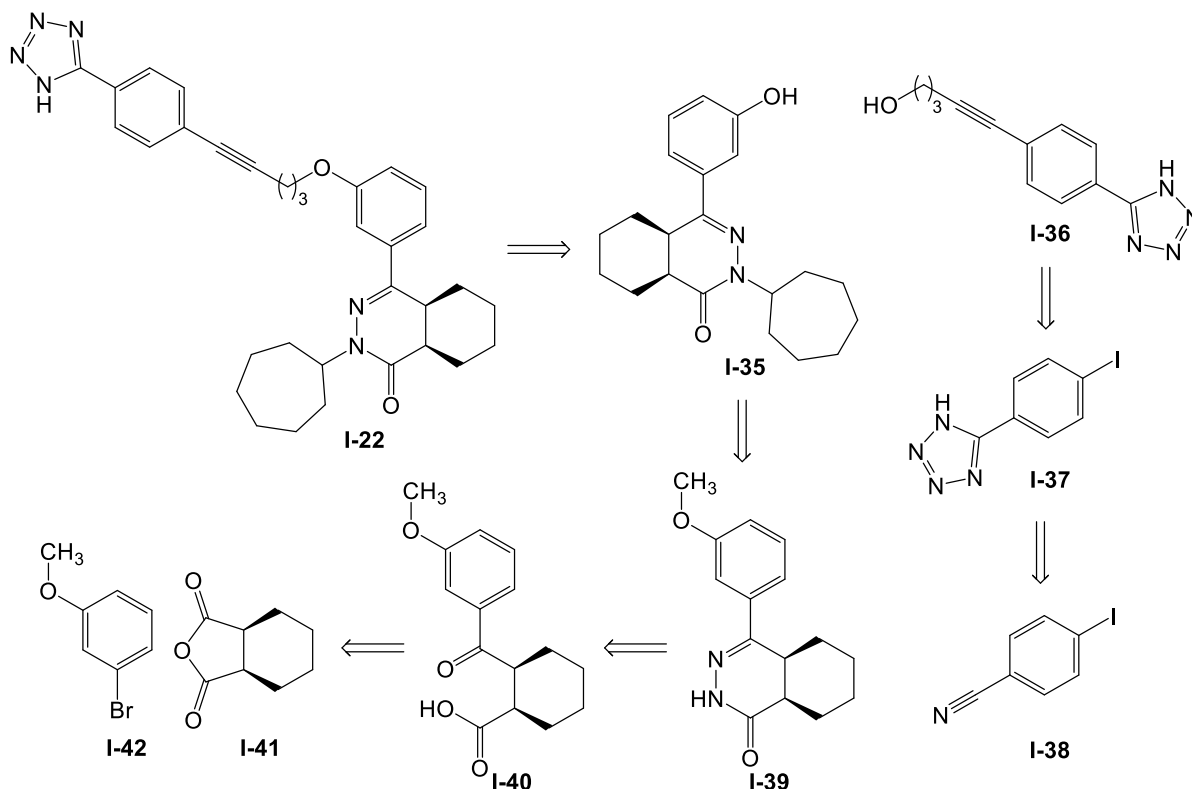
Des Weiteren soll die Tetrazol-Einheit durch ein tertiäres Amin (**I-31**) ersetzt und das azide Proton durch Methylierung (**I-30**) entfernt werden ( $R^1$  grün). Den letzten strukturellen Ansatzpunkt bietet der Cycloheptylring, der gegen einen Isopropylrest (**I-28**) und einen Phenylring (**I-29**) substituiert werden soll ( $R^2$  rot).



**Abb. 15:** Strukturen der Derivate (**I-21** sowie **I-27** - **I-33**) für die geplante SAR.

Die Planung der Synthese erfolgte in Anlehnung an die Route von VAN DER MEY *et al.*, die für die Zielsubstanz **I-22** im Schema 1 aufgeführt ist.<sup>[125]</sup> Im Gegensatz zur erwähnten Arbeit soll das Pyridazinon **I-22** über eine direkte Veretherung des Tetrazols **I-36** und nicht über ein Nitril gebildet werden. Der Alkohol **I-36** wird aus einer Sonogashira-Kupplung des Phenyljodids **I-37** und 4-Pentin-1-ol erhalten. Zuvor wird die Tetrazoleinheit aus einer Cycloaddition des Nitrils **I-38** mit Natriumazid aufgebaut.

Der Cycloheptylrest des Phenols **I-35** wird über eine Alkylierung des Diazinons **I-39** eingeführt. Das Scaffold wird aus Hydrazin und der 1,4-Ketocarbonsäure **I-40** aufgebaut, die durch eine metallvermittelte Anhydridspaltung hergestellt wird. Daher sind Hexahydrophthalsäure (**I-41**) und 2-Bromanisol (**I-42**) die Edukte. Die stereochemischen Eigenschaften des gesättigten Phthalsäurederivats **I-41** erfordern den Einsatz des reinen *cis*-Isomers. Die Diazinprodukte liegen aufgrund der beiden Stereozentren als Racemat der *cis*-Diastereomere in den 4a*R*,8a*S*- und 4a*S*,8a*R*-Konfigurationen vor.<sup>[126]</sup>

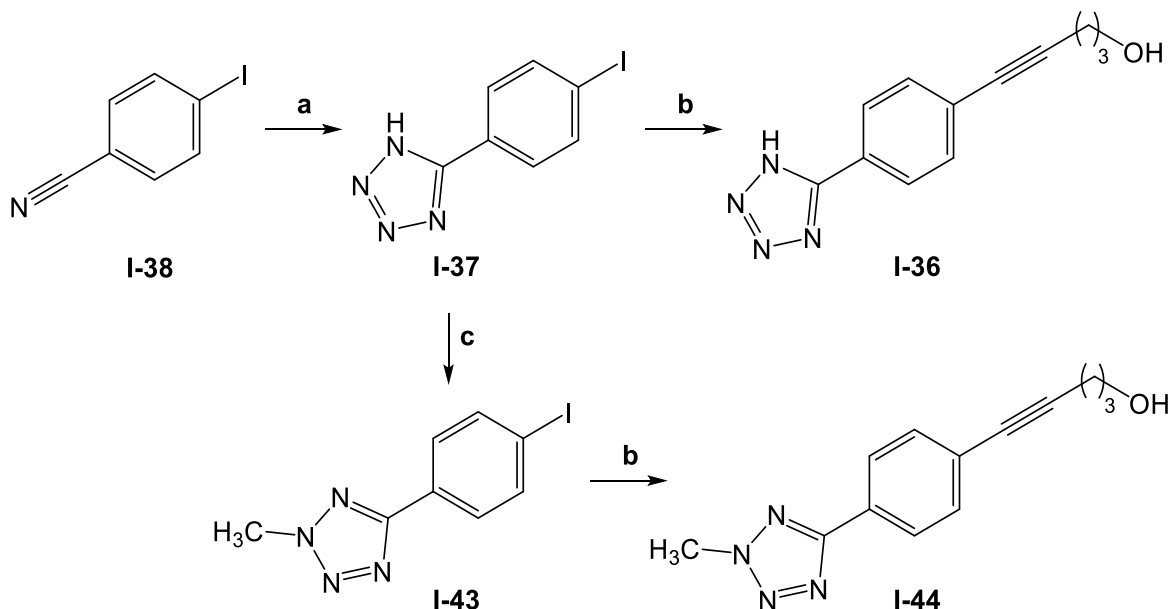


**Schema 1:** Retrosynthetische Zerlegung des Pyridazinons **I-22**.

### 3.1.1 Synthesen

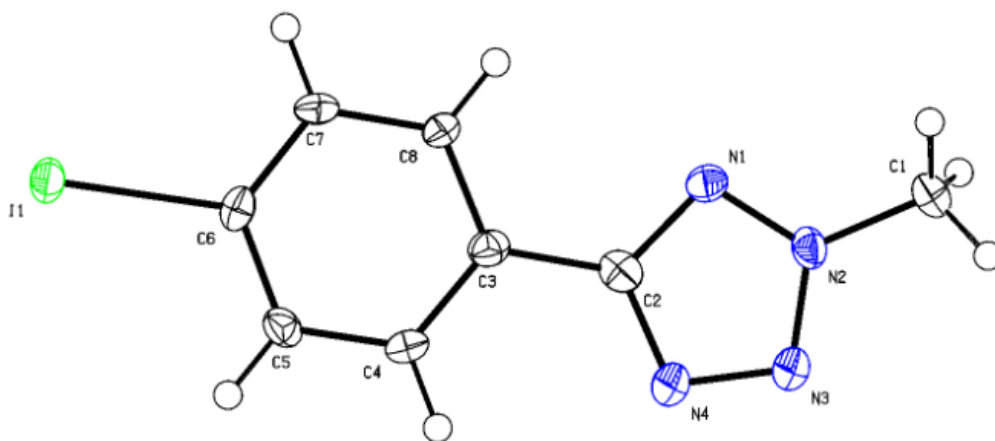
Zunächst wurde für die Herstellung der Alkynylphenyltetrazole **I-36** und **I-44** *p*-Iodbenzonitril (**I-38**) in einer [3+2]-Cycloaddition mit Natriumazid zu dem Tetrazol **I-37** umgesetzt (Schema 2).<sup>[127]</sup> Nach der vollständigen Umsetzung des Edukts wurde das Produkt **I-37** durch die Ausfällung mit Wasser bei 0 °C ohne weitere Aufarbeitung analytisch rein mit einer guten Ausbeute von 83% erhalten. Für die biologische Testung wurde sowohl das 1*H*-Tetrazol als auch ein zweifach substituiertes Tetrazol synthetisiert. Da lediglich das azide Proton des Tetrazols modifiziert werden sollte, spielte das Substitutionsmuster keine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund wurde das Phenyltetrazol **I-37** einer Alkylierungsreaktion mit Methyljodid unterzogen. Aus dieser wurde das 2,5-disubstituierte Tetrazol **I-43** mit einer guten Ausbeute von 78% isoliert.

2,5-disubstituierte Tetrazole sind häufig die Hauptprodukte von Alkylierungsreaktionen der 5-substituierten Tetrazole.<sup>[128]</sup> Das Verhältnis der beiden Regioisomere hängt dabei von der gewählten Reaktionstemperatur sowie dem Substituenten in der 5-Position ab. Gleiches gilt für Acylierungen und Arylierungen.<sup>[129]</sup>



**Schema 2:** Synthese der Alkinphenyltetrazole **I-36** und **I-44**. a)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , DMF,  $130\text{ }^\circ\text{C}$ , 17 h, 83%; b) 4-Pentin-1-ol,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , CuI, Piperidin, DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1), 17 h,  $65\text{ }^\circ\text{C}$ , **I-36** 84%, **I-44** 85%; c) MeI, DCM, RT, 17 h, 78%.

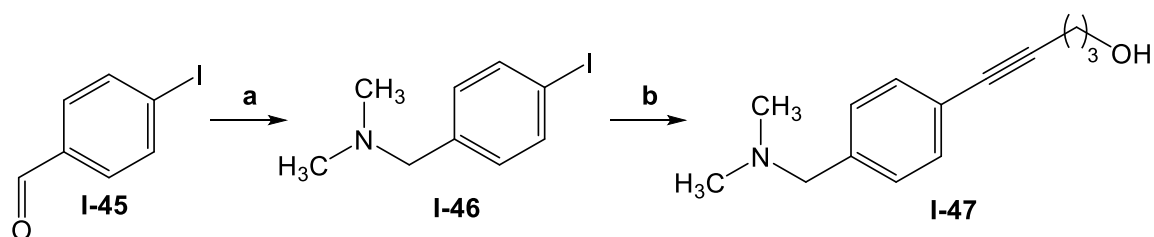
Die selektive Synthese 1,5-disubstituierter Tetrazole erfolgt bevorzugt aus der Umsetzung alkylierter Azide mit Nitrilen. Alternativ kommen bestimmte Precursor, bspw. Amide oder Aminonitrile, in Kombination mit Natriumazid zum Einsatz.<sup>[130]</sup> Die analytische Bestätigung der Methylierung der 2-Position erfolgte über die Bestimmung der Kristallstruktur durch die Arbeitsgruppe MOHR (Abb. 16). Die Parameter der Messung sind im Anhang in Tab. 25 aufgeführt.



**Abb. 16:** Kristallstruktur des Methyltetrazolid **I-43**, aufgenommen in der AG MOHR.

Anschließend wurden die beiden Phenyltetrazole **I-37** und **I-43** in einer Sonogashira-Kupplung mit 4-Pentin-1-ol zu den Produkten **I-36** und **I-44** umgesetzt (Schema 2). Bei Sonogashira-Reaktionen ist die Wahl des Lösungsmittels und der Base oftmals entscheidend; dabei ist der Einsatz von Triethylamin als Lösungsmittel und Base etabliert.<sup>[131–133]</sup> Im Fall des Edukts **I-37** wurde jedoch keine Produktbildung beobachtet. Erst ein DMF/H<sub>2</sub>O-Gemisch (99:1) und der Einsatz von Piperidin, wie von GLANG *et al.* vorgeschlagen, führten zur Bildung des gewünschten Produkts **I-36** in einer guten Ausbeute von 84%.<sup>[134]</sup> Bei großen Ansätzen (>1.00 g) fielen die Ausbeuten geringer aus, da zur Gewinnung des Produkts in ausreichender Reinheit mindestens zwei säulenchromatographische Aufreinigungen notwendig waren. Unter den gleichen Bedingungen wurde das 2,5-disubstituierte Tetrazol **I-44** mit guten 85% Ausbeute erhalten.

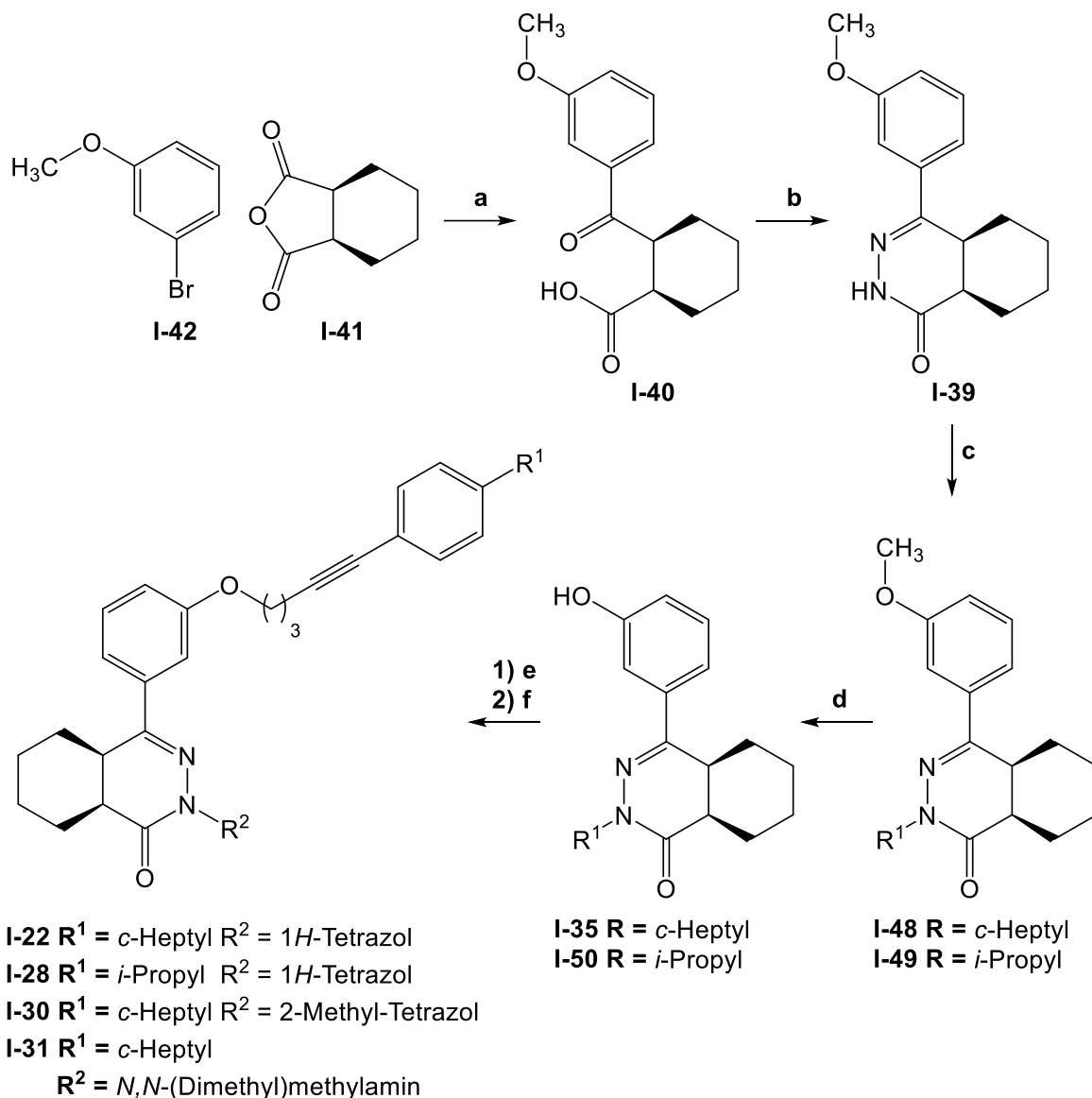
Das tertiäre Alkinylphenylamin **I-467** (Schema 3) wurde ausgehend von *p*-Iodbenzaldehyd (**I-45**) durch eine reduktive Aminierung mit Dimethylamin und anschließende Sonogashira-Kupplung synthetisiert. Sowohl das Amin **I-46** als auch der Alkohol **I-47** wurden mit (sehr) guten Ausbeuten von 94% bzw. 80% erhalten.



**Schema 3:** Herstellung des Alkohols **I-47**. a) (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH·HCl, Natriumtriacetoxyborhydrid, DMF, RT, 17 h, 94%; b) 4-Pentin-1-ol, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, TEA 17 h, 65 °C, 84%.

Das Pyridazinon **I-39** (Schema 4) wurde ausgehend von Bromanisol **I-42** und dem Hexahydrophthalsäureanhydrid (**I-41**) aufgebaut. Die lithiumvermittelte Reaktion mit anschließender Zyklisierung durch Hydrazin ergab eine Ausbeute von 51%. Bei der Bildung der 1,4-Ketocarbonsäure **I-40** ist zu beachten, dass das lithiierte Methoxybenzol zu dem Anhydrid **I-41** getropft wird, da sonst eine deutlich geringere Ausbeute erhalten wird. Während VAN DER MEY *et al.* die Säure **I-40** mittels einer Grignard-Reaktion mit einer Ausbeute von 31% erhielten,<sup>[125]</sup> ließ sich diese durch den Einsatz von *n*-BuLi deutlich steigern. Des Weiteren ist bei dieser Reaktion auf das stöchiometrische Verhältnis von 1:1 zwischen Base und *m*-Bromanisol (**I-42**) zu achten. Grund hierfür ist, dass das Anhydrid in  $\beta$ -Stellung jeweils einen aziden Wasserstoff besitzt. Wird ein Überschuss an Base eingesetzt, führt die resultierende Deprotonierung über eine Keto-Enol-Tautomerie

zum Verlust der Stereoinformation und damit zur Bildung des thermodynamisch stabileren *trans*-Isomers.

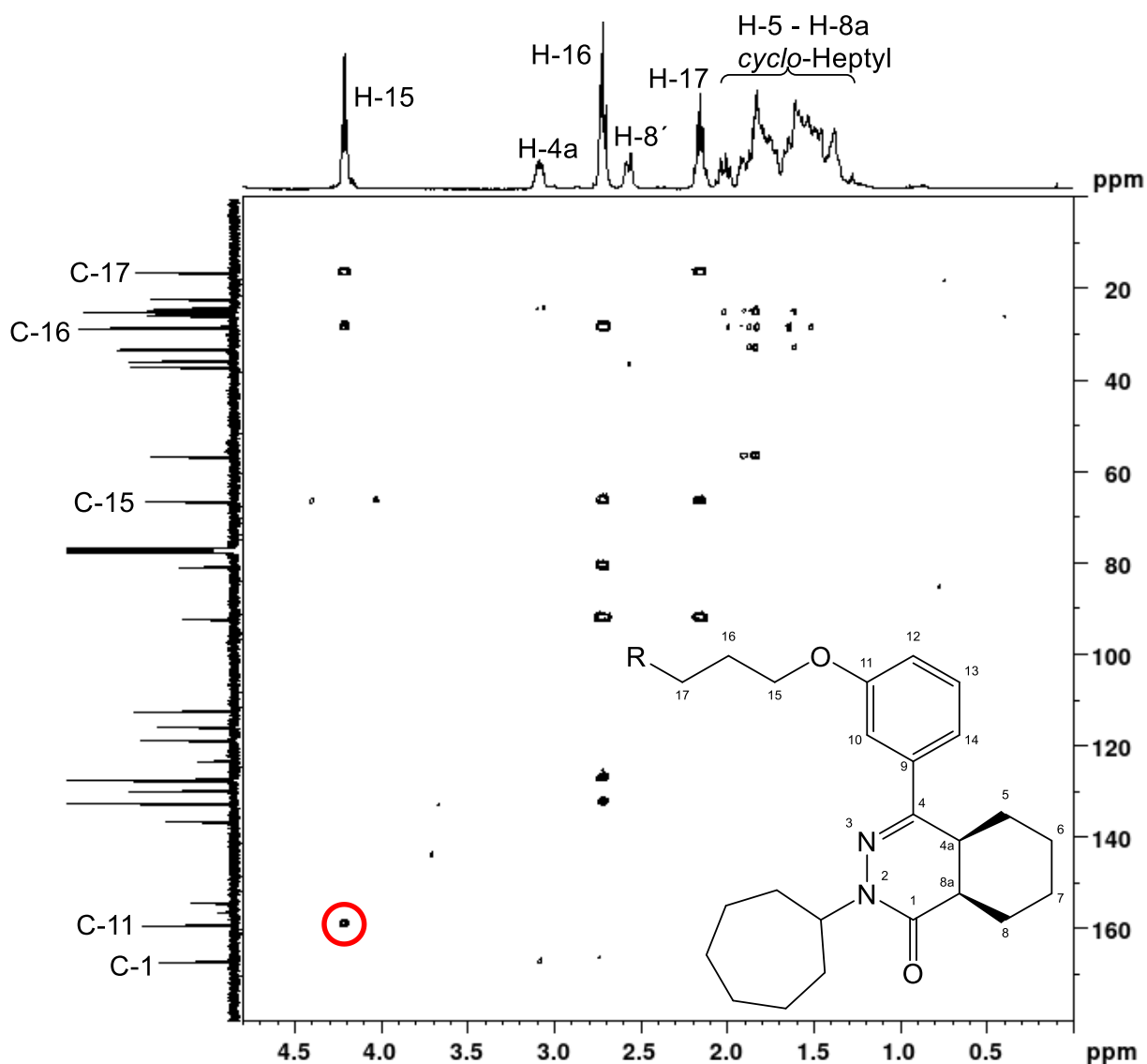


**Schema 4:** Synthese der Zielprodukte **I-22**, **I-28**, **I-30** und **I-31**. a) BuLi, THF, -90 °C, 2 h, 51%; b) H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>, EtOH, Reflux, 12 h, 92%; c) Cycloheptylbromid bzw. 2-Brompropan, NaH, DMF, RT, 17 h, **I-48** 51%; **I-49** 68%; d) BBr<sub>3</sub> bzw. AlCl<sub>3</sub>, DCM, RT, 17 h, **I-35** 90%, **I-50** 59%; e) **I-36**, **I-44**, **I-47**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; f) NaH, DMF, RT, 17 h, **I-22** 48%, **I-28** 65%, **I-30** 64%, **I-31** 63% jeweils über zwei Schritte.

Auch bei der Zyklisierung des 1,2-Diazinrings übertraf die erzielte Ausbeute von 92% die in der Literatur berichtete Ausbeute von 63% deutlich. Während die Autoren eine Reaktionszeit von 4 h angeben, wurde diese auf 12 h erhöht. Außerdem wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie aufgearbeitet, anstatt dies aus Methanol zu kristallisieren. VEERMAN *et al.* berichten hier ebenfalls von Ausbeuten um die 80–90% bei einer Reaktionszeit von 6 h.<sup>[126]</sup> Die Ausbeuten der Alkylierungen des Diazins **I-39** mit Bromcycloheptan bzw. 2-Brompropan zu den Pyridazin-3(2*H*)onen **I-48** und **I-49** liegen mit 51% bzw. 68% im Bereich der Literaturausbeuten. Das Isopropylderivat **I-49** wurde

### 3. Ergebnisse und Diskussion

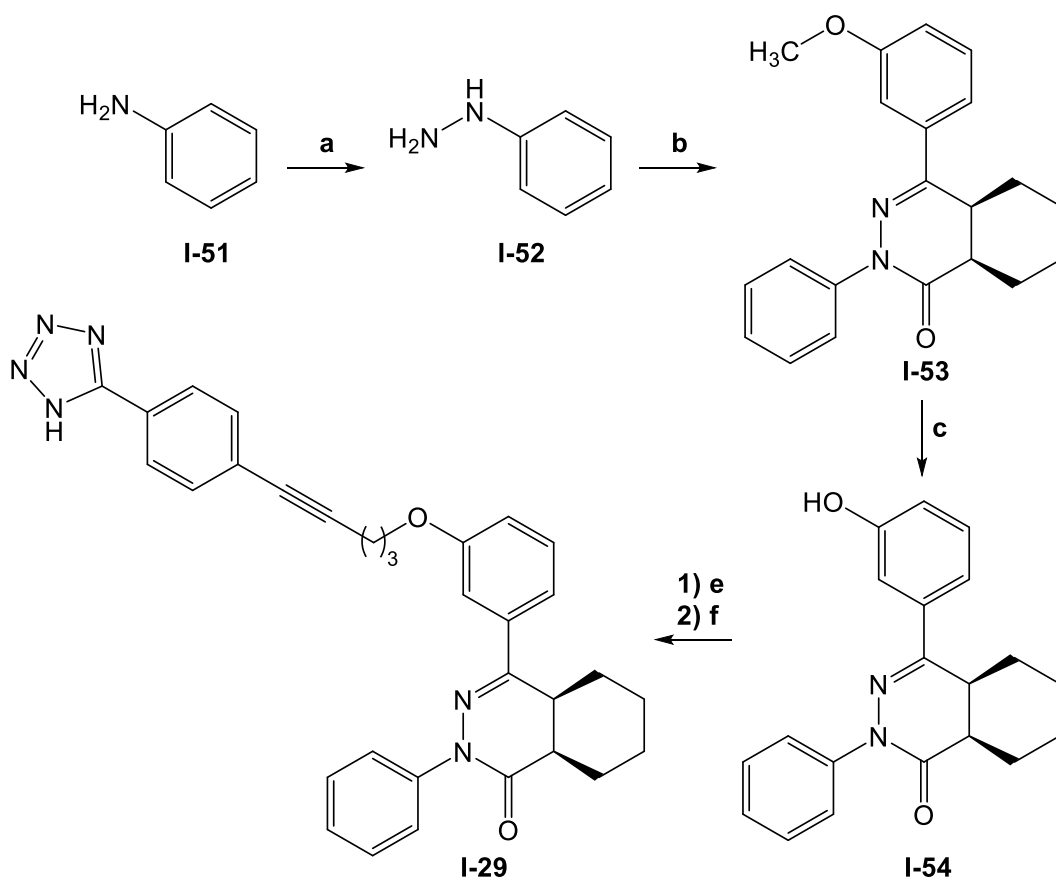
allerdings lediglich über die HPLC-MS mit einer Reinheit >90% nachgewiesen und nicht vollständig charakterisiert. Die Entschützungen der Methoxygruppen wurden mit Bortribromid ( $\text{BBr}_3$ ) bzw. Aluminiumtrichlorid ( $\text{AlCl}_3$ ) als Lewis-Säuren durchgeführt. Das Cycloheptylderivat **I-35** lieferte eine sehr gute Ausbeute von 90%, das Isopropylderivat **I-50** hingegen eine Ausbeute von lediglich 59%. Der letzte Schritt bestand in der Veretherung der Phenole **I-35** und **I-50** mit den zuvor synthetisierten Alkylalkoholen **I-36**, **I-44** und **I-47**. Die Literatur geht hierfür von einer Williamson-Ethersynthese aus, die aufgrund der vorangegangenen Sonogashira-Kupplungen nicht möglich war. Als Alternative wurden in einer Zwei-Schritt-Synthese zunächst die entsprechenden Tosylate der Alkohole **I-36**, **I-44** und **I-47** gebildet, die im zweiten Schritt mit den deprotonierten Phenolen **I-35** und **I-50** umgesetzt wurden.



**Abb. 17:** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) des Pyridazinons **I-22** mit der  $^3\text{J}$ -Kopplung zwischen dem H-15 und dem C-11 (roter Kreis).

Das HMBC-Spektrum zeigt die  $^3J$ -Kopplung (Abb. 17 roter Kreis) der Methylenprotonen zu dem quartären Kohlenstoff des Phenolrings. Dies bestätigt die Bildung des gewünschten Produkts **I-22**, da prinzipiell auch eine Reaktion über das Tetrazol möglich wäre. Die Ausbeuten waren über alle Reaktionen mit 48–65% reproduzierbar, sodass die Gesamtausbeuten der vier Pyridazinone **I-22**, **I-28**, **I-30** und **I-31** über fünf Stufen zwischen 10 und 12% lagen.

Für die Einführung des Benzylrestes an der 2-Position des Diazins wurde zunächst Anilin (**I-51**) über das Diazoniumsalz zum Hydrazin **I-52** umgesetzt (Schema 5).<sup>[135]</sup> Nach Kristallisation mit einer moderaten Ausbeute von 68% wurde dieses mit der 1,4-Ketocarbonsäure **I-40** zum Diazin **I-53** zyklisiert. Analog zur Synthese des Pyridazinons **I-35** wurde das Phenol **I-54** mit einer sehr guten Ausbeute von 97% erhalten. Dieses wurde anschließend in der beschriebenen Zwei-Schritt-Synthese mit einer Ausbeute von 64% über das Tosylat zu dem Tetrazol **I-29** umgesetzt.

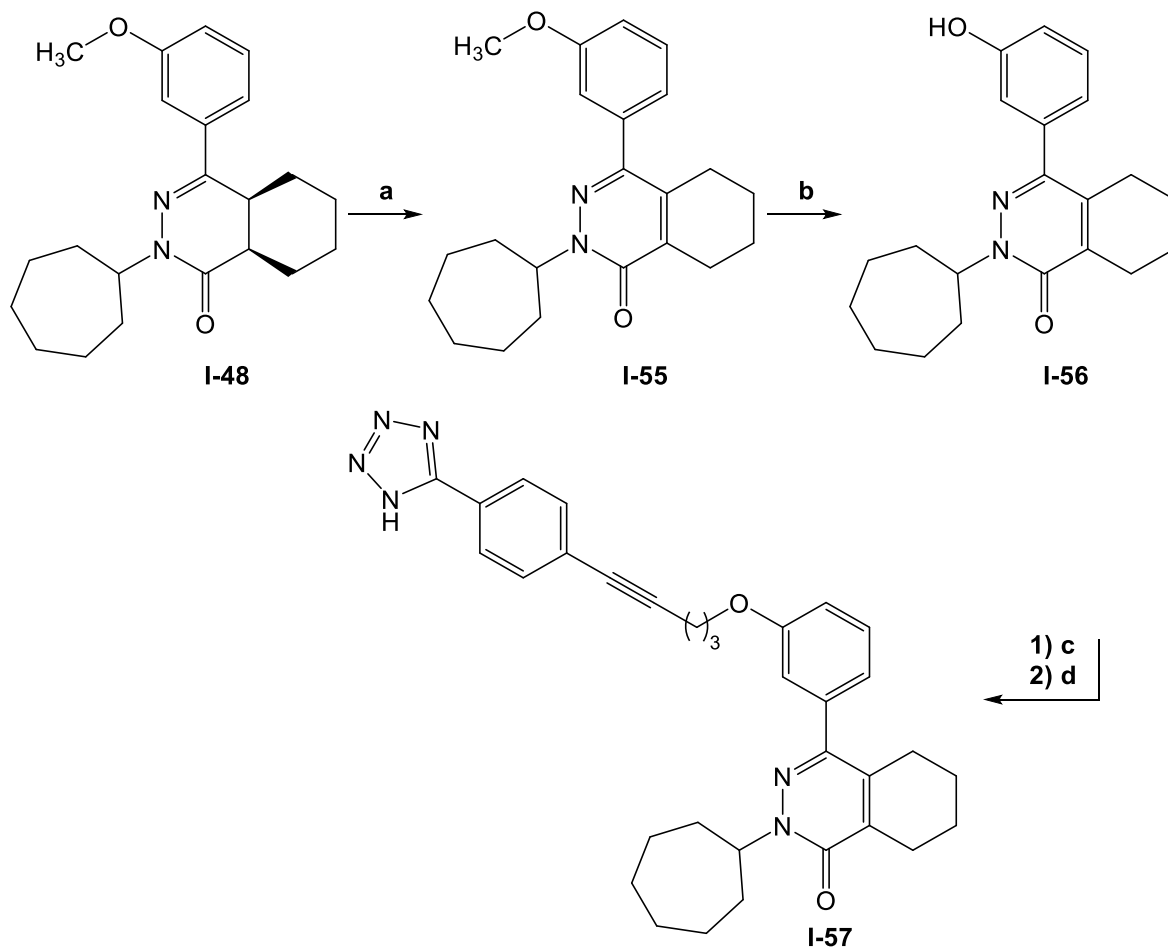


**Schema 5:** Einführung des Phenylrestes ausgehend von Anilin (**I-51**). a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{NaHSO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , RT  $\rightarrow$  50 °C, 17 h; b) **37**, EtOH, Reflux, 12 h, 68%; c)  $\text{AlCl}_3$ , DCM, RT, 17 h, 97%; d) **I-36**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; e) NaH, DMF, RT, 17 h, 64% über zwei Schritte.

Die Bedeutung der beiden Stereozentren wurde durch Einführung einer Doppelbindung an der Position 4a,8a evaluiert. Anfangs wurden für diese Eliminierungsreaktion mit Thionylchlorid in Benzol die sehr harsche Bedingungen nach CSENDE *et al.* genutzt.<sup>[136]</sup>

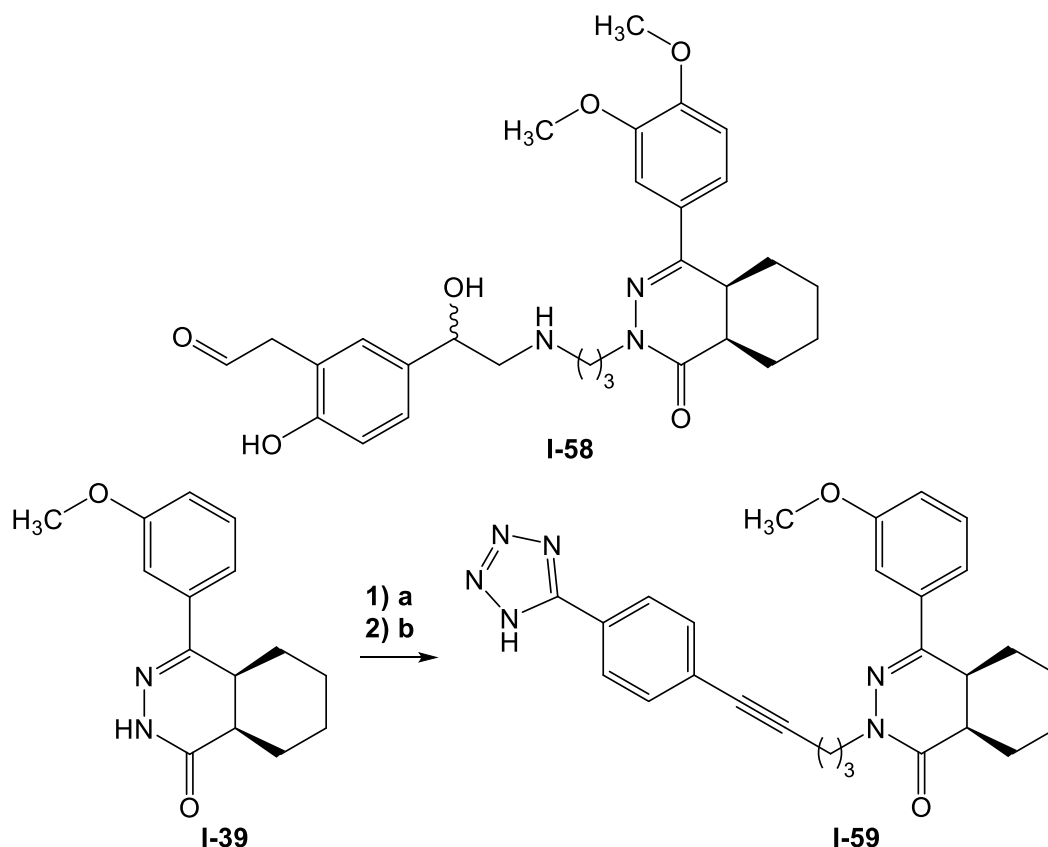
### 3. Ergebnisse und Diskussion

Der Einsatz von  $\text{CuCl}_2$  als Katalysator in Acetonitril sorgte für eine erhebliche Milderung der Reaktionsbedingungen.<sup>[137]</sup> Diese Methode lieferte das achirale Pyridazinon **I-55** mit einer guten Ausbeute von 87% (Schema 6). Das erhaltene Methoxyphenol **I-55** wurde mit  $\text{BBr}_3$  entschützt und das freie Phenol **I-56** mit dem Tetrazol **I-36** verethert. Über fünf Schritte wurde so eine Ausbeute von 12% erhalten. Zusätzlich wurde die Doppelbindung über das freie Phenol **I-35** eingebaut. Die Ausbeute des Produkts **I-56** fiel in diesem Zusammenhang mit 68% allerdings geringer aus.



**Schema 6:** Synthese des achiralen Pyridazinons **I-57**. a)  $\text{CuCl}_2$ , ACN, Reflux, 17 h, 87%; b) c)  $\text{BBr}_3$ , DCM, RT, 17 h, 77%; d) **I-35**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; e) NaH, DMF, RT, 17 h, 71% über zwei Schritte.

Im Zusammenhang mit den eingangs erwähnten PDE4-Inhibitoren wiesen ebenfalls Substanzen, die über den Diazinring erweitert wurden (Schema 7, **I-58**), eine zweistellig nanomolare Aktivität auf.<sup>[138,139]</sup> Gemäß Schema 7 wurde analog zu den Arbeiten von HUANG *et al.* der Alkinphenyltetrazolsubstituent über den Stickstoff an den Diazinring gekoppelt. Das Pyridazinon **I-59** wurde mit einer Ausbeute von 59% über zwei Schritte erhalten.



**Schema 7:** oben: Struktur des von HUANG *et al.* publizierten PDE4-Inhibitors **I-58** unten: Herstellung der Verbindung **I-59**. a) **I-36**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; b) NaH, DMF, RT, 17 h, 59% über zwei Schritte.

Bei der Optimierung von Wirkstoffen ist die Verbesserung der Bindung eines Liganden entscheidend. Wie in Gl. (1) aufgeführt, ist der Logarithmus der Bindungsaffinität ( $K_D$  oder  $K_i$ ) proportional zu der freien Enthalpie ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ).

$$\Delta G_{\text{bind}} = RT \ln K_D \sim RT K_i \quad (1)$$

mit  $R$  = Gaskonstante  
 $T$  = Temperatur  
 $K_D$  = Dissoziationskonstante  
 $K_i$  = Inhibitionskonstante nach Cheng-Prusoff<sup>[140]</sup>

Die Gibbs-Energie ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) ist eine Funktion der Bindungsenthalpie ( $\Delta H_{\text{bind}}$ ) und Bindungsentropie ( $\Delta S_{\text{bind}}$ ), wie die nachstehende Gl. (2) zeigt.

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H_{\text{bind}} - T\Delta S_{\text{bind}} \quad (2)$$

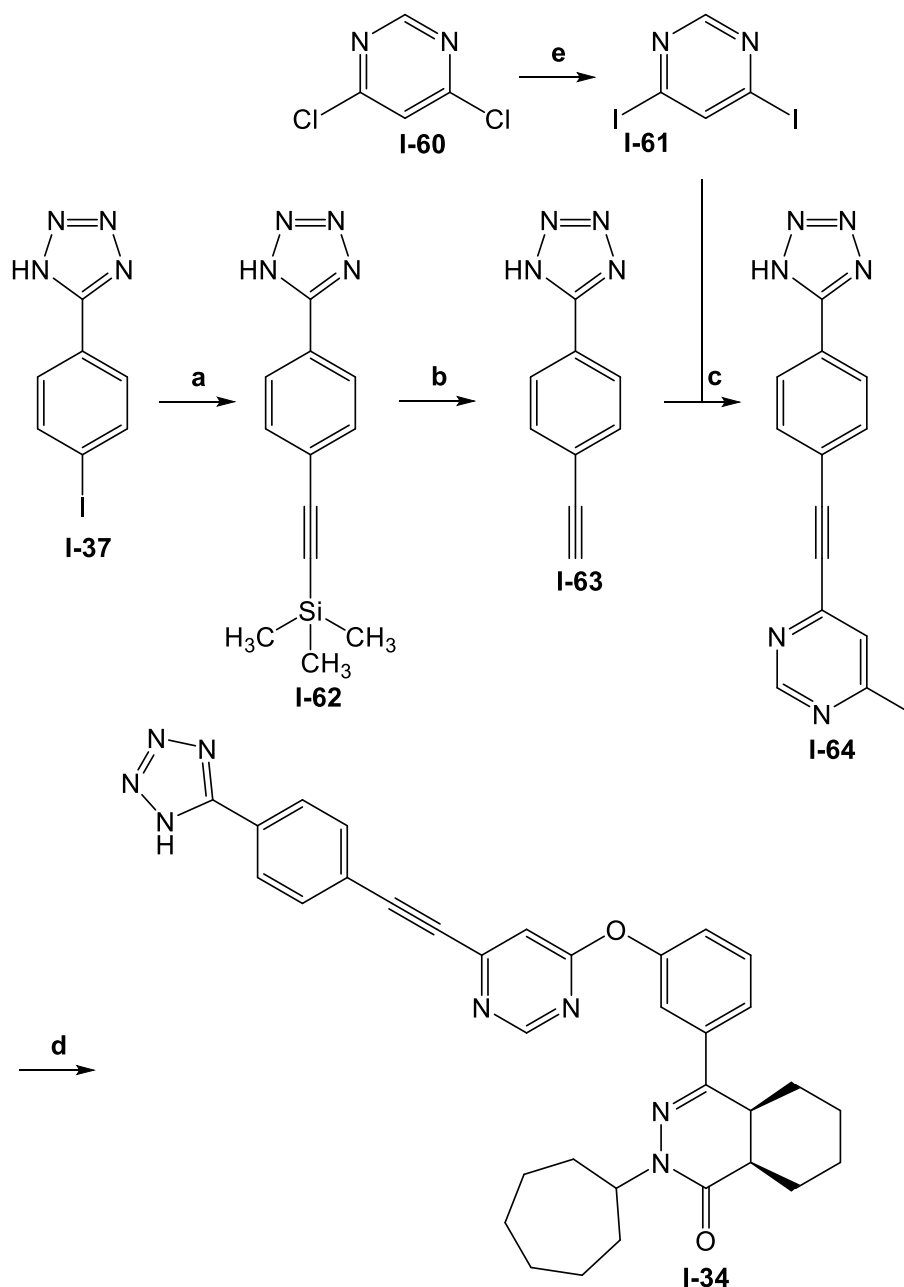
Die Bindung eines Wirkstoffs geht in der Regel mit dem Verlust von Translations-, Rotations- und Konformationsfreiheit einher. Dies führt zu einer Abnahme der Entropie, sodass  $\Delta S_{\text{bind}} < 0$  ist.<sup>[141]</sup> Der negative Beitrag von  $\Delta S_{\text{bind}}$  sorgt dafür, dass der resultierende entropische Term  $-T\Delta S_{\text{bind}}$  als positiver Wert die freie Bindungsenergie ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) erhöht und die Ligandenbindung schwächt. Dieser Effekt wird als entropischer Verlust der Bindung bezeichnet. Die entropiegetriebene Optimierung stellt in der Wirkstoffentwicklung eine etablierte Strategie dar, um die Bindungsaffinität von Liganden

zu erhöhen. Dabei werden die flexiblen Strukturelemente eines Liganden konformationell eingeschränkt. Die Versteifung des Liganden führt zu einer Verringerung der entropischen Strafe  $-T\Delta S_{\text{bind}}$  und hat somit eine günstigere freie Bindungsenergie ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) zur Folge.<sup>[141,142]</sup>

Die frei drehbare Propylkette bietet für die entropiegetriebene Optimierung einen idealen Ausgangspunkt. Mit der Absicht, die freie Drehbarkeit des aliphatischen Linkers einzuschränken, wurde diese über verschiedene Ringsysteme versteift. Außerdem sollten die Ringsysteme für eine höhere Polarität innerhalb des Moleküls sorgen. Damit ein Wirkstoff durch die lipophile Zellmembran dissoziieren und gleichzeitig gut vom Körper resorbiert werden kann, muss die Substanz laut der Lipinski *Rule of 5* eine bestimmte Polarität besitzen.<sup>[143]</sup> Die Verbindung **I-22** weist mit der Diazin- und Tetrazol-Einheit lediglich zwei polare Molekülkomponenten auf und ist damit sehr unpolar. Die eingeführten Ringsysteme sollten somit die Gesamtpolarität zusätzlich erhöhen.

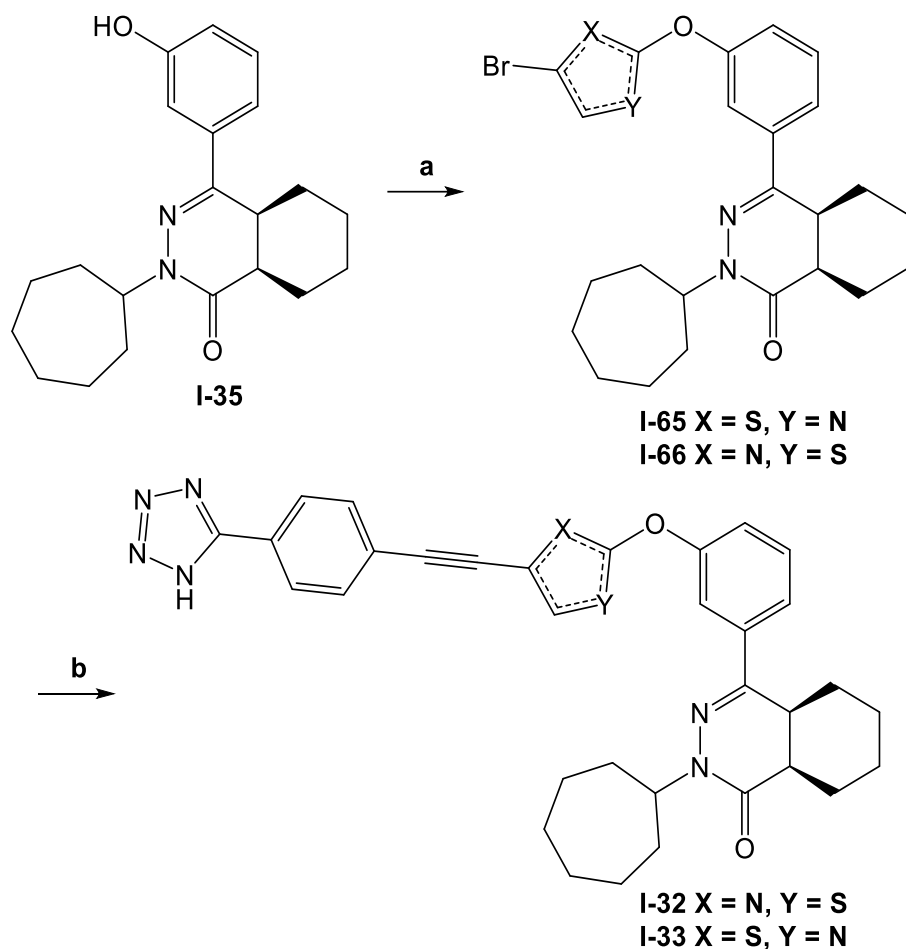
In der zuvor erwähnten Studie von VITAKU *et al.* stellen Thiazole nach den Pyrrolidinen die meistverwendeten Fünfringe der stickstoffhaltigen Heterozyklen dar. Die Einführung von zwei Heteroatomen erhöht die Polarität, sodass sich Thiazole sich für weitere Strukturvariationen anbieten.<sup>[120]</sup> Im Bereich der Sechsringe nehmen Pyrimidine den zweitgrößten Anteil der Heteroaromaten ein. In diesem Zusammenhang sorgt das *meta*-Substitutionsmuster für die gleiche Linkerlänge wie bei der freien Propylkette. Das *p*-Iodphenyltetrazol (**I-37**) wurde zunächst in einer Sonogashira-Reaktion mit Trimethylsilylacetylen zu dem silyl-geschützten Alkin **I-62** umgesetzt, das nachfolgend dann mit TBAF entschützt wurde (Schema 8).

Zwar ist die Umsetzung von Chloriden in einer Sonogashira-Kupplung grundsätzlich möglich, benötigt aber optimierte Bedingungen.<sup>[144]</sup> Aus diesem Grund wurde das entsprechende Diiodid **I-61** mit 69% Ausbeute aus dem Dichlorpyrimidin (**I-60**), NaI und Iodwasserstoff gebildet.<sup>[145]</sup> Das Diiodopyrimidin (**I-61**) wurde nachfolgend in einer Sonogashira-Kupplung mit dem freien Alkin **I-63** zum Iodid **I-64** umgesetzt. Durch eine höhere Verdünnung der Reaktionslösung wurde eine doppelte Alkinierung des Diiodids **I-61** verhindert. In einer nukleophilen aromatischen Substitution wurde anschließend das Iodid **I-64** mit dem Phenol **I-35** zu der Zielsubstanz **I-34** verethert. Über vier Schritte ergab sich eine Gesamtausbeute von 38%.



**Schema 8:** Einbau eines Pyrimidins als Linkereinheit. a)  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCCH}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CuI}$ , Piperidin, Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1),  $85^\circ\text{C}$ , 17 h, 73%; b) 1 M TBAF, DCM, 2 h,  $40^\circ\text{C}$ , 83%; c)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CuI}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1),  $85^\circ\text{C}$ , 17 h, 73%; d) **I-34**,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $80^\circ\text{C}$ , 2 h, 74%; e)  $\text{NaI}$ ,  $\text{HI}$  (57% w/w in  $\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 1 h, 69%.

Die Einführung der Thiazol-Komponente erfolgte in zwei Schritten ausgehend von dem freien Phenol **I-34** (Schema 9). Aufgrund der asymmetrischen Struktur des Thiazols wurden sowohl das 2,4- als auch das 2,5-Derivat synthetisiert. Im ersten Schritt wurde das Phenol **I-34** mit dem jeweiligen Dibromthiazol umgesetzt. Anschließend ergab der Einsatz der Bromide **I-64** und **I-65** in der Sonogashira-Kupplung die disubstituierten Thiazole **I-31** und **I-32** mit sehr guten Ausbeuten von 72% bzw. 66% über zwei Schritte.



**Schema 9:** Herstellung der Thiazolderivate **I-32** und **I-33**. a)  $K_2CO_3$ , 2,4-Dibromthiazol bzw. 2,5-Dibromthiazol, DMSO, 100 °C, 3 h, **I-65** 86%, **I-66** 85%; b) **I-63**,  $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ , CuI,  $K_2CO_3$ , 1,4-Dioxan/ $H_2O$  (99:1), RT, 17 h, **I-32** 84%, **I-33** 78%.

### 3.1.2 Biologische Daten

Die synthetisierten Substanzen wurden von der Firma LDC in verschiedenen biologischen Assaysystemen untersucht. In einem Eingangsassay erfolgte zunächst die Bestimmung der Inhibition des GDP/GTP-Austauschs (NA) für die onkogene G12D-Variante ( $NA^{G12D}$ ) sowie den Wildtyp ( $NA^{wt}$ ). Diese beiden Messungen wurden für alle Substanzen vorgenommen und bilden die Diskussionsgrundlage. Ein Großteil der Substanzen wurde zusätzlich in dem Nukleotidaustauschassay für die G12V-Variante ( $NA^{G12V}$ ) getestet. Im weiteren Verlauf wird der Phosphorylierungsassay pERK für besonders aktive und interessante Verbindungen diskutiert. Dieser Assay quantifiziert die Inhibition der Signaltransduktionskaskade anhand der ERK-Phosphorylierung in den Zelllinien AGSo (G12D-Mutation), H441 (G12V-Mutation) sowie A375 (*wt*).

Zu Beginn der Promotion wurden ausgewählte Verbindungen im NanoBRET-Assay, K-Ras<sup>wt</sup>/SOS-PPI-HTRF-Assay (PPI-HTRF) sowie dem Cell Titer Glow -Assays (CTG) vermessen. Im NanoBRET-Assay wird die Verdrängung der BI-2852-Verbindung **I-15** aus

### 3. Ergebnisse und Diskussion

der SI/II-Bindetasche bestimmt. Der PPI-HTRF-Assay misst die Inhibition des K-Ras/SOS-Komplexes. Mittels Cell Titer Glow -Assays (CTG) wird die Viabilität der Zelllinien AGSo und A375 gemessen. Diese bestimmt die Überlebensrate der Zellen innerhalb einer Zellkultur 72 h nach Zugabe des Inhibitors. Die genauen Durchführungen der einzelnen biologischen Testmethoden von LDC sind im Anhang beschrieben. Die Messergebnisse der Referenzverbindungen BI-2852 (**I-15**, K-Ras<sup>GDP</sup>-Ligand), Bay-293 (SOS-Inhibitor), MRTX1133 (**I-19**, K-Ras-Inhibitor) sowie des Rabbits-Liganden Ch-3 (**I-17**, K-Ras<sup>GTP</sup>-Inhibitor) sind in Tab. 1 aufgeführt.

**Tab. 1:** IC<sub>50</sub>-Werte der NA-, PPI-HTRF-, pERK- und CTG-Assays der Referenzverbindungen.

	<b>BI-2852 (I-15)</b>	<b>Bay-293</b>	<b>MRTX1133 (I-19)</b>	<b>Ch-3 (I-17)</b>
<b>NA<sup>G12D</sup> IC<sub>50</sub> [µM]</b>	17.8 ± 6.01	0.241 ± 0.219	3.79x 10 <sup>-2</sup> ± 5.20x 10 <sup>-3</sup>	>100
<b>NA<sup>wt</sup> IC<sub>50</sub> [µM]</b>	13.4*	0.339*	<0.030	>100
<b>NA<sup>G12V</sup> IC<sub>50</sub> [µM]</b>	10.9*	<0.30	3.45x 10 <sup>-2</sup> ± 1.60x 10 <sup>-3</sup>	n. d.
<b>NanoBRET (G12D) IC<sub>50</sub> [µM]</b>	/	>100	0.203 ± 0.134	>100
<b>PPI-HTRF IC<sub>50</sub> [µM]</b>	7.22*	<1.15	9.29x 10 <sup>-2</sup> ± 1.27x 10 <sup>-2</sup>	>100
<b>pERK AGSo IC<sub>50</sub> [µM]</b>	25.0 ± 5.06	2.53*	<0.46	n. d.
<b>pERK A375 IC<sub>50</sub> [µM]</b>	>100	199 ± 149	0.225 ± 0.148	>100
<b>pERK H441 IC<sub>50</sub> [µM]</b>	15.5*	7.69*	0.295*	n. d.
<b>CTG (G12D) IC<sub>50</sub> [µM]</b>	>30	3.36*	0.967*	8.83*

NA: Nukleotidaustauschassay; CTG: Cell Titer Glow-Assay; PPI-HTRF: K-Ras<sup>wt</sup>/SOS-PPI-HTRF-Assay  
\*Einfachbestimmung

Bis auf Ch-3 (**I-17**) zeigen alle Referenzsubstanzen in den GDP/GTP-Austauschassays der drei Isoformen eine Aktivität. Während MRTX1133 (**I-19**) und Bay-293 den Nukeotidaustausch mit einer zwei- bzw. dreistelligen nanomolaren Konzentration inhibieren, besitzt BI-2852 (**I-15**) mit 17.78 ± 6.011 µM eine Aktivität, die mindestens zwei Größenordnungen höher liegt. Als K-Ras-Inhibitor verdrängt MRTX1133 (**I-19**) den BI-2852-Liganden **I-15** in dem NanoBRET-Assay mit einer IC<sub>50</sub> = 0.203 ± 0.134 µM. Dies ist auf den ersten Blick nicht schlüssig, da MRTX1133 (**I-19**) nicht die gleiche Bindetasche adressiert wie der BI-Ligand. Der Grund könnte in der sehr variablen Form dieses

Bereichs liegen. Neben der Nukleotid-induzierten Konformationsänderung könnte MRTX1133 (**I-19**) als nanomolar-affiner Ligand die Form dieses Bereichs durch seine Bindung an die SII-Stelle beeinflussen und so die Oberflächenstruktur verändern. Bay-293 und Ch-3 (**I-17**) zeigen in diesem Assay keine Aktivität.

Die Inhibition der K-Ras/SOS-Komplexbildung folgt derselben Tendenz wie die Ergebnisse des Nukleotidaustauschs. Die Aktivität von MRTX1133 (**I-19**) liegt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.225 \pm 0.148 \mu\text{M}$  ebenfalls um mindestens eine Größenordnung höher. In den pERK-Downstream-Kaskaden der G12D- sowie G12V-mutierten Zelllinien AGSo bzw. H441 ist derselbe Trend wie in den  $NA^{G12D}$ - und  $NA^{G12V}$ -Messergebnissen zu beobachten (Tab. 1). In der nicht mutierten Zelllinie A375 besitzt lediglich MRTX1133 (**I-19**) eine dreistellig nanomolare Aktivität, während die zwei verbleibenden Substanzen nicht aktiv sind. Der Rabbits-Inhibitor Ch-3 (**I-17**) weist ausschließlich in dem Cell Titer Glow -Assay eine Aktivität von  $IC_{50} = 8.83 \mu\text{M}$  auf.

Die Daten der synthetisierten (lila) und von LDC bereitgestellten (grün) Verbindungen (Abb. 18) sind in Tab. 2 aufgelistet. Bemerkenswerterweise besitzen mit den Verbindungen **I-36**, **I-31**, **I-30**, **I-48**, **I-69** und **I-69** lediglich sechs der Substanzen keine Aktivität in dem GDP/GTP-Austauschassay. Darunter finden sich mit dem tertiären Amin **I-30**, dem Methyltetrazolid **I-29** und der Säure **I-69** drei Verbindungen, die an der Phenyleinheit abgeändert wurden. Das methylierte Derivat **I-30** belegt, dass das azide Proton des Tetrazols für die biologische Aktivität essenziell ist. Die fehlende Aktivität der Zwischenprodukte **I-36** und **I-48** als pharmakophore Einheiten des Pyridazinons **I-22** deutet auf eine synergistische Wirkung beider Molekülkomponenten hin.

Gleichermaßen verhält es sich bei der Versteifung der frei drehbaren Propyleinheit über ein Ringsystem. Die beiden Thiazolderivate (**I-32**, **I-33**) inhibieren den Nukleotidaustausch mit  $IC_{50}$ -Werten von  $14.1 \pm 3.21 \mu\text{M}$  (**I-32**) sowie  $15.5 \pm 5.35 \mu\text{M}$  (**I-33**), die etwas schwächer sind als das Tetrazol **I-22**. Das Pyrimidin- (**I-34**) zeigt eine Aktivität von  $6.30 \mu\text{M}$  (**I-34**) und liegt damit in demselben Bereich der Verbindung **I-22** (Tab. 2) Die Eliminierung der Stereozentren (**I-57**) sowie die Kupplung des Propyl-Linkers an die 2-Position des Diazinrings (**I-59**) haben ebenfalls einen geringfügigen Einfluss auf die Inhibition des GDP/GTP-Austauschassays (Tab. 2). Beide Aktivitäten sind mit  $9.26 \pm 6.60 \mu\text{M}$  (**I-57**) und  $14.1 \pm 4.42 \mu\text{M}$  (**I-59**) etwas höher als bei der Verbindung **I-22**.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 2:** IC<sub>50</sub>-Werte der in Abb. 18 aufgeführten Substanzen für die NA- und PPI-HTRF-Assays (lila = eigens synthetisierte Verbindungen; grün = LDC-Derivate).

	NA <sup>G12D</sup> IC <sub>50</sub> [µM]	NA <sup>wt</sup> IC <sub>50</sub> [µM]	NA <sup>G12V</sup> IC <sub>50</sub> [µM]	PPI-HTRF IC <sub>50</sub> [µM]
<b>I-36</b>	>100	>100	n. d.	n. d.
<b>I-48</b>	>100	>100	n. d.	n. d.
<b>I-31</b>	>100	>100	n. d.	n. d.
<b>I-22</b>	3.53 ± 1.71	4.58 ± 1.12	3.86*	>30
<b>I-57</b>	9.26 ± 6.60	6.01 ± 1.69	4.74*	>5
<b>I-30</b>	>100	>100	n. d.	n. d.
<b>I-29</b>	16.6 ± 6.46	16.8 ± 4.73	n. d.	>30
<b>I-28</b>	7.97 ± 1.66	40.3 ± 20.4	n. d.	>30
<b>I-59</b>	14.1 ± 4.42	13.9 ± 7.06	n. d.	>30
<b>I-32</b>	14.1 ± 3.21	14.1 ± 1.13	n. d.	24.9 ± 0.58
<b>I-33</b>	15.5 ± 5.35	16.0 ± 5.86	n. d.	>30
<b>I-34</b>	6.30*	7.51*	n. d.	>30
<b>I-67</b>	6.03 ± 0.800	35.7*	6.08*	16.0*
<b>I-68</b>	>100	>100	>100	n. d.
<b>I-69</b>	>100	76.1*	n. d.	n. d.
<b>I-70</b>	9.30 ± 2.87	72.7*	6.86*	21.2*
<b>I-71</b>	7.36 ± 3.69	57.4*	39.8*	15.0*
<b>I-72</b>	9.73 ± 3.78	10.1*	31.9*	>30
<b>I-73</b>	7.57*	3.18*	44.5*	>30
<b>I-74</b>	16.4*	6.76*	>300	n. d.
<b>I-75</b>	89.9*	134*	228*	n. d.

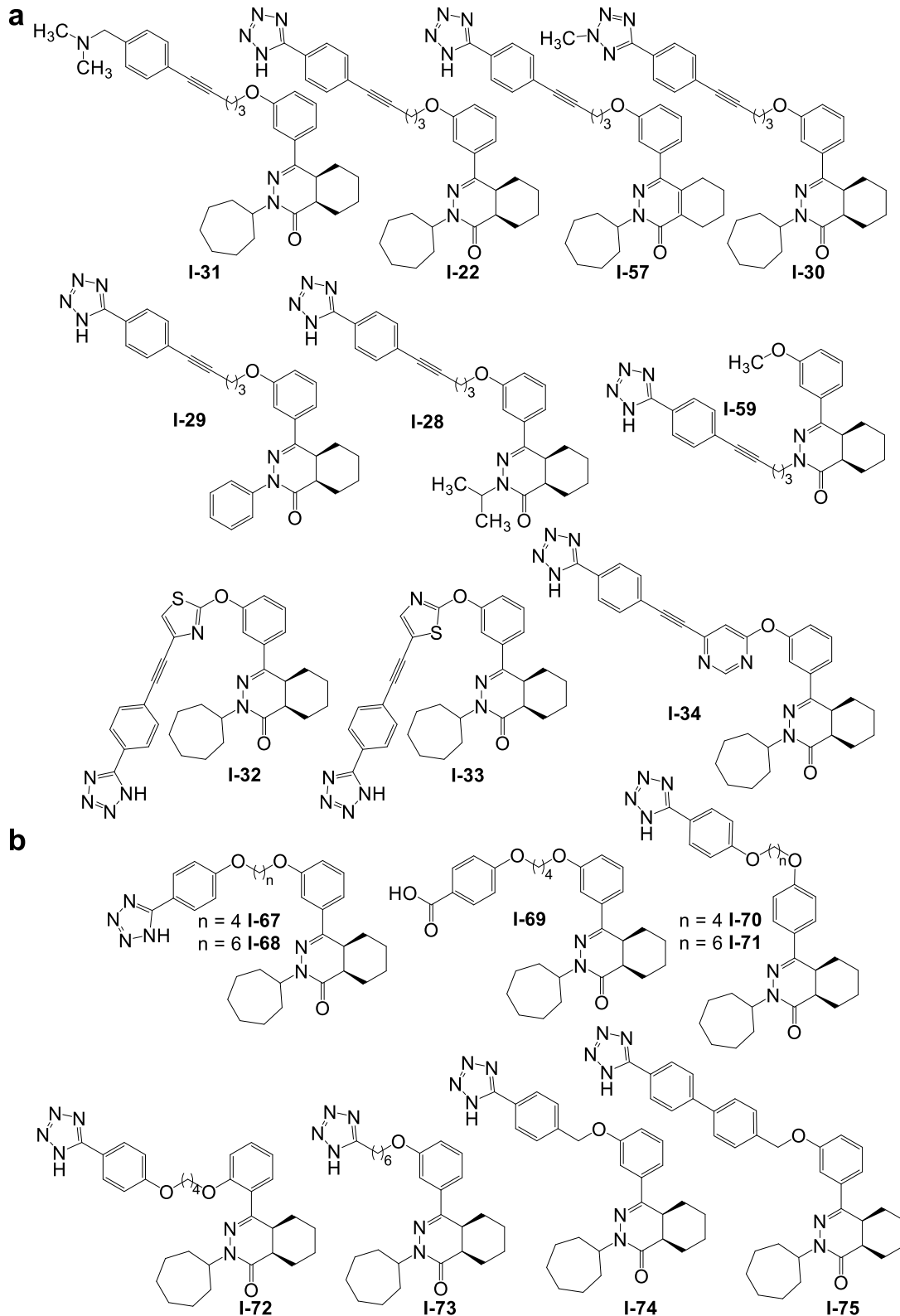
NA: Nukleotidaustauschassay; PPI-HTRF: K-Ras<sup>wt</sup>/SOS-PPI-HTRF-Assay; \*Einfachbestimmung

Die Substitution des Cycloheptylrings durch einen Phenylring (**I-29**) und einen Isopropylrest (**I-28**) führt zu einem geringen Aktivitätsverlust (Tab. 2). Die Substanzen inhibieren den Nukleotidaustausch der G12D-Variante mit IC<sub>50</sub>-Werten von 16.6 ± 6.46 µM (**I-29**) bzw. 7.97 ± 1.66 µM (**I-28**).

Während das Tetrazol **I-67** mit azidem Proton mit einem IC<sub>50</sub> = 6.03 µM eine gute Inhibition des Nukleotidaustauschs aufweist, ist die entsprechende Carbonsäure **I-69** mit einem IC<sub>50</sub> = >100 µM inaktiv (Tab. 2). Auch andere Substituenten, wie bspw. ein Imidazol

### 3. Ergebnisse und Diskussion

oder ein Amid, die hier nicht aufgeführt sind, zeigen im Nukleotidaustausch keine Aktivität. Auf Grundlage der biologischen Daten der Substanzen **I-22**, **I-30**, **I-31**, **I-67** und **I-69** konnte das Tetrazol als Pharmakophor identifiziert werden, sodass dieses im weiteren Verlauf der Promotion beibehalten wurde.

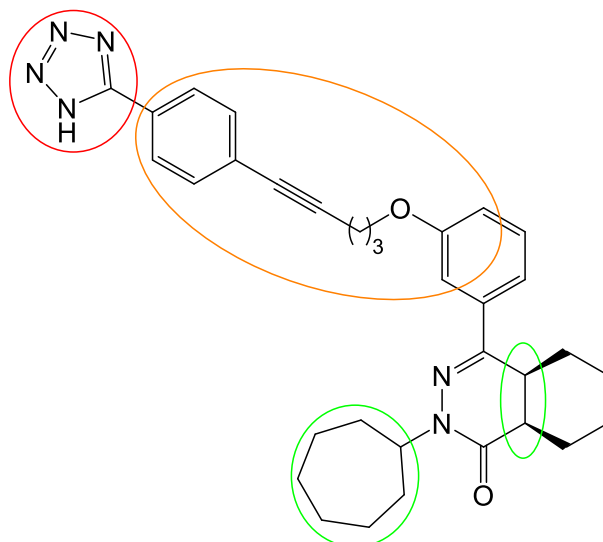


**Abb. 18:** a) Synthetisierte und b) von LDC bereitgestellte Substanzen der Pyridazinone.

Der Linker zwischen Scaffold und Tetrazol lässt bei dem *meta*-Substitutionsmuster keine Verlängerung der Kohlenstoffkette von vier auf sechs Kohlenstoffatome zu. Im Gegensatz zur Substanz **I-67** ist das Derivat **I-68** im Nukleotidaustausch aller K-Ras-Varianten inaktiv. Wird in diesem Zusammenhang allerdings das Phenyltetrazol zu einem Alkyltetrazol umgeformt und die Kettenlänge von sechs beibehalten, wie bei der Verbindung **I-73**, kommt es nicht zum Verlust der Inhibitionsfähigkeit ( $IC_{50} (NA^{G12D}) = 9.73 \pm 3.78 \mu M$ ). Die Aktivität des GDP/GTP-Austausch der G12V-Variante wird in diesem Zusammenhang jedoch um ca. das 7-fache erniedrigt ( $IC_{50} (NA^{G12D}) = 44.5 \mu M$ ).

Die unterschiedlichen Substitutionsmuster der Verbindungen **I-67**, **I-70** und **I-72** haben keinen Einfluss auf die Aktivität im GDP/GTP-Austausch, unabhängig davon, ob sich der Linker in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Stellung befindet (Tab. 2). In der *para*-Stellung ist in diesem Zusammenhang eine Verlängerung der Kohlenstoffkette auf sechs Atome möglich (**I-71**). Diese Derivatisierung führt in der *meta*-Substitution zum vollständigen Verlust der Inhibitionsfähigkeit. Bemerkenswerterweise führt die *para*-Substitution als einzige Derivatisierung dazu, dass die Verbindung **I-70** den Nukleotidaustausch der onkogenen G12D- und G12V-Varianten selektiver hemmt. Die Substanz **I-71** mit einer Kettenlänge von sechs Kohlenstoffen besitzt darüber hinaus eine selektivere Inhibition des Nukleotidaustauschs der G12D-Mutanten gegenüber der G12V-Mutante. Beide *para*-substituierten Verbindungen zeigen bei der G12D-Mutante eine 8-fach höhere Inhibition im Vergleich zum Wildtyp.

Das Entfernen des Linkers bei der Verbindung **I-74** hat keine Auswirkungen auf die Inhibition der G12D- und *wt*-Variante. Allerdings ist die Substanz bei der G12V-Variante inaktiv. Auch die Versteifung des Linkers durch den Einbau eines Biphenyl-Restes (**I-75**) führt zu einer Erniedrigung der Aktivität um zwei Größenordnungen. Aus diesen Messergebnissen können kaum Schlüsse auf den Einfluss des Spacers gezogen werden. Lediglich eine Verlängerung des Linkers bei dem *meta*-Substitutionsmuster hat eine drastische Auswirkung auf die Aktivität, während eine Verkürzung oder Versteifung die Aktivität kaum beeinflussen. Die Abb. 19 fasst die Molekülkomponenten und deren Einfluss auf die biologische Wirkung zusammen.



**Abb. 19:** Schematische Darstellung der derivatisierten Komponenten des Pyridazinons **I-22** und die Auswirkungen auf die Aktivität im NA-Assay (grün = variabel, orange = teilw. variabel, rot = nicht variabel).

Aus den Ergebnissen des PPI-HTRF-Assays wird ersichtlich, dass von den synthetisierten Verbindungen ausschließlich das Thiazol **I-32** die Bildung des K-Ras/SOS-Komplexes verhindert (Tab. 2). Daraus folgt, dass sich bei allen anderen Verbindungen zwar der Ras/SOS-Komplex bildet, dieser allerdings inaktiv ist. Ursächlich für den inhibierten Nukleotidaustausch könnte die Bindung der Liganden am Ras/SOS-Komplex sein. Die Inhibitoren stabilisieren den K-Ras<sup>GDP</sup>/SOS-Komplex und sorgen bspw. durch konformationelle Veränderungen der Ras-Oberfläche dafür, dass der GDP/GTP-Austausch gehemmt ist.

Die PPI-Daten der LDC-Verbindungen zeigen kein einheitliches Bild. Das *ortho*-substituierte Phenylpyridazinon **I-72** sowie das Alkyltetrazol **I-73** hemmen die Komplexbildung nicht (Tab. 2). Dagegen weisen die beiden *para*-substituierten Phenylpyridazinone **I-70** und **I-71** sowie das *meta*-substituierte Phenylpyridazinon **I-67** eine schwache Aktivität im Bereich von 15–21  $\mu\text{M}$  auf.

Im weiteren Verlauf wird eine mögliche Wirkungsweise analog zu dem BI-Inhibitor **I-15** anhand des zellulären NanoBRET-Assays der K-Ras<sup>G12D</sup>-Variante diskutiert (Tab. 3). Fünf Substanzen können die BI-Verbindung **I-15** aus der SI/II-Bindetasche verdrängen, während die übrigen fünf Substanzen dazu nicht in der Lage sind. Die Verbindung **I-70** ist die einzige Substanz, die diese Verdrängung mit 6.30  $\mu\text{M}$  bereits in einstellig mikromolaren Konzentrationen induziert.

Bei den Thiazolen **I-32** und **I-33** hat das Substitutionsmuster Auswirkungen auf die Aktivität im Verdrängungsassay. Der 2,4-substituierte Ring (**I-32**) besitzt einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $15.3 \pm 5.50 \mu\text{M}$ , während die 2,5-Substitution (**I-33**) inaktiv ist.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3:** IC<sub>50</sub>-Werte der zellulären Assays (lila = eigens synthetisierte Verbindungen; grün = LDC-Derivate).

	NanoBRET (G12D) IC <sub>50</sub> [µM]	pERK AGSo IC <sub>50</sub> [µM]	pERK A375 IC <sub>50</sub> [µM]	CTG AGSo IC <sub>50</sub> [µM]	CTG A375 IC <sub>50</sub> [µM]
<b>I-22</b>	>30	16.9*	>30	3.14*	n. d.
<b>I-28</b>	>30	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>I-29</b>	23.1 ± 6.29	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>I-32</b>	15.3 ± 5.50	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>I-33</b>	>30	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>I-34</b>	>30	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>I-67</b>	22.6*	>30	>30	22.9*	22.8*
<b>I-70</b>	6.30*	>30	>30	9.46*	17.2*
<b>I-72</b>	>30	>30	>30	24.6*	>30
<b>I-73</b>	14.5*	>30	>30	17.0*	>30

CTG: Cell Titer Glow-Assay; pERK: ERK-Phosphorylierungsassay; \*Einfachbestimmung

Das Alkyltetrazol **I-73** ist nicht in der Lage, die Komplexbildung zwischen Ras und SOS zu verhindern, verdrängt allerdings die BI-Verbindung **I-15**. Der Diether **I-67** weist ebenfalls eine Aktivität im NanoBRET-Assay auf, während die bioisostere Dreifachbindung als Linker inaktiv ist. Diese Daten in Kombination mit den Ergebnissen der Inhibition der Ras/SOS-Komplexbildung lassen große Interpretationsspielräume im Hinblick auf den Wirkmechanismus zu. Die Wirkung als SOS-Inhibitor kann ausgeschlossen werden, da es keine Substanz gibt, die Ras/SOS-Komplexbildung hemmt, ohne im NanoBRET-Assay aktiv zu sein. Zudem kann eine Wirkungsweise an Ras<sup>GTP</sup> analog zu dem Rabbits-Inhibitor Ch-3 (**I-17**) ausgeschlossen werden, da dieser ausschließlich in den Zellassays aktiv ist. Diese Aktivitätsprofile wurden bei keiner der Testsubstanzen beobachtet.

In den biologischen Testungen der pERK-Downstream-Kaskade besitzt das Alkylphenyltetrazol **I-22** als einziges der fünf Derivate eine Aktivität. Diese Aktivität ist selektiv gegen die G12D-Variante, während die Verbindung **I-22** in den Messungen des Wildtyps inaktiv ist. Alle LDC-Derivate sind in den Testungen beider K-Ras-Varianten inaktiv. In den CTG der onkogenen G12D-Variante hingegen zeigen alle fünf Pyridazinone eine Aktivität. Mit 3.14 µM ist diese bei dem Derivat **I-22** am höchsten. Aufgrund der fehlenden Daten der Substanz **I-22** für den Wildtyp kann keine Aussage über die Selektivität getroffen werden. Mit den Verbindungen **I-67** und **I-70** besitzen zwei

Substanzen die gleiche Inhibitionsfähigkeit für den CTG-Assay der G12D-Varante und des Wildtyps. Im Gegensatz dazu sind die Substanzen **I-72** und **I-73** bei dem Wildtyp inaktiv. Da alle in Tab. 3 aufgeführten Assays zellulärer Natur sind, können ADME-bedingte Phänomene die beobachtete biologische Aktivität überlagern und eine klare und offensichtliche SAR verhindern.

Aus den vorliegenden biologischen Daten können folgende Hypothesen für den Bindungsmodus aufgestellt werden. Substanzen wie **I-32**, die sowohl im NanoBRET- als auch im PPI-Assay wirksam sind, können über die Bindung an der SI/II-Bindestelle analog zu der BI-Verbindung **I-15** die Bildung des Ras/SOS-Komplexes verhindern. Alternativ ist eine Aktivität analog zu MRTX-1133 (**I-19**) durch die Bindung an die SII-Bindetasche denkbar. In diesem Fall müssen die Substanzen durch die Bindung eine Konformationsänderung der SI/II-Seite des Proteins induzieren, sodass der BI-Ligand aus der Bindestelle verdrängt wird. Für Substanzen wie das Tetrazol **I-22**, das weder die BI-Verbindung **I-15** aus der SI/II-Bindetasche verdrängt noch die Bildung des Ras/Komplexes im PPI-Assay verhindert, ist ein Wirkmechanismus über die Bindung am Ras/SOS-Komplex möglich.

Da die Substanzklasse der Pyridazinone als PDE-Inhibitoren identifiziert wurden, ist es zusätzlich denkbar, dass die oben diskutierten Verbindungen die Phosphodiesterase hemmen. Eine derartige Wirkung betreffe allerdings lediglich die Verbindungen, die in den zellulären NanoBRET-, pERK- und CTG-Assays aktiv sind. Aufgrund der im Hinblick auf die Wirkungsweise nicht eindeutigen biologischen Daten sollten die aufgestellten Wirkungshypothesen im weiteren Verlauf über das Molecular Modeling untersucht werden.

#### **3.1.3 *In silico*-Analyse des Bindungsmodus**

Da in den biologischen Daten der synthetisierten Substanzen keine eindeutigen Tendenzen wie bei den Referenzsubstanzen zu beobachten sind, wurden die möglichen Bindungsmodi über das Molecular Modeling systematisch untersucht. Alle Berechnungen wurden mit dem Molecular-Modeling-Paket der Firma *Schrödinger* Version 11.5 durchgeführt. Zunächst wurde die allosterische K-Ras-Inhibition analog zum BI-2852- (**I-15**), MRTX1133- (**I-19**) und Rabbits-Inhibitor Ch-3 (**I-17**) in Betracht gezogen. Hierfür wurden *in silico*-Screenings der im Nukleotidaustausch aktiven Substanzen auf die Kristallstrukturen 6ZL5 (BI-2852 als Ligand), 6GQY (Ch-3 als Ligand) und 7RPZ (MRTX1133 als Ligand) durchgeführt. Während 6ZL5 und 7RPZ GDP-gebundene K-Ras-

Strukturen sind, liegt die 6GQY-Kristallstruktur GTP-gebunden vor. Den ersten Schritt bildete das Aufstellen des korrekten *in silico*-Modells für jede der Referenzsubstanzen, sodass die berechneten Posen mit denen der Liganden in den Kristallstrukturen übereinstimmen. Auf diese Modelle wurden im Folgenden die Docking Studien der Pyridazinone durchgeführt.

Im zweiten Teil der Bindungsuntersuchungen wurde die Wirkungsweise an dem Ras/SOS-Komplex untersucht. Innerhalb dieser Studie wurden über das SiteMap-Modul mögliche Bindetaschen des Ras/SOS-Interface identifiziert. Zusätzlich wurde eine Moleküldynamiksimulation mit dem Pyridazinon **I-22** als magnesiumkomplexierender Inhibitor in der Kristallstruktur 7KFZ durchgeführt.

Den Abschluss der *in silico*-Studien zu den Pyridazinonen bildeten Docking Studien auf Kristallstrukturen der PDE, um mögliche *off target*-Effekte in den zellulären Assays zu untersuchen.

#### 3.1.3.1 Molecular Modeling am Ras-Protein

Für die Erörterung des Wirkmechanismus als allosterischer Inhibitor wurden im ersten Schritt die Substanzen in das Schrödinger Glide-Modul importiert und über die Funktion *LigPrep* bearbeitet. Diese Funktion bereitet die Substanzen für die Docking-Studien vor, indem aus den zweidimensionalen Strukturen dreidimensionale generiert werden. Innerhalb eines definierten pH-Bereichs ( $7 \pm x$ ) erzeugt das Tool Epik die verschiedenen Protonierungszustände sowie Tautomere (bspw. Keto-Enol-Formen). Bei nicht definierten Stereozentren werden zusätzlich die Isomere gebildet. Außerdem werden Gegenionen (bspw. Halogenide) aus Salzen entfernt und die 3D-Geometrie über das ausgewählte Kraftfeld (OPLS\_2005) optimiert.

Daraufhin wurden die Kristallstrukturen in den *Protein Preparation Wizard* geladen und bearbeitet. Das Programm fügt in den ausgewählten pdb-Dateien fehlende Loops, Aminosäureketten und Disulfidbrücken ein. Analog zu der *LigPrep*-Funktion werden fehlende Wasserstoffe innerhalb eines definierten pH-Bereichs ergänzt oder entfernt und Bindungszustände von Metallen korrigiert. Polare Aminosäurereste werden neu ausgerichtet, um Ladungsüberlappungen zu vermeiden. Darüber hinaus entfernt die Funktion Wassermoleküle, die einen bestimmten Abstand zu Heteroatomen des Proteins überschreiten (5 Å) oder eine unzureichende Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen

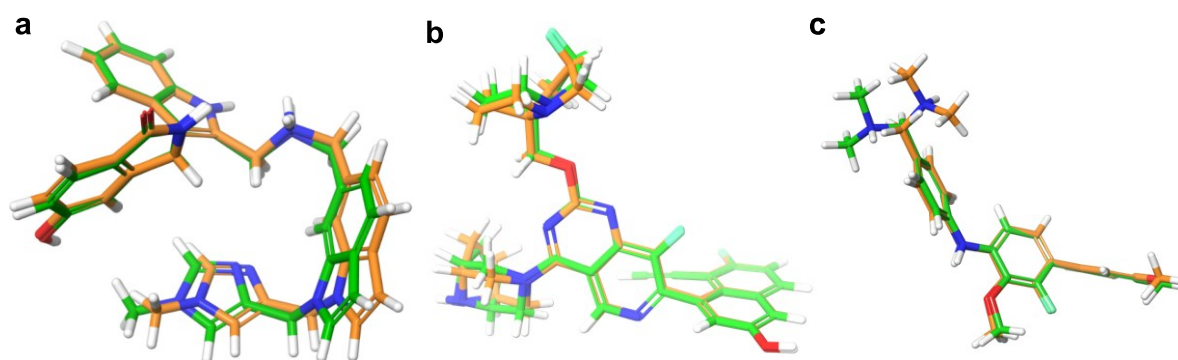
zu Nicht-Wassermolekülen besitzen. Im letzten Schritt des *Protein Preparation Wizards* wird die Geometrie über das OPLS\_2005 Kraftfeld optimiert.

Mit Hilfe der *Receptor Grid Generation* wurde eine virtuelle Box im Bereich der Bindungsregion der Kristallstruktur erzeugt. Dazu wird eingangs das Zentrum der Bindungsregion ausgewählt und zwei bestimmte Abstände definiert. Als Zentrum können entweder kristallisierte sowie berechnete Liganden oder, bspw. bei Apoproteinen, eigens ausgewählte Aminosäurereste oder berechnete Bindestellen (bspw. durch *SiteMap*) des Proteins ausgewählt werden. Eine „äußere“ Box definiert den maximalen räumlichen Bereich, den der Ligand einnehmen darf. Die „innere“ Box beschreibt das Ligandenzentrum. Während einige Reste des Liganden aus der inneren Box herausragen dürfen, müssen alle Atome innerhalb der äußeren Box liegen. Die Größe beider Boxen ist stark abhängig von den ausgewählten Ligandstrukturen. Über die Proteinstruktur der äußeren Box wird ein dreidimensionales Kraftfeldraaster (*grid*) gelegt. Dieses beinhaltet die elektrostatischen Potenziale und Van-der-Waals-Kräfte der Oberfläche sowie hydrophobe und hydrophile Areale des Proteinbereichs. Innerhalb der *Receptor Grid Generation* wurden alle Hydroxygruppen frei drehbar gehalten. Das erstellte *Grid* dient als Grundlage für das abschließende *Ligand Docking*. Es ersetzt dabei die Kristallstruktur des Proteins, wodurch der Rechenprozess der Ligand-Protein-Wechselwirkung signifikant beschleunigt wird.

Den ersten Schritt des *Ligand Dockings* bildet die Berechnung verschiedener Rotamere des Liganden. Die Konformere werden mit diversen Orientierungen in die Bindetasche des rigiden Grids gelegt (*rigid docking*). Das Zentrum des Liganden wird innerhalb der inneren Box platziert und die Koordinaten leicht verschoben. Nacheinander wird der Ligand in mehreren Winkeln um die eigene Achse und das Zentrum rotiert. Die auftretenden energetischen Wechselwirkungen (H-Brücken,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, etc.) der einzelnen Posen zu den Gridpunkten werden mit einem Punktesystem bewertet. Zusätzlich werden Punkte für die Desolvatation, die sterische Ausrichtung, die Torsion und die Flexibilität des Liganden vergeben. Abzüge für den Bindungsmodus erhält eine Pose bei verzerrten Geometrien. Am Ende ergeben die einzelnen Bewertungen einen Docking Score (DS). Je niedriger dieser ist, je größer also der negative Zahlenwert ist, desto günstiger sind die auftretenden Protein-Ligand-Wechselwirkungen sowie Geometrien und desto weniger Abzüge erhält die Pose des Liganden aufgrund von sterischen Hinderungen oder fixierten rotierbaren Bindungen. Des Weiteren besitzen Liganden mit günstigem DS wenige bzw. keine polaren funktionellen Gruppen, die dem

Lösungsmittel exponiert sind. Der DS entspricht der freien Bindungsenthalpie ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ), trägt demzufolge in der Regel ein negatives Vorzeichen und besitzt die Einheit kcal/mol. Die Anzahl der einbezogenen Posen wird im Vorfeld festgelegt. Für den SP-Lauf wurden jeweils zehn Posen pro Liganden gewählt, beim XP-Lauf waren es jeweils 100.<sup>[146,147]</sup>

Bei der Suche nach den korrekten Einstellungen für die Abbildung der Liganden der Kristallstrukturen, wurden diese zunächst mit der LigPrep-Funktion vorbereitet. Dafür wurden anfangs die Standardeinstellungen gewählt ( $\text{pH} = 7 \pm 1$ ). Bei der Vorbereitung mit der *Protein Preparation Wizard* wurde ebenfalls die Einstellung  $\text{pH} = 7 \pm 1$  gewählt. Für das *Receptor Grid* wurde das Zentrum in den kristallisierten Liganden gelegt und die Kantenlänge der inneren Box auf  $l = 10 \text{ \AA}$  sowie der äußeren Box auf  $l = 20 \text{ \AA}$  gesetzt. Nach dem *Ligand Docking* wurden die berechnete Pose (grün) und die Pose der Kristallstruktur (orange) superpositioniert. Im Fall des BI-Liganden **I-15** und des Rabbits-Liganden **I-17** wurde mit den Standardeinstellungen eine sehr gute Übereinstimmung beider Strukturen erhalten (Abb. 20). Hierbei besaß BI-2852 (**I-15**) einen DS von  $-7.19 \text{ kcal/mol}$  und Ch-3 (**I-17**) einen DS von  $-6.59 \text{ kcal/mol}$  (Tab. 4). Der DS der BI-Verbindung **I-15** weist auf eine gute Affinität des Liganden für SI/II-Bindetasche hin, die mit den biochemischen Ergebnissen des Nukleotidaustauschassays übereinstimmt. Bei der Verbindung **I-17** kann keine Parallele zwischen den biochemischen Ergebnissen und dem Docking Score gezogen werden, da der  $\text{Ras}^{\text{GTP}}$ -Ligand **I-17** lediglich in den zellulären Assays aktiv ist. Im Allgemeinen besitzen die „realen“ Konformationen der berechneten Liganden bei der Erstellung der Bindungsmodelle nicht immer den niedrigsten DS.



**Abb. 20:** Superposition der gedockten Referenzstrukturen (grün) mit den Liganden aus den Kristallstrukturen (orange): a) **BI-2852** (6ZL5) b) **MRTX1133** (7RPZ) c) **Ch-3** (6GQY).

Für die Kristallstruktur 7RPZ mit dem MRTX1133-Liganden **I-19** wurde mit den Standardeinstellungen keine hinreichende Superposition erhalten. Erst die Erweiterung des pH-Bereichs auf  $7 \pm 2$  und einem Abstand der Wassermoleküle von  $4 \text{ \AA}$  mit weniger

### 3. Ergebnisse und Diskussion

als zwei H-Brücken zu Nicht-Wassermolekülen lieferte die Pose der Kristallstruktur ohne große Abweichungen (Abb. 20b). Die berechnete Pose der Verbindung **I-19** besitzt einen DS von -11.7 kcal/mol, der die ausgesprochene K-Ras-Affinität im GDP/GTP-Austauschassay widerspiegelt (Tab. 4).<sup>[148]</sup>

Im Anschluss wurden Docking-Studien mit den synthetisierten- und LDC-Verbindungen auf die drei diskutierten Kristallstrukturen durchgeführt (Tab. 4).

**Tab. 4:** Docking-Ergebnisse der im NA<sup>G12D</sup> aktiven Pyridazinone für die Kristallstrukturen 6ZL5, 7RPZ und 6GQY (lila = eigens synthetisierte Verbindungen; grün = LDC-Derivate).

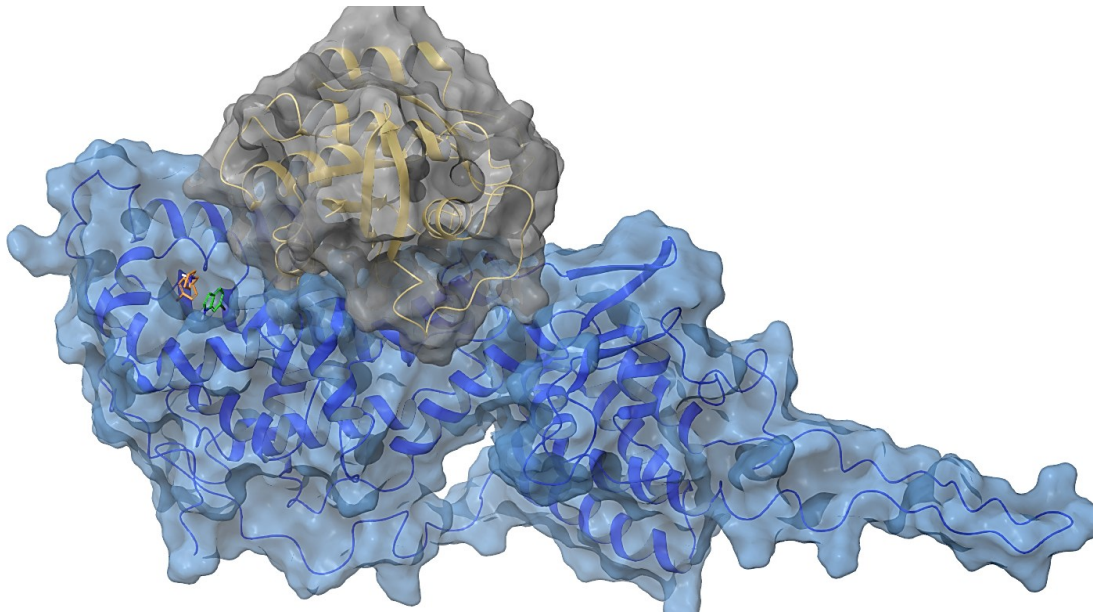
	DS 6ZL5 (BI-2852) [kcal/mol]	DS 7RPZ (MRTX1133) [kcal/mol]	DS 6GQY (Ch-3) [kcal/mol]
Referenz	-7.19	-11.7	-6.59
<b>I-22</b>	-2.74	-4.92	-1.96
<b>I-28</b>	-4.20	-4.88	-3.74
<b>I-29</b>	-4.25	-4.99	-3.61
<b>I-32</b>	-4.27	-4.15	-1.94
<b>I-34</b>	-3.44	-4.51	-2.79
<b>I-36</b>	-2.87	-3.61	-3.44
<b>I-48</b>	-2.39	-2.89	-3.08
<b>I-67</b>	-5.10	-4.43	-2.84
<b>I-70</b>	-4.82	-6.06	-3.60
<b>I-71</b>	-4.40	-4.52	-2.91
<b>I-72</b>	-4.02	-4.44	-3.09
<b>I-73</b>	-3.60	-4.60	-4.01

In der Docking Studie der drei Kristallstrukturen zeigt der Großteil der Verbindungen einen schlechteren Docking Score als -5 kcal/mol oder schlechter. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine sehr schwache oder fehlende Bindung des Liganden zum Zielprotein und daher nur eingeschränkt aussagekräftig. Lediglich das *para*-substituierte Pyridazinons **I-70** besitzt bei der Kristallstruktur 7RPZ einen günstigeren Docking Score von -6.06 kcal/mol. Dieser ist jedoch deutlich schlechter als der DS der MRTX-Referenz **I-19** mit -11.7 kcal/mol. Der große Unterschied deutet darauf hin, dass das Tetrazol **I-70** die charakteristischen Wechselwirkungen des MRTX-Liganden **I-19** innerhalb der Bindetasche nicht in vergleichbarer Weise ausbildet.

Die Ergebnisse der Docking-Studien der drei Kristallstrukturen 6ZL5, 7RPZ und 6GQY legen nahe, dass ein Wirkmechanismus analog zu BI-5852 (**I-15**), MRTX1133 (**I-19**) oder Ch-3 (**I-17**) über die Bindung an die SI/II- oder die SII-Bindestelle unwahrscheinlich ist. Da der Großteil der berechneten Werte ungünstiger Werte als -5 kcal/mol aufweist, spricht dies nicht für den tatsächlichen Bindungsmodus der entsprechenden Bindestellen. Infolgedessen kann die mikromolare Inhibitionsfähigkeit in den biochemischen Daten des Nukleotidaustauschassays nicht aus den aufgestellten Modellen abgeleitet werden. Anstelle einer Bindung an die SI/II- oder SII-Bindestelle resultiert die beobachtete biochemische Aktivität möglicherweise aus der Bindung am Ras/SOS-Komplex. Dazu wurde im weiteren Verlauf die Bindung der Pyridazinone an das Ras/SOS-Interface eingehender untersucht.

#### **3.1.3.2 Molecular Modeling am Ras/SOS-Interface**

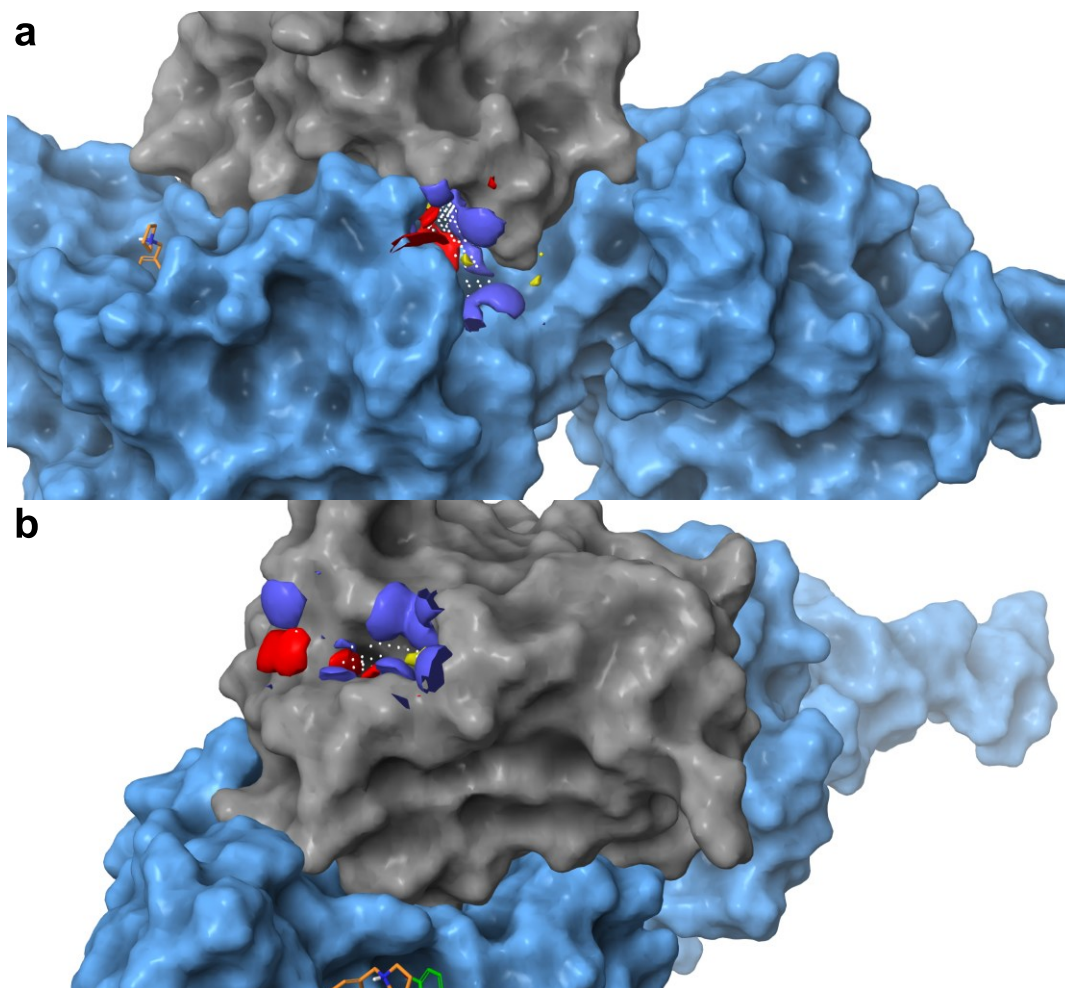
Bereits 2014 zeigten BURNS *et al.* die Möglichkeit der Aktivierung des SOS-vermittelten Nukleotidaustauschs durch *Small Molecules*.<sup>[149]</sup> Zwar steht dieser Befund dem für eine Krebstherapie benötigten Mechanismus entgegen, verdeutlicht jedoch, dass durch eine gezielte Adressierung des Ras/SOS-Komplexes grundsätzlich eine Regulierung der Aktivität möglich ist. Auf diesen Ergebnissen aufbauend führten WINTER *et al.* ein Fragment-Screening durch und identifizierten drei Bindestellen an dem binären Komplex.<sup>[150]</sup> Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines K-Ras-Komplexes arbeiteten die Autoren mit der H-Ras-Isoform. Die erhaltene Kristallstruktur 4URX beinhaltet ein Bromindol (grün) sowie ein Benzpyrrolidin (orange) als Liganden und wurde als Grundlage für die weiteren Bindungsstudien verwendet (Abb. 21).



**Abb. 21:** Kristallstruktur (PDB: 4URX) des Komplexes von HRas (Oberfläche grau, Ribbons beige) und SOS (Oberfläche und Ribbons blau).

Ausgehend von der biochemischen Aktivität der Pyridazinone im NanoBRET-Assay ist die Bindung eines Pharmakophors an die SI/II-Bindestelle, die das primäre Bindungsinterface zu SOS bildet, und die Bindung des anderen Pharmakophors an SOS möglich. Diesen Bindungsmodus über *in silico*-Methoden nachzuweisen ist nicht trivial, da günstige Docking Scores voraussichtlich nur erhalten werden, wenn beide Pharmakophore die richtigen Bindestellen adressieren.<sup>[151]</sup> Darüber hinaus ist es aufgrund der hohen Variabilität der Ras-Regionen und SOS-Domänen denkbar, dass es sich um *cryptic binding sites* handelt, die erst durch die Pyridazinone induziert werden. Für die Überprüfung dieses Bindungsmodus sollten zunächst über *SiteMap* passende Bindetaschen an dem Ras/SOS-Interface der Kristallstruktur 4URX identifiziert, über das *Ligand Docking* als geeigneter Ansatzpunkt verifiziert und im weiteren Verlauf mit Moleküldynamiksimulationen bestätigt werden.

Im ersten Schritt wurde der Ras/SOS-Komplex (PDB: 4URX) mit dem *SiteMap*-Modul aus der Schrödinger Software auf potenzielle Bindestellen untersucht. In den Einstellungen wurde festgelegt, dass die besten fünf Bindestellen ausgegeben werden. Zwei der fünf Bindetaschen waren am Ras/SOS-Interface lokalisiert, zwei weitere auf dem SOS-Protein selbst und eine auf dem Ras-Protein. Für weitere Docking-Studien wurde eine Tasche des Interface (Abb. 22a) und die Bindetasche an Ras (Abb. 22b) in Betracht gezogen.



**Abb. 22:** Die beiden über das Modul *SiteMap* identifizierten Bindetaschen a und b (PDB Code: 4URX). Ras (Oberfläche grau, Ribbons beige), SOS (Oberfläche und Ribbons blau).

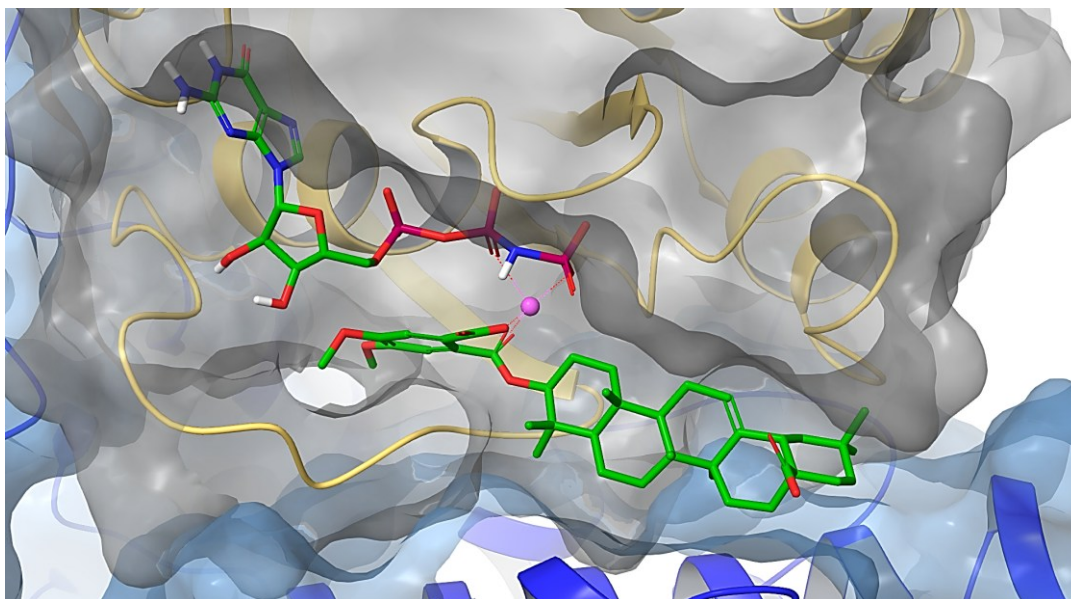
Für die Substanz **I-22** sowie deren Komponenten **I-36** und **I-48** wurden die entsprechenden Docking-Scores berechnet (Tab. 5). Den Daten ist zu entnehmen, dass in beiden Bindetaschen die Substanz **I-22** den günstigsten DS besitzt, ohne jedoch ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen.

**Tab. 5:** Docking Scores der Bindestellen a und b an dem Ras/SOS-Komplex (PDB Code: 4URX).

	DS Site a [kcal/mol]	DS Site b [kcal/mol]
<b>I-22</b>	-4.46	-3.78
<b>I-36</b>	-3.99	-3.12
<b>I-48</b>	-4.00	-3.56

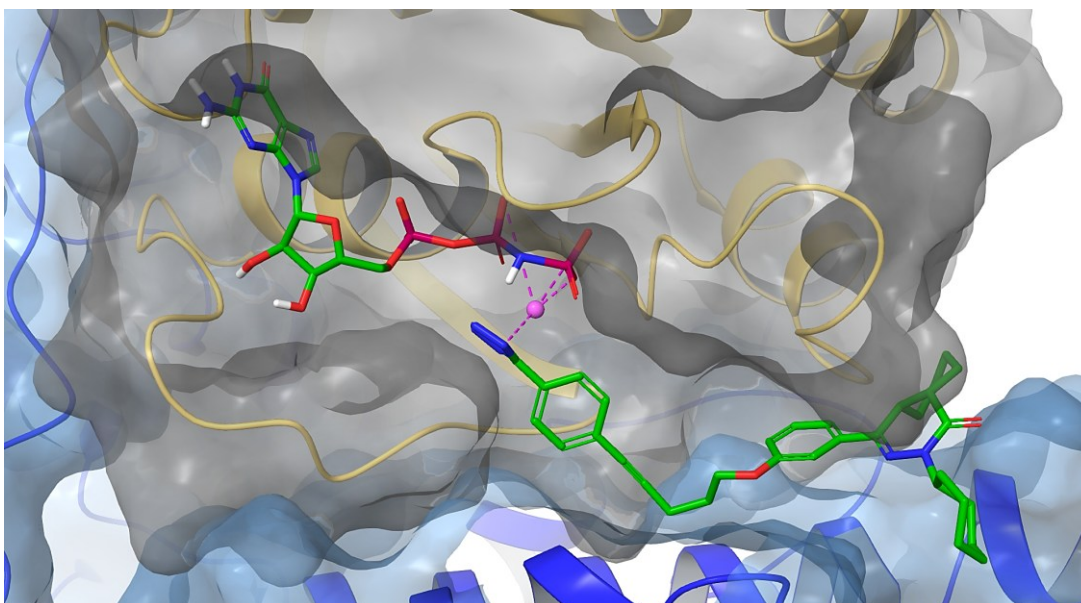
Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde zwischenzeitlich eine weitere Bindestelle am Ras/SOS-Interface identifiziert. Basierend auf Modeling-Arbeiten an der ternären Ras<sup>allo</sup>/SOS/Ras<sup>cat</sup>-Kristallstruktur 7KFZ<sup>[45]</sup> beschrieben BENARY *et al.* einen Bindungsmodus, der durch die Bindung von Triterpenen am Interface zwischen

allosterischem Ras und SOS charakterisiert ist.<sup>[152]</sup> Die getesteten Phthalsäurederivate verdrängen zwei Wassermoleküle und komplexieren über die Carboxylatgruppe und den *ortho*-Ester den Co-Faktor des GTP-gebundenen allosterischen Ras (Abb. 23).



**Abb. 23:** Docking-Pose des Triterpens **I-76** an dem K-Ras<sup>allo</sup>/SOS-Interface (PDB Code: 7KFZ; Ras = beige; SOS = blau).

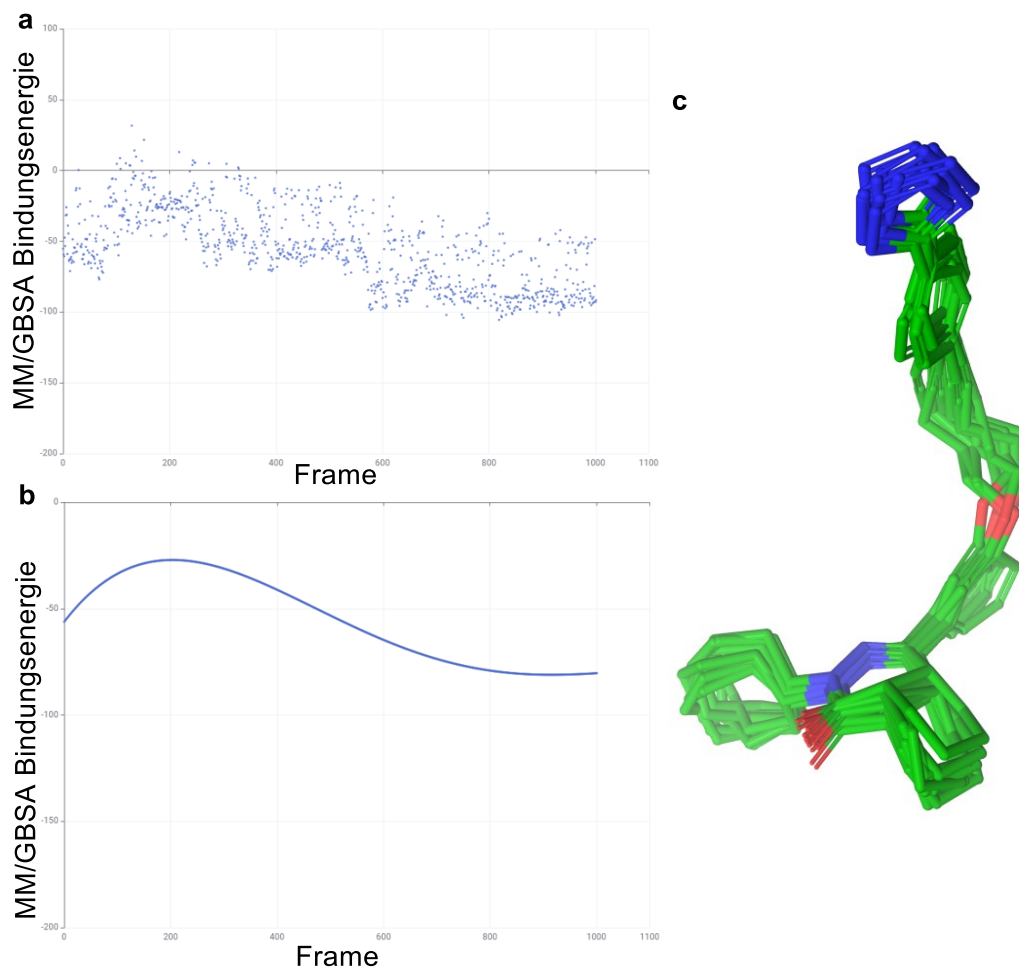
Die Verbindung **I-22** wurde daraufhin in dem gleichen Ablaufschema wie die Triterpen-Derivate berechnet. Zunächst wurde über mehrere Grids auf die Bindetasche des allosterischen Ras mit Constraint zum Magnesium gedockt. Innerhalb dieser Docking-Läufe wurden mit -7 kcal/mol im Vergleich zu bisherigen Läufen deutlich bessere DS erhalten.



**Abb. 24:** Docking-Pose des Pyridazinons **I-22** an dem K-Ras<sup>allo</sup>/SOS-Interface (PDB Code: 7KFZ; Ras = beige; SOS = blau).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Im weiteren Verlauf wurde auf Basis der besten Docking-Pose eine Moleküldynamiksimulation über 500 ns durchgeführt, bei der alle 0.5 ns ein Frame aufgenommen wurde. Für jeden der 1000 Frames wurde über ein MM/GBSA-Skript der Schrödinger-Software die Bindungsenergie bestimmt. Der zeitliche Verlauf der freien Bindungsenergien ist in Abb. 25a aufgeführt. Über die Software KNIME wurde mit Hilfe des *Linear Regression Learner* eine Ausgleichsline erstellt, um den Verlauf besser ersichtlich darzustellen (Abb. 25b).



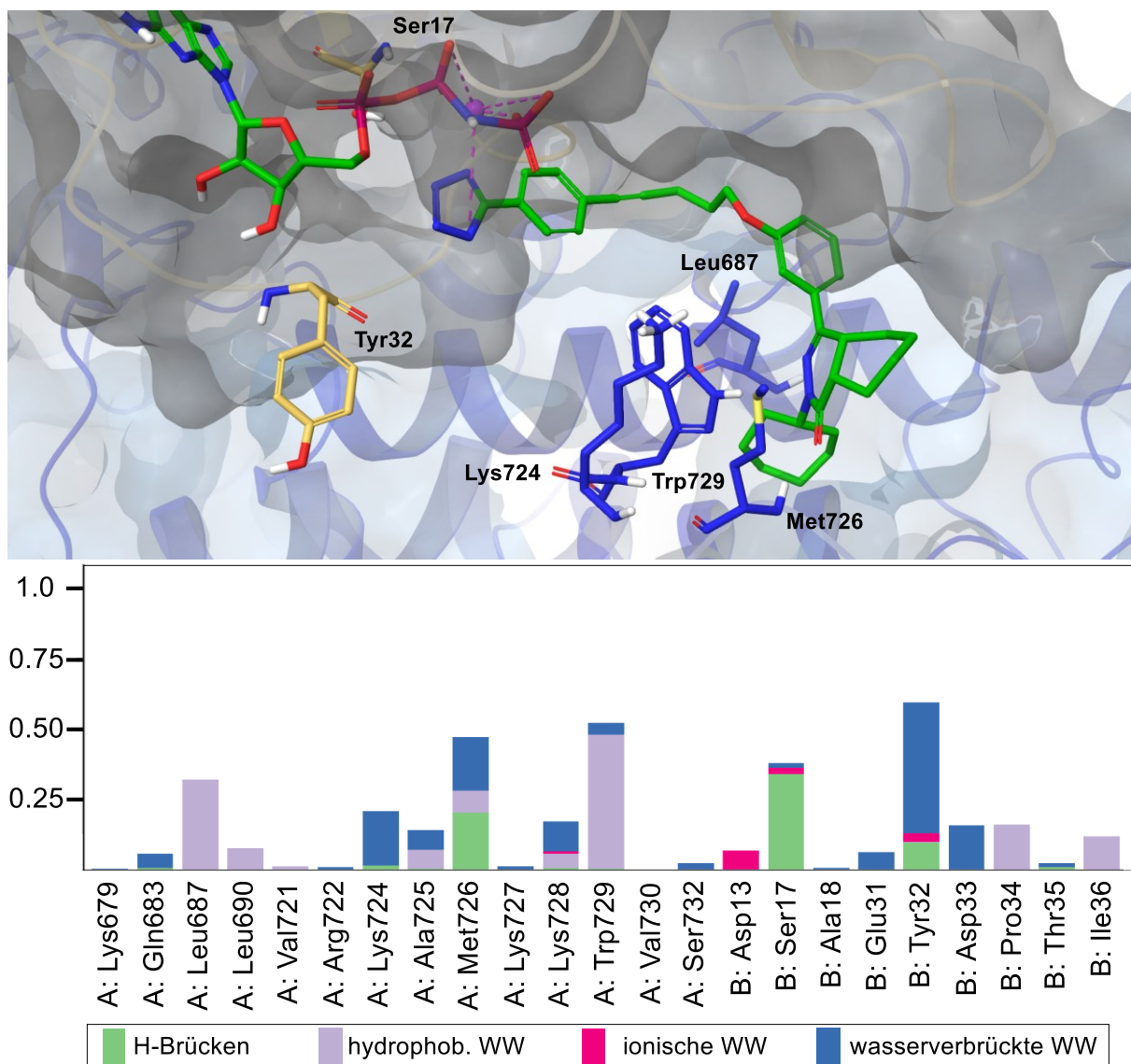
**Abb. 25:** a) Berechnete Bindungsenergien innerhalb der Moleküldynamiksimulation über 500 ns; b) Zeitlicher Verlauf der MM/GBSA Bindungsenergien als Ausgleichsfunktion; c) Superposition der zehn Bindungsposen mit den niedrigsten MM/GBSA Bindungsenergien.

Zu Beginn liegt die Bindungsenergie bei rund -50 kJ/mol und steigt innerhalb der ersten 200 Frames an. Anschließend sinkt sie bis zum 800. Frame auf einen deutlich niedrigeren Wert als in der Ausgangspose, mit einem Minimum von -104.1 kJ/mol bei 753 ns. Bis zum Ende der Simulation bleibt die Energie dann stabil. Die Moleküldynamiksimulation zeigt über die gesamte Simulationsdauer einen stabilen Ras<sup>allo</sup>/I-22/SOS-Komplex, der am Ende der Simulation energetisch günstiger ist als zu Beginn. Die zehn niedrigsten Bindungsenthalpien der gesamten Moleküldynamiksimulation wurden extrahiert und in

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 25c superpositioniert. Die hohe Übereinstimmung aller Posen deutet auf eine deutlich bevorzugte Konformation hin.

Auf den Ausschnitt des Frames mit der niedrigsten Bindungsenergie wurde zusätzlich ein Docking-Lauf durchgeführt. In dieser Bindetasche wurde mit -9.91 kcal/mol nochmals ein deutlich besserer DS als bei der der Ausgangsstruktur erhalten. Die Bindungspose des Docking-Laufs ist in Abb. 26 gezeigt.

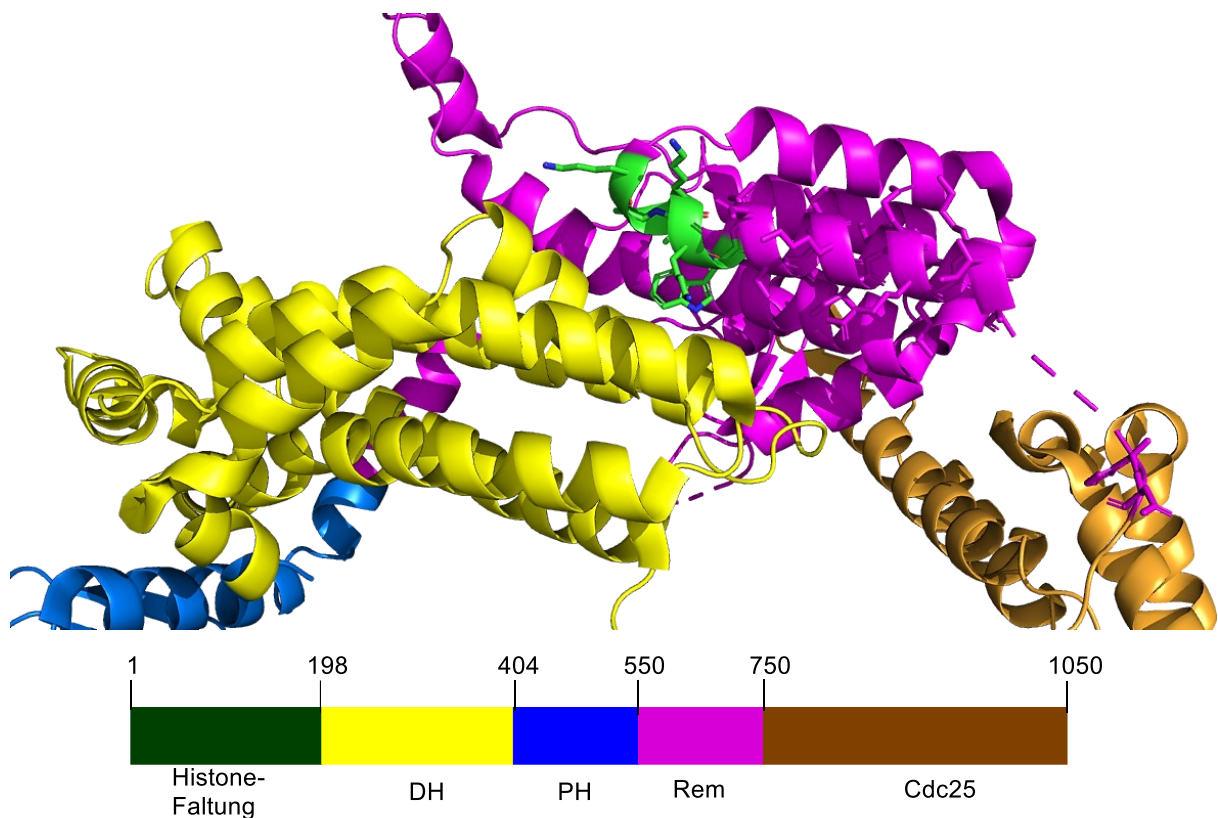


**Abb. 26:** oben: Bindungspose von I-22 an dem Ras<sup>allo</sup>/SOS-Interface (SOS = blau; Ras = grau). unten: Zeitlicher Anteil der ausgebildeten Wechselwirkungen von Verbindung I-21 und den Aminosäuren von SOS (A) und Ras (B).

Im Ligand-Protein-Komplex koordiniert das Tetrazolidanion das Magnesiumkation. Der restliche Teil des Moleküls I-22 bildet eine Bindetasche innerhalb der Switch I-Pocket (Glu31, Tyr32, Asp33, Thr35, Ile36, Glu37), und der Rem-Domäne von SOS (Lys679, Gln683, Leu687, Arg688, Leu690, Val721, Arg722, Lys724, Ala725, Met726, Lys727,

Lys728 und Trp730) aus (Abb. 26). Die Auswertung der zeitabhängigen Wechselwirkungen zwischen dem Tetrazol **I-22** und dem Protein zeigt, dass der Ligand **I-22** überwiegend mit den SOS-Aminosäuren Leu687, Lys724, Met726, Trp728 sowie den Ras<sup>allo</sup>-Aminosäuren Ser17 und Tyr32 interagiert (Abb. 26 unten).

In Bezug auf die GDP/GTP-Austauschaktivität wirkt die Stabilisierung des allosterischen Ras am ternären Ras/SOS-Komplex auf den ersten Blick widersprüchlich. Für H-Ras wiesen BUHRMAN *et al.* nach, dass die Bildung des ternären (GppNHp)H-Ras<sup>Y64A</sup>(allo)/SOS/H-Ras<sup>wt</sup>-Komplexes eine Konformationsänderung der Rem-Domäne induziert.<sup>[32]</sup> Dies hat eine allosterische Verstärkung der Interaktionen zwischen der SI-Region und SOS zur Folge. Somit wird die Austauschrate des Nukleotids der katalytischen Position erhöht.



**Abb. 27:** Kristallstruktur von SOS (PDB Code: 1XD4) mit der Dbl-Domäne (gelb), PH-Domäne (blau), Rem-Domäne (magenta), Aminosäuren Lys724–Trp729 (grün) und Ccd25-Domäne (braun).<sup>[153]</sup>

In diesem biochemischen Prozess kommt es ebenfalls zur Autoinhibition von SOS. Innerhalb dieses Mechanismus binden die DH-Domäne (Dbl homology domain, Abb. 27 gelb) und die PH-Domäne (Pleckstrin homology, blau) an die Rem-Domäne. Die Aminosäurereste Lys724–Trp729 der Rem-Domäne (magenta) werden vollständig von der DH-Domäne überdeckt, mit der Folge, dass eine Bindung von Ras<sup>allo</sup> an diese nicht mehr möglich ist.<sup>[153,154]</sup> Wie in Abb. 26 zu erkennen ist, bilden die für die Aktivierung

ausschlaggebenden Aminosäuren Lys724–Trp729 einen wesentlichen Bestandteil des Bindungsinterface von SOS und dem Tetrazol **I-22**. Der energetische Verlauf der Moleküldynamiksimulation (Abb. 25b), in Kombination mit den anschließenden Docking-Studien deuten darauf hin, dass das Pyridazinon **I-22** als *molecular glue* den K-Ras<sup>allo</sup>/SOS-Komplex im inaktiven Zustand stabilisiert und eine Aktivierung verhindert. Dieser Wirkmechanismus erklärt zusätzlich die fehlende Selektivität zwischen den onkogenen Varianten und dem Wildtyp. Zum einen interagiert Asp12 mit dem GTP und wird nicht von dem Pyridazinon **I-22** adressiert, zum anderen besitzen die onkogenen K-Ras<sup>GTP</sup>-Formen eine ähnliche Affinität für die allosterische Rem-Domäne wie K-Ras<sup>wt</sup>.<sup>[155]</sup>

Abschließend wurden alle im Nukleotidaustausch aktiven Substanzen auf die erhaltene Bindetasche der Verbindung **I-22** gedockt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 aufgeführt. Für den überwiegenden Teil der Substanzen wurde ein DS im Bereich von  $-9.5 \pm 0.4$  kcal/mol erhalten. Somit konnte über die Bindung an das Ras<sup>allo</sup>/SOS-Bindungsinterface ein valider Bindungsmodus der im Nukleotidaustausch assay aktiven Pyridazinone postuliert werden.

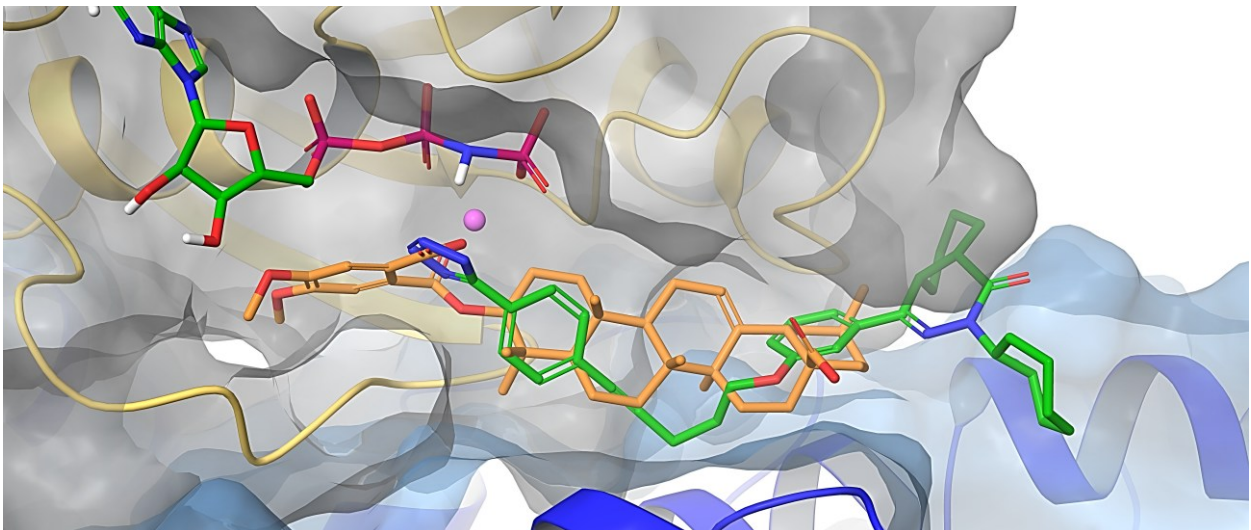
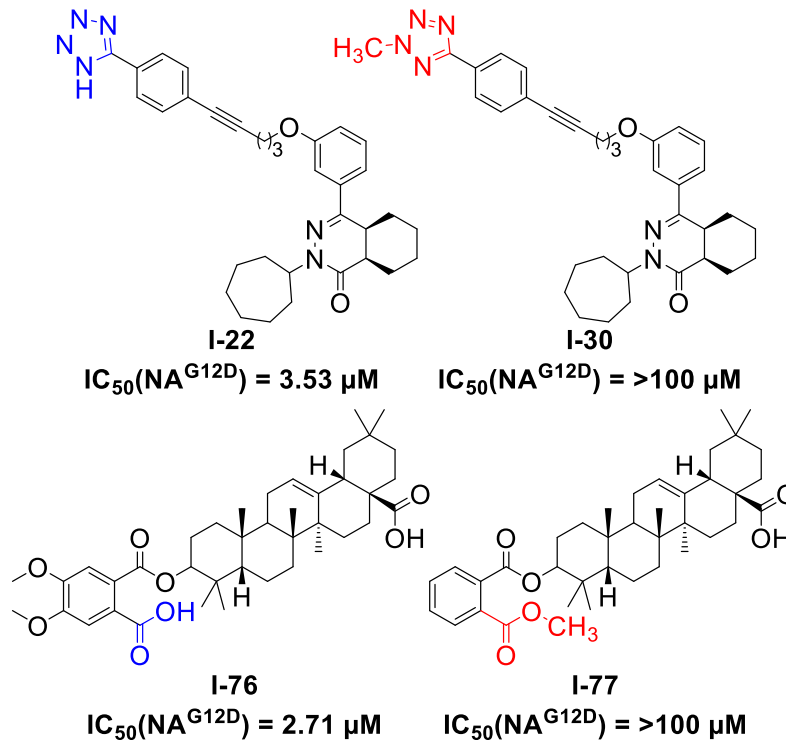
**Tab. 6:** IC<sub>50</sub>-Werte des NA<sup>G12D</sup> und die jeweiligen Docking Scores (lila = eigens synthetisierte Verbindungen; grün = LDC-Derivate).

	NA <sup>G12D</sup> IC <sub>50</sub> [μM]	DS [kcal/mol]
<b>I-22</b>	3.53 ± 1.71	-9.91
<b>I-28</b>	7.97 ± 1.66	-9.56
<b>I-29</b>	16.6 ± 6.46	-9.58
<b>I-32</b>	14.1 ± 3.21	-9.15
<b>I-34</b>	6.30*	-9.59
<b>I-57</b>	9.26 ± 6.60	-9.73
<b>I-59</b>	14.1 ± 4.42	-8.33
<b>I-67</b>	6.03 ± 0.800	-9.40
<b>I-70</b>	9.30 ± 2.87	-9.10
<b>I-71</b>	7.36 ± 3.69	-7.89
<b>I-72</b>	9.73 ± 3.78	-9.14
<b>I-73</b>	7.57*	-8.09
<b>I-74</b>	16.4*	-8.31

\*Einzelbestimmung

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse aus den *in silico*-Studien stehen zudem im Einklang mit den durchgeführten SAR der Pyridazinone und Triterpene. Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, führt eine Entfernung des aziden Protons durch Methylierung zum Verlust der biologischen Aktivität. Dieser Trend ist auch bei den Triterpenen zu beobachten. Wird die freie Säurefunktion durch einen Ester blockiert, besitzt das Produkt keine Aktivität im Nukleotidaustauschassay (Abb. 28).



**Abb. 28:** oben: Chemische Strukturen und biologische Daten des Nukleotidaustauschassays der Pyridazinone und Triterpene mit aziden Protonen und der Entfernung durch eine Methylgruppe. unten: Superposition der Verbindungen **I-22** und **I-76** in der Bindetasche des Ras<sup>allo</sup>/SOS-Interface.

Zusätzlich besteht eine hohe Übereinstimmung zwischen der experimentellen Inhibitionsaktivität und den *in silico*-Modellen. Sowohl das Triterpen **I-76** als auch das Pyridazinon **I-22** inhibieren den GDP/GTP-Austausch in einstellig mikromolaren

Konzentrationen, die durch DS im Bereich von  $-10 \pm 2$  kcal/mol und berechnete Bindungsenergien von  $-110 \pm 10$  kJ/mol wiedergegeben werden. Im Vergleich zu den Triterpenen besitzen die Pyridazinone jedoch folgende Vorteile. Damit Wirkstoffe eine gute orale Verfügbarkeit aufweisen, sollten diese Lipinskis *Rule of five* (RO5) erfüllen:  $SLogP \leq 5$ , Molmasse  $\leq 500$  g/mol, Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren (HBA)  $\leq 10$ , Anzahl an Wasserstoffbrückendonoren (HBD)  $\leq 5$ .<sup>[143,156]</sup> Der  $LogP_{O/W}$ -Wert gibt die Verteilung einer Substanz zwischen *n*-Octanol und Wasser an und ist ein Deskriptor für die Lipophilie einer Substanz. Ein Indiz für die Zellpermeabilität ist der *total polar surface area*-Wert (TPSA), der die Summe der Oberflächen aller polaren Atome sowie deren gebundener Wasserstoffe beschreibt. Liegt der TPSA-Wert über 140 Å, neigen die Substanzen dazu schlechter in die Zelle zu gelangen.<sup>[157]</sup>

Mit Hilfe der *SwissADME online software*<sup>[158]</sup> wurden die physikochemischen Eigenschaften, Pharmakokinetik, *druglikeness* und die Eignung für die medizinische Chemie („*medicinal chemistry friendliness*“) der Verbindungen **I-76**, **I-22** sowie **I-28** berechnet. Das Ergebnis ist in Abb. 29 in Form eines Hexagramms dargestellt, das die Bioverfügbarkeit visualisiert.

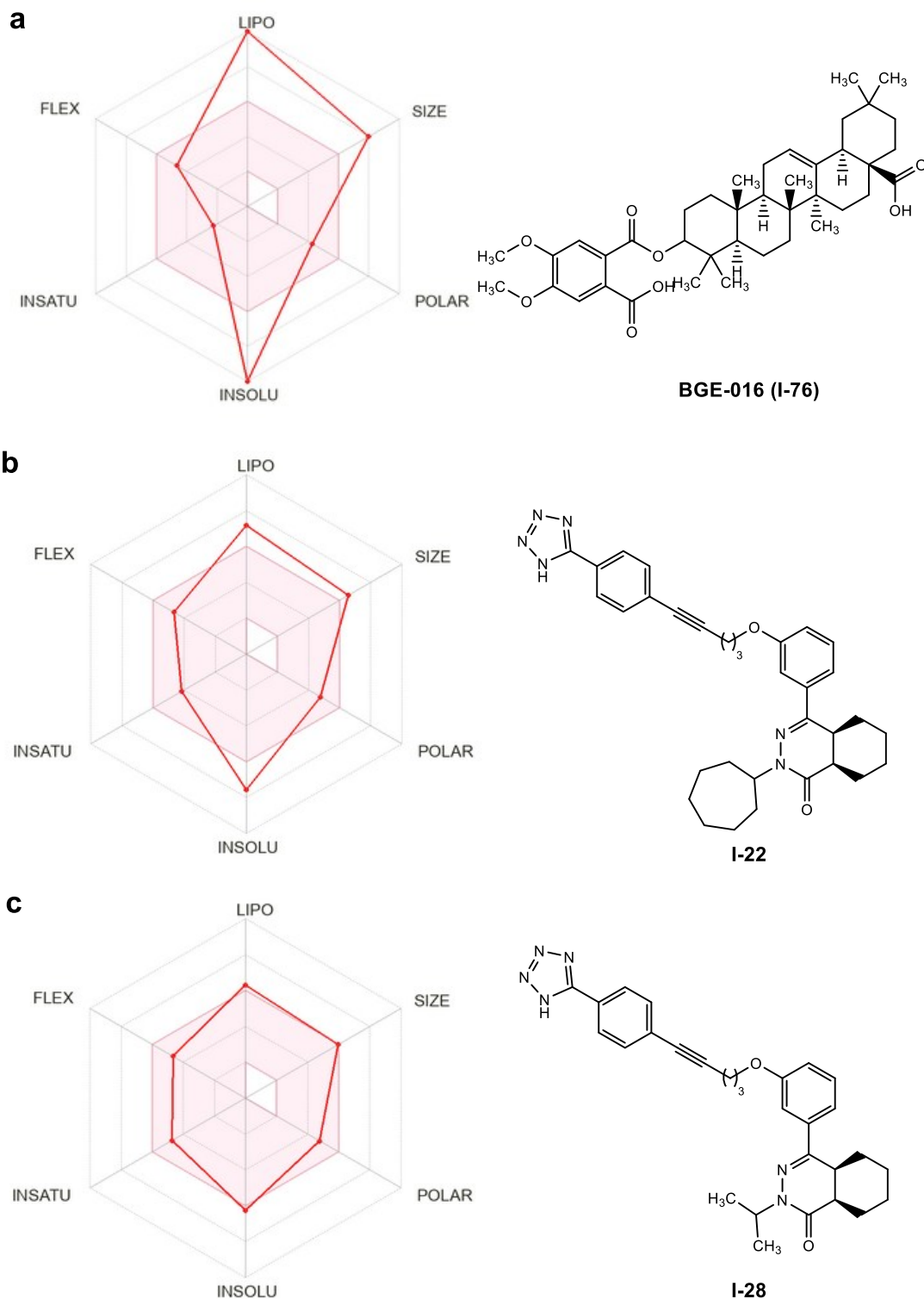
Für die Berechnung des  $LogP_{O/W}$ -wertes (Abb. 29 LIPO) wurden diverse Methoden mit unterschiedlichen chemischen Bibliotheken entwickelt. Für die Einordnung der Lipophilie verwendet *SwissADME* den XLogP3-Wert, der auf einer semiempirischen Methode von CHENG *et al.* beruht.<sup>[159]</sup>

Die Berechnung der Wasserlöslichkeit setzt sich aus den Methoden von DELANEY *et al.*<sup>[160]</sup> ALI *et al.*<sup>[161]</sup> und SILICOS-IT zusammen. Aus dem Hexagramm geht hervor, dass das Triterpen **I-76** insbesondere wegen der ausgeprägten Lipophilie und damit einhergehenden schlechten Wasserlöslichkeit keine gute Bioverfügbarkeit besitzt. Diese Parameter liegen bei dem Pyridazinon **I-22** zwar etwas außerhalb des optimalen Bereichs, sind aber im Vergleich zu dem Triterpen deutlich günstiger. Bereits die Substitution des Cycloheptylrings gegen den Isopropylrest im Rahmen der durchgeführten SAR führte dazu, dass beide Werte weitestgehend im hellroten und somit dem optimalen Bereich liegen.

Der hellrote Bereich innerhalb des Hexagramms beschreibt die optimalen Wertebereiche der einzelnen Faktoren: Lipophilie ( $-0.7 \leq XLogP3 \leq +5$ ), Größe ( $150 \text{ g/mol} \leq MW \leq 500 \text{ g/mol}$ ), Polarität ( $20 \text{ Å} \leq TPSA \leq 130 \text{ Å}$ ), Ungesättigtheitsgrad

### 3. Ergebnisse und Diskussion

(Anteil an  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffen  $\geq 0.25$ ), Wasserlöslichkeit ( $\text{LogS} \leq 6$ ) und Flexibilität (Anzahl der rotierenden Bindungen  $\leq 9$ ).



**Abb. 29:** Bioverfügbarkeitshexagramm von SwissADME der Verbindungen a) **I-75**, b) **I-21** und c) **I-27**.

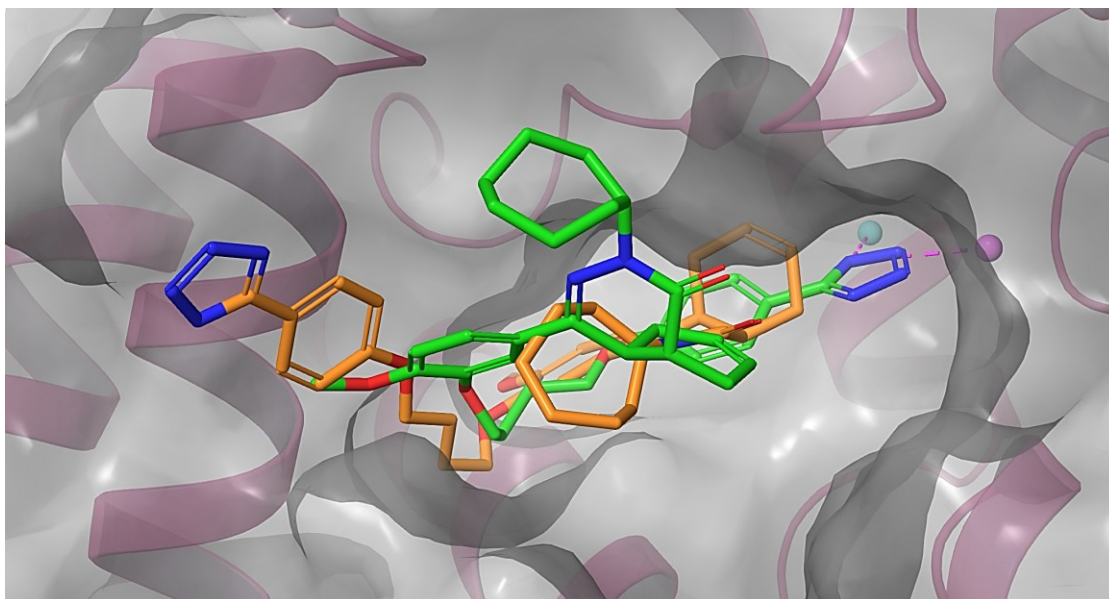
Ein weiterer Vorteil der Pyridazinone liegt in der Variabilität des Scaffolds. Während die pentacyclischen Triterpen-Scaffolds nur wenige Variationen innerhalb ihrer natürlichen Derivate besitzen oder Veränderungen des Scaffolds synthetisch nur aufwendig

zugänglich sind, können die Pyridazinone in konvergenten Synthesen mit sechs bis acht Syntheseschritten gewonnen werden. Zusätzlich hatte die konformationelle Einschränkung der Linkereinheit keinen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität.

#### 3.1.3.3 Docking-Studien zur Aufklärung der PDE-Inhibition

Da die Substanzklasse der Pyridazinone ursprünglich aus der PDE-Inhibition hervorgegangen ist, besteht die Möglichkeit, dass die in den zellulären pERK- und CTG-Assays beobachtete Aktivität der Substanzen **I-22**, **I-67**, **I-70**, **I-72** sowie **I-73** nicht auf einer K-Ras-Inhibition basiert. Eine Hemmung der PDE4-Isoformen kann über cAMP-abhängige Signalwege indirekt die ERK-Aktivierung modulieren und somit auch ohne direkte Ras-Adressierung die ERK-Downstreamkaskade inhibieren.<sup>[162,163]</sup> Aus diesem Grund wurden Docking-Studien an den humanen PDE4-Kristallstrukturen 5LAQ<sup>[164]</sup>, 5LBO<sup>[164]</sup> und 8W4R<sup>[165]</sup> durchgeführt.

In der Kristallstruktur 5LAQ liegt das Ursprungspyridazinon **I-20** als kristallisierter Ligand vor. Dieser besaß in dem Docking-Lauf ein DS von -6.57 kcal/mol. Die Pyridazinone **I-22**, **I-67**, **I-70**, **I-72** und **I-73** besaßen etwas günstigere DS im Bereich von -8.1 bis -8.6 kcal/mol. Allerdings stimmten die gedockte Pose und die Pose des kristallisierten Liganden nicht überein, da die berechnete Pose verdreht in der Bindetasche liegt (Abb. 30). Das hoch konservierte aktive Zentrum der Phosphodiesterasen enthält sowohl ein Zink<sup>2+</sup>- (cyan) als auch ein Mg<sup>2+</sup>-Kation (magenta).<sup>[166]</sup> In sämtlichen *in silico*-Posen komplexiert das Tetrazol die beiden Co-Faktoren (Abb. 30 gestrichelte Linie in magenta), während der kristallisierte Ligand (orange) keine Interaktionen mit den Kationen zeigt. Docking-Studien an der Kristallstruktur 5LBO bestätigten diese Ergebnisse. Da die Pose des kristallisierten Liganden nicht reproduziert werden konnte, sind die Ergebnisse der Pyridazinone nicht validiert und damit nicht belastbar. Im weiteren Verlauf wurde deshalb mit der Kristallstrukturen 8W4R gearbeitet



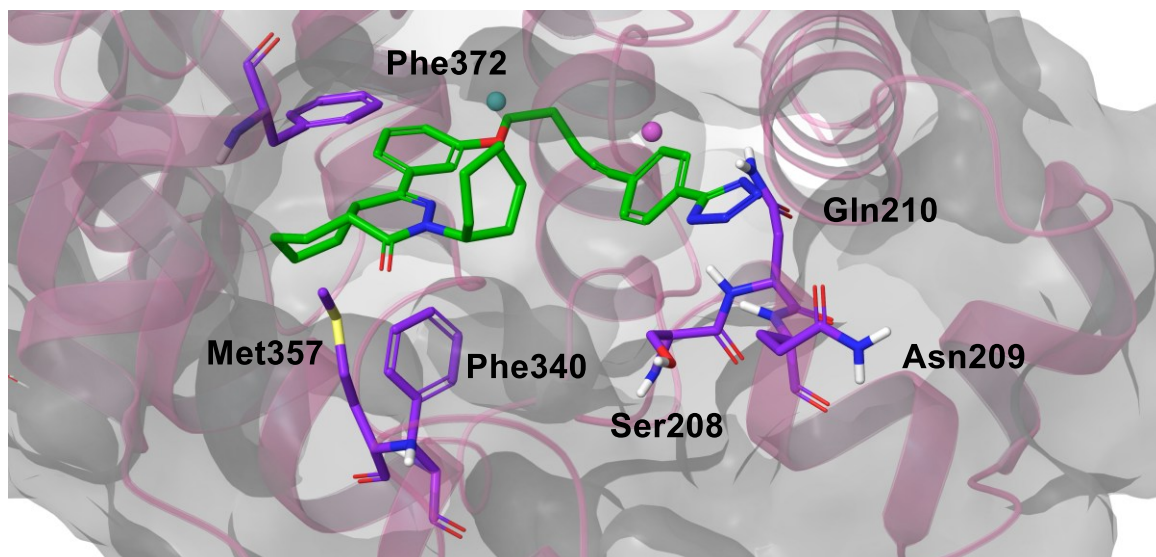
**Abb. 30:** Superposition der gedockten (grün) und kristallisierten Pose (orange) des NPD-001-Liganden (**I-19**, PDB: 5LAQ).

Der Docking-Lauf an dieser Kristallstruktur lieferte den kristallisierten Liganden mit einer optimalen Übereinstimmung (Anhang Abb. 76) und einem Docking Score von -8.23 kcal/mol (Tab. 7).

**Tab. 7:** Docking Ergebnisse der Kristallstruktur 8W4R.

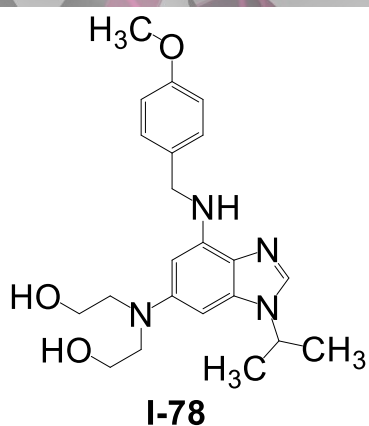
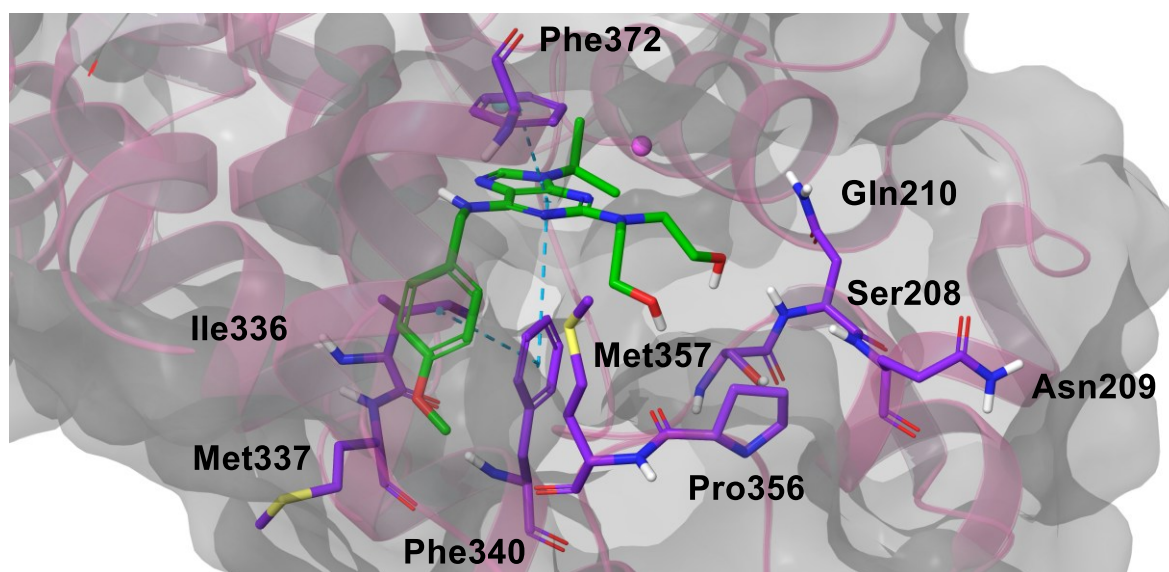
	DS 8W4R [kcal/mol]
<b>Referenz I-78</b>	-8.23
<b>I-21</b>	-8.67
<b>I-67</b>	-7.29
<b>I-70</b>	-8.44
<b>I-72</b>	-6.46
<b>I-73</b>	-7.61

Mit Ausnahme der Verbindung **I-72**, das einen DS von -6.46 kcal/mol aufweist, liegen alle untersuchten Verbindungen im Bereich der Referenzverbindung **I-78** (-8.23 kcal/mol). Die Bindetasche des hydrophoben Pyridazinon-Scaffolds **I-22** (DS = -8.67 kcal/mol) wird maßgeblich durch die Aminosäuren Leu319, Phe340, Met357 und Phe372 geformt. Das Phenyltetrazol ist in Richtung der polaren Aminosäuren Ser208, Asn209 und Gln210 orientiert. Diese sind in der katalytischen Bindetasche vor allem an der Koordination der beiden Co-Faktoren  $Mg^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  beteiligt (Abb. 31).<sup>[165]</sup>



**Abb. 31:** Bindungspose der Verbindung **I-22** im aktiven Zentrum der PDE4D (PDB: 8W4R).

Neben den Aminosäuren, die von der Verbindung **I-22** adressiert werden, sind die Aminosäuren Ile,336, Met337 und Pro356 Teil der hydrophoben Bindetasche des kristallisierten Liganden **I-78** (Abb. 32).



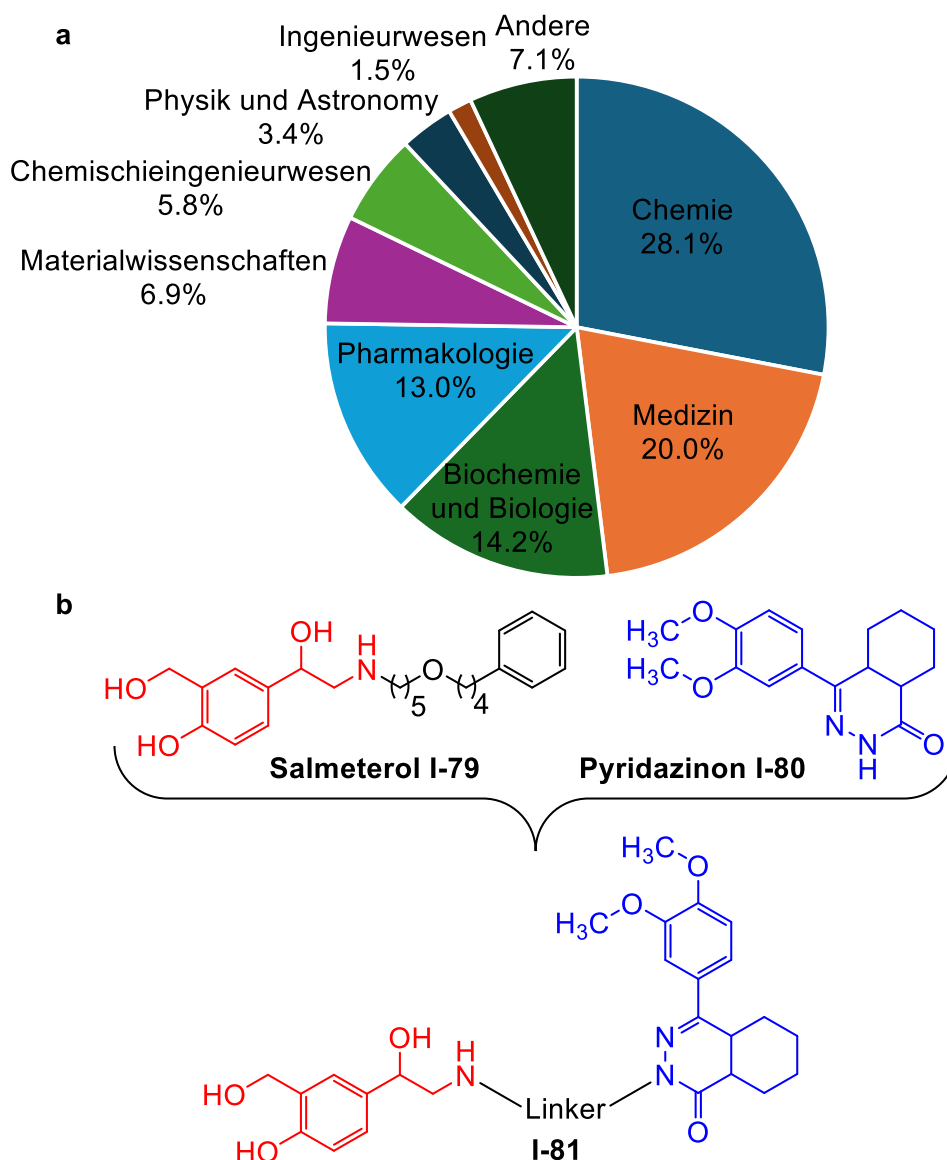
**Abb. 32:** Bindungspose der Referenz **I-77** im aktiven Zentrum der PDE4D (PDB: 8W4R.)

Darüber hinaus werden  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den beiden Sechsringen und den Aminosäuren Phe340 und Phe372 ausgebildet (Abb. 32 blau gestrichelte Linien). Im Gegensatz zu dem Pyridazinon **I-22** adressiert der Ligand aus der Kristallstruktur die polaren Aminosäuren Ser206, Asn209 und Gln210 nicht. Die Ergebnisse dieser Docking-Studie deuten darauf hin, dass die Aktivität in den zellulären pERK- und CTG-Assays auch durch die Adressierung der katalytischen PDE4-Bindetasche hervorgerufen werden könnte. Für beide Wirkmechanismen wurden valide *in silico*-Ergebnisse erhalten.

#### 3.2 Rabbits-Hybride

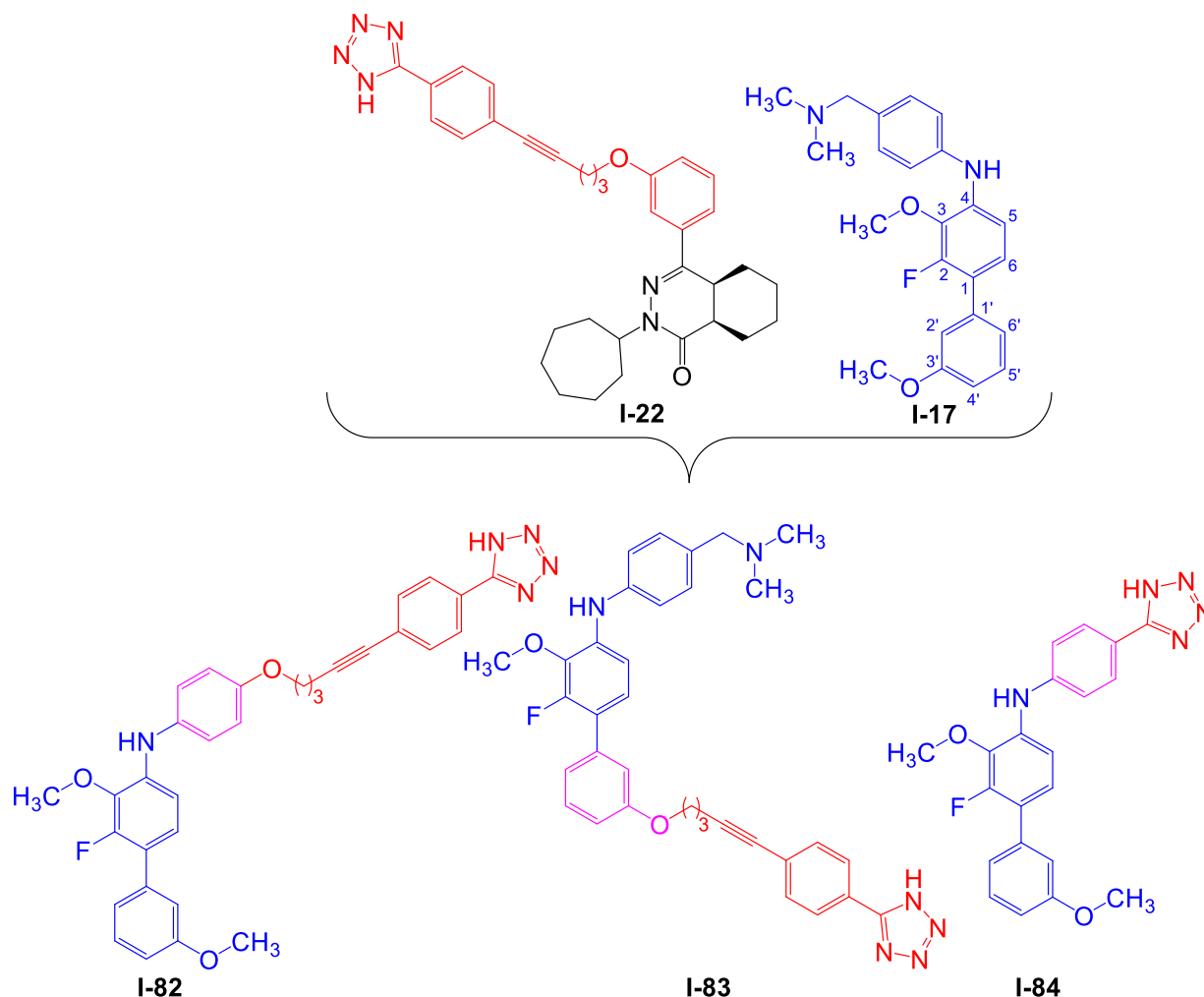
Tetrazole bilden eine Strukturklasse, die in der pharmakologischen Anwendung immer mehr an Bedeutung gewinnt. Waren 2018 noch 43 Substanzen mit Tetrazolkomponenten in der Drugbank<sup>[167]</sup> gelistet, stieg diese Zahl bis 2025 auf 70 an.<sup>[168]</sup> Laut Scopus entfällt etwa ein Drittel aller Publikationen über Tetrazole auf die Fachgebiete Pharmakologie und Medizin (Abb. 33a). Die nicht natürlich vorkommenden Heterozyklen weisen das höchstmögliche stabile Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis auf. 5-substituierte Tetrazole zeigen eine Tautomerie zwischen der 1*H*- und 2*H*-Form, Studien zu den Bindungsorbitalen wiesen jedoch nach, dass in Lösung die 1*H*-Form und in der Gasphase die 2*H*-Form energetisch bevorzugt ist.<sup>[169,170]</sup> Tetrazole besitzen einen  $pK_s$ -Wert von 4.5-4.9 und zählen zu den Bioisosteren der Carbonsäuren. Die ähnliche räumliche Ausrichtung der Ionenpaare und das ähnliche elektrostatische Potenzial führen zu vergleichbaren Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen.<sup>[171]</sup> Der Vorteil gegenüber Carbonsäuren liegt in der erhöhten metabolischen Stabilität, der erweiterten räumlichen Delokalisierung der negativen Ladung und der verbesserten Membranpermeabilität der Tetrazole. Diese resultiert aus der gesteigerten Lipophilie, die um etwa eine Größenordnung höher ist als die von Carbonsäuren. Darüber hinaus begünstigt die aromatische Eigenschaft der deprotonierten Tetrazole  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, die häufig erhöhte Bindungsaffinitäten zu Zielproteinen erklären.<sup>[168,172]</sup>

Im Bereich der *drug discovery* ist die Kombination von zwei oder mehr biologisch aktiven Substanzen eine gängige Methode, um zwei Wirkmechanismen zu kombinieren. Über diesen Ansatz synthetisierten LIU *et al.* Hybridsubstanzen (**I-81**) aus dem  $\beta_2$ -Agonisten Salmeterol (**I-79**) und dem PDE inhibierenden Pyridazinon-Scaffold (**I-80**) von NPD-001 (**I-19**).<sup>[173]</sup> Die Kombination der Kopfgruppen mit verschiedenen Linkern ergab eine Serie dual funktionaler Wirkstoffe, die eine sehr potente biologische Aktivität für die beiden Bindungsorte der Pharmakophore zeigen (Abb. 33b).



**Abb. 33:** a) Anteile der Publikationen über Tetrazole in verschiedenen Anwendungsbereichen. b) Kombination von Salmeterol (I-79) und dem Dimethoxy-pyridazinon (I-80) von LIU *et al.* zu dual funktionalen Wirkstoffen (I-81).<sup>[173]</sup>

Analog zum Konzept von LIU *et al.* soll im weiteren Verlauf aus der Phenyltetrazol-Einheit der Verbindung I-22 und dem Rabbits-Liganden (I-17) eine Reihe an Hybridsubstanzen (I-82 – I-84) hergestellt werden (Abb. 34). Bereits M. ROEGER zeigte innerhalb der Arbeitsgruppe, dass die 3'-Methoxygruppe für Protacs über Linkersysteme erweitert werden kann, ohne dabei Aktivität in den CTG-Assays zu verlieren. Daher soll bei der ersten Hybridsubstanz diese Methoxygruppe um das Linkersystem erweitert werden (I-83).



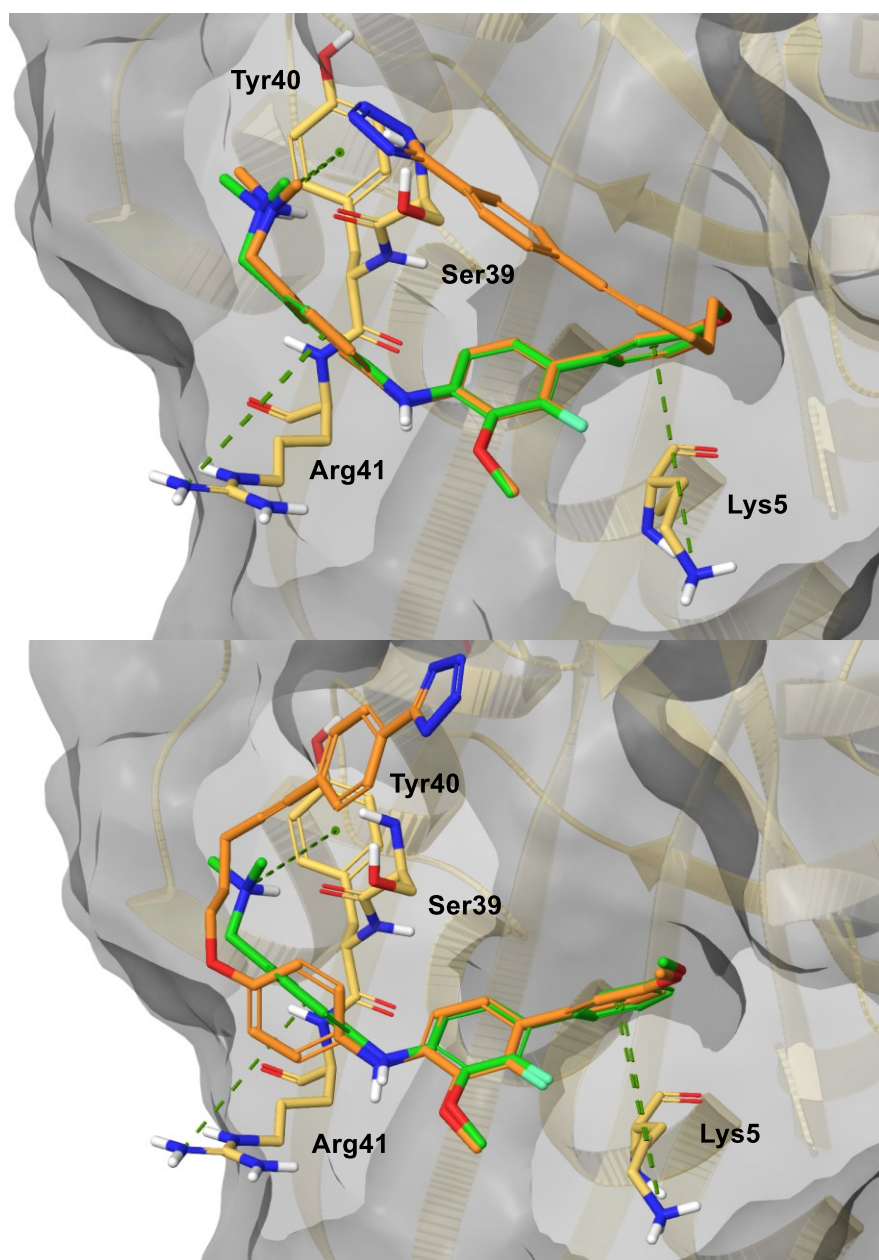
**Abb. 34:** Design der drei Hybridsubstanzen (blau = Ch-3, rot = pharmakophore Einheit von **I-22**, violett = übereinstimmender Phenylring).

Eine weitere Hybridsubstanz soll mit dem Linkersystem anstelle des tertiären Amins synthetisiert werden (**I-82**). Die dritte Hybridstruktur wird durch die direkte Substitution des tertiären Amins gegen ein Tetrazol (**I-84**) erhalten. Neben der *para*-Substitution soll die Bibliothek zusätzlich die *meta*-Substitution (**I-88**) und die *para*-Substitution mit Methylenbrücke (**I-90**) beinhalten.

**Tab. 8:** Docking Scores und MM/GBSA-Bindungsenergien (PDB: 6GQY).

	DS 6GQY (Ch-3) [kcal/mol]	MM/GBSA-Energie [kcal/mol]
<b>Ch-3 (I-17)</b>	-6.59	-67.41
<b>I-82</b>	-6.40	-56.73
<b>I-83</b>	-5.20	-69.06
<b>I-84</b>	-5.87	-65.98
<b>I-88</b>	-6.15	-59.92
<b>I-90</b>	-5.91	-66.02

Im Vorfeld wurde eine Docking-Studie aller Substanzen auf die Kristallstruktur 6GQY mit dem Liganden Ch-3 (**I-17**) durchgeführt. Zusätzlich wurden die MM/GBSA-Bindungsenergien für alle Liganden bestimmt (Tab. 8). Der Rabbits-Ligand (**I-17**) besitzt einen DS von -6.59 kcal/mol und eine entsprechende MM/GBSA Bindungsenergie von -67.41 kcal/mol. Die Docking Scores aller Liganden liegen zwischen -5.20 kcal/mol (**I-83**) und -6.40 kcal/mol (**I-82**) und somit in dem Bereich des kristallisierten Liganden **I-17**.



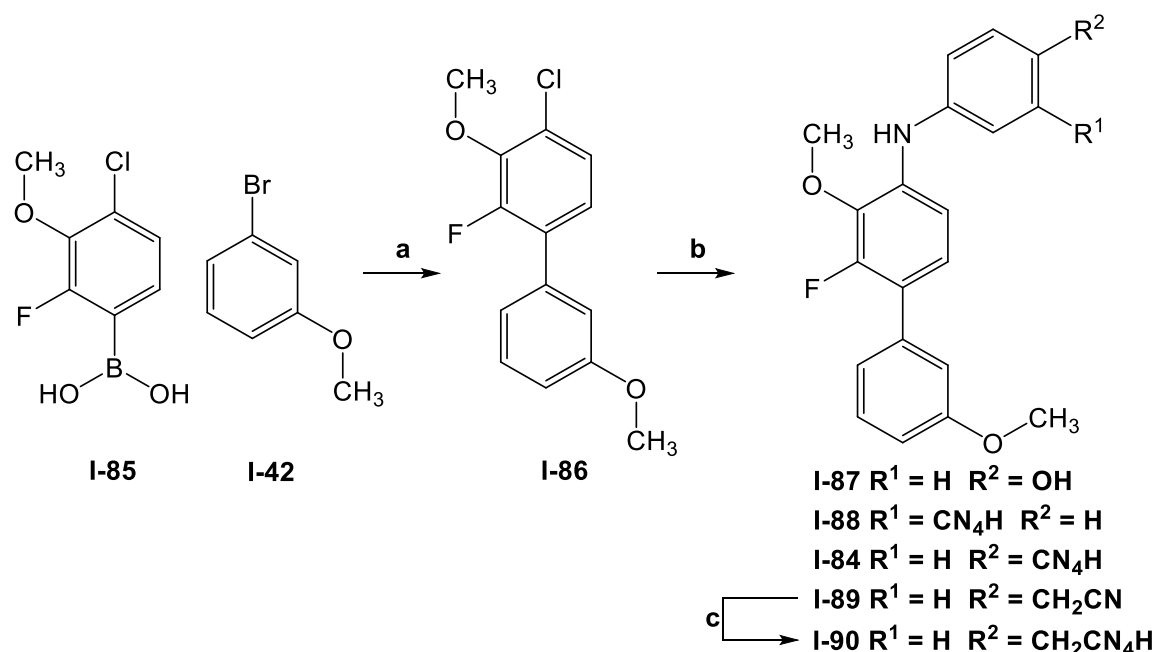
**Abb. 35:** Superposition des Rabbits-Liganden **I-17** (grün) und den Hybridverbindungen **I-82** (orange, oben) und **I-83** (orange, unten; PDB: 6GQY).

Im Gegensatz zu den Docking Scores unterscheiden sich die MM/GBSA-Werte deutlich voneinander (Tab. 8). Die beiden Hybridverbindungen mit der Alinylphenyltetrazol-Einheit **I-82** und **I-83** besitzen eine Differenz von 12,33 kcal/mol. Die Bindungsposen sind in Abb. 35 abgebildet (**I-82** unten, **I-83** oben). Das tertiäre Amin **I-83** wechselwirkt neben  $\pi$ -

Kation-Interaktionen mit Lys5, Tyr40 und Arg41 (oben grün gestrichelte Linien) zusätzlich über eine H-Brücke mit dem Ser39 (Abb. 35 oben gelb gestrichelte Linie). Das Tetrazol **I-82** zeigt dagegen lediglich die  $\pi$ -Kation-Wechselwirkung zu dem Lys5 (Abb. 35 unten), wodurch die Differenz in der MM/GBSA-Energie zu erklären ist. Die Hybridsubstanzen **I-84** und **I-90** zeigen mit -65.98 und -66.02 kcal/mol die gleiche Affinität für die GTP-gebundene K-Ras-Struktur wie die Rabbits-Verbindung **I-17**.

### 3.2.1 Synthesen

Die Synthesen der Hybridstrukturen erfolgte in Anlehnung an die von CRUZ-MIGONI *et al.* beschriebene Route.<sup>[103]</sup> Zunächst wurde in einer Suzuki-Miyaura-Kupplung das Biphenyl-Scaffold **I-86** aus der Boronsäure **I-85** und dem *m*-Bromanisol (**I-42**) mit einer sehr guten Ausbeute von 91% aufgebaut (Schema 10). Die anschließende Buchwald-Hartwig-Aminierung führte zu den vier sekundären Aminen **I-84**, **I-87**, **I-88** und **I-89**. Das *meta*-Tetrazol **I-88** wurde mit einer sehr guten Ausbeute von 87% aus dem *m*-Aminophenyltetrazol (*m*APT) gewonnen, während das *para*-Tetrazolid **I-84** mit einer vergleichsweise geringen Ausbeute von 33% aus dem *p*-Aminophenyltetrazol (*p*APT) erhalten wurde. Diese ist auf einen handwerklichen Fehler bei der säulenchromatographischen Aufreinigung zurückzuführen.

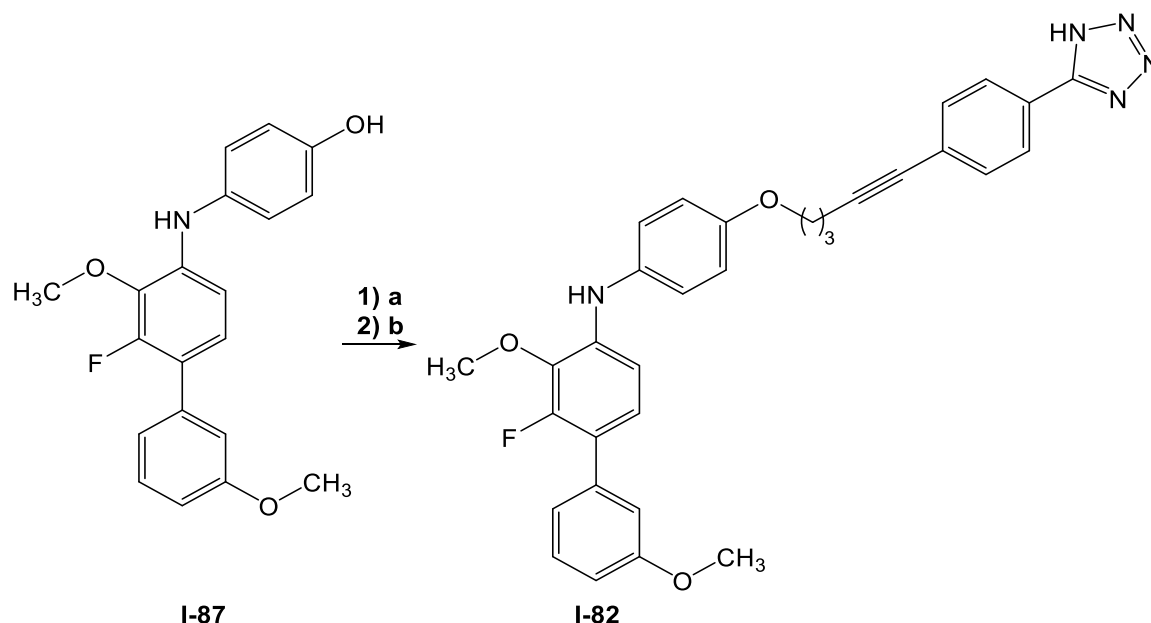


**Schema 10:** Synthese der Biphenylstrukturen. a) PdDPPF,  $K_2CO_3$ , 1,4-Dioxan/ $H_2O$  (99:1), Reflux, 17 h, 91%; b)  $Pd(OAc)_2$ , XPhos,  $Cs_2CO_3$ , 1,4-Dioxan, Reflux, 17 h, *m*Ap, **I-87** 88%, *m*APT, **I-88** 87%, *p*APT, **I-84** 33%, *p*Abn, **I-89** 75%; c)  $NaN_3$ ,  $NH_4Cl$ , DMF, 130 °C, 17 h, 73%.

Aufgrund der ausreichenden Masse des Produkts **I-84** von 48 mg wurde allerdings auf eine erneute Synthese verzichtet. Die Aminierung des Biphenyls **I-86** durch *p*-

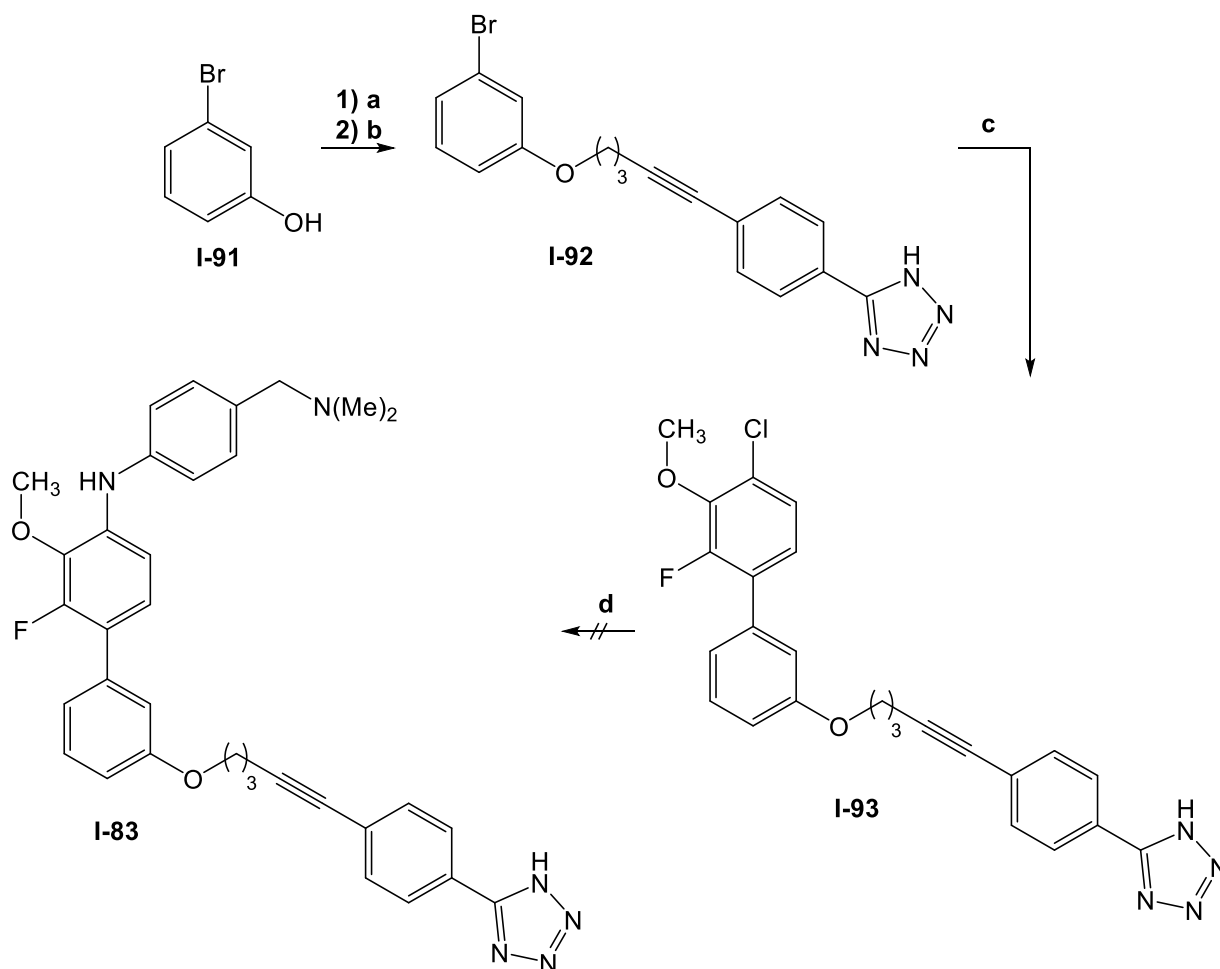
Aminobenzonitril (*p*Abn) ergab das Nitril **I-89** in einer guten Ausbeute von 75%. Außerdem lieferte die Umsetzung mit *p*-Aminophenol (*p*Ap) den Alkohol **I-87** mit einer sehr guten Ausbeute von 88% (Schema 10). Die Toleranz der Buchwald-Hartwig-Kupplung gegenüber ungeschützten Alkoholen lässt die Synthese des ungeschützten Phenols **I-87** zu.<sup>[174]</sup> Das Nitril **I-89** wurde anschließend mit  $\text{NaN}_3$  zum Benzyltetrazol **I-90** mit einer guten Ausbeute von 73% zyklisiert.

In der Folge wurde das Phenol **I-87** zu der Zielsubstanz **I-82** verethert. Bei der Substitution über das Tosylat wurde eine moderate Ausbeute von 39% über zwei Schritte erhalten (Schema 11).



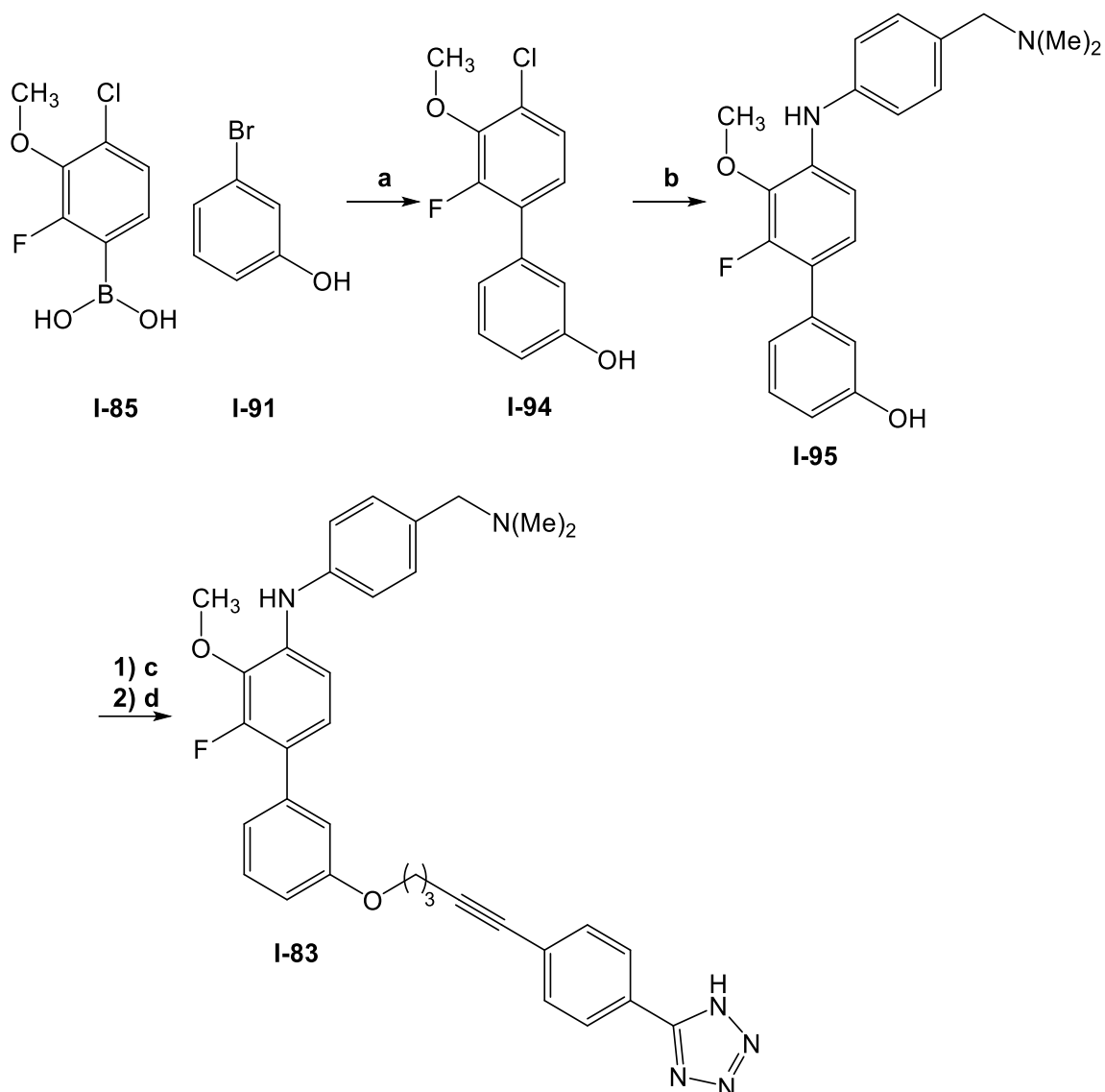
**Schema 11:** Synthese der Hybridstruktur **I-82**. a) **I-36**,  $\text{TsCl}$ , DMAP, DCM, RT, 2 h; b)  $\text{NaH}$ , DMF, RT, 17 h, 39%, über zwei Schritte.

Im ersten Schritt der Synthese zu der Hybridstruktur **I-83** wurde der Alkohol **I-36** zu dem entsprechenden Tosylat umgesetzt, das ohne Aufarbeitung mit dem *m*-Bromphenol (**I-91**) den Ether **I-92** mit einer Ausbeute von 40% über zwei Schritte lieferte (Schema 12). Die darauffolgende Suzuki-Miyaura-Kupplung mit der Boronsäure **I-85** und dem Bromid **I-92** ergab das Biphenyl **I-93** mit einer Ausbeute von 66%. Der letzte Schritt war eine Buchwald-Hartwig-Aminierung mit 4-Amino-*N,N*-dimethylbenzylamin (Adba). Bei dieser Reaktion konnte über die HPLC/MS die Umsetzung zum Produkt lediglich in Spuren beobachtet werden. Auch die Erhöhung der Katalysatormenge und des Amins führten nicht zu einem isolierbaren Produkt. Da die vorher durchgeführten Buchwald-Hartwig-Reaktionen robust gegenüber freien Tetrazolen oder tertiären Aminen waren, können diese Gruppen als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Für die Synthese des Zielprodukts **I-83** wurde nachfolgend eine andere Route eingeschlagen.



**Schema 12:** Nicht erfolgreiche Synthese der Hybridstruktur **I-83**. a) **I-35**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; b) NaH, DMF, RT, 17 h, 40% über zwei Schritte. c) **I-82**, PdDPPF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O (99:1), Reflux, 17 h, 66%; d) Adba, Pd(OAc)<sub>2</sub>, XPhos, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxan, Reflux, 17 h.

Ausgehend von *m*-Bromphenol (**I-88**) wurde in einer Suzuki-Miyaura-Kupplung mit der Boronsäure **I-85** der freie Alkohol **I-94** mit einer guten Ausbeute von 73% gewonnen (Schema 13). Mittels der Buchwald-Hartwig-Aminierung mit 4-Amino-*N,N*-dimethylbenzylamin wurde das Chlorid **I-94** anschließend in das sekundäre Amin **I-95** mit einer sehr guten Ausbeute von 96% überführt. In den letzten beiden Schritten wurde das Phenol **I-95** mit dem Alkohol **I-36** über das entsprechende Tosylat in einer guten Ausbeute von 54% über zwei Schritte verethert. Somit wurden über kurze Syntheserouten mit maximal vier Reaktionsschritten insgesamt fünf Rabbits-Hybridstrukturen hergestellt.

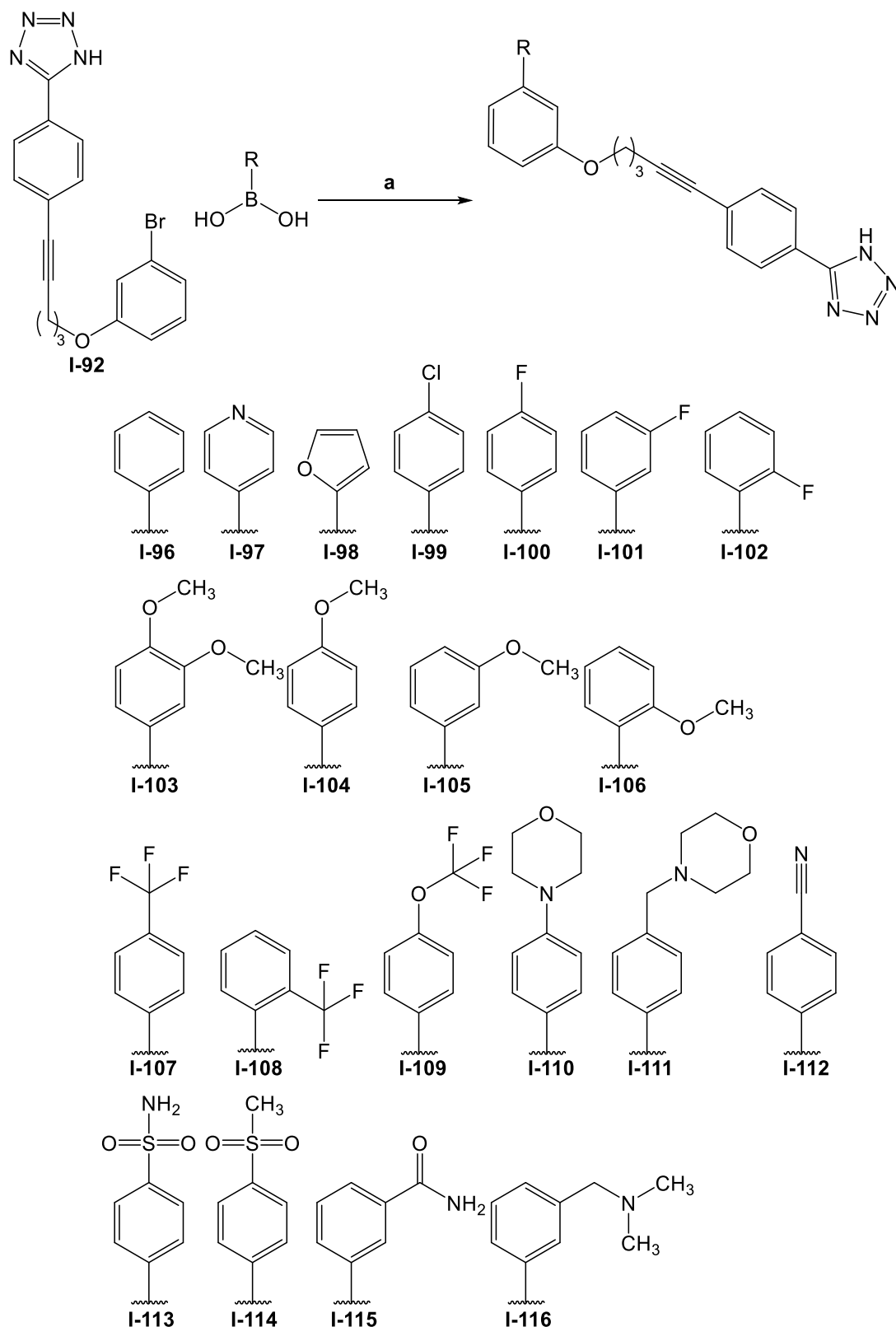


**Schema 13:** Herstellung des Tetrazols **I-83**. a) PdDPPF,  $K_2CO_3$ , 1,4-Dioxan/ $H_2O$  (99:1), Reflux, 17 h, 73%; b) Adba,  $Pd(OAc)_2$ , XPhos,  $Cs_2CO_3$ , 1,4-Dioxan, Reflux, 17 h, 96%; c) **I-36**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; d) NaH, DMF, RT, 17 h, 54% über zwei Schritte.

### 3.2.2 Synthese einer Biphenylbibliothek

Neben den Rabbits-Hybridstrukturen wurde auch das Biphenyl **I-93** von LDC im  $NA^{G12D}$  getestet. Dieses zeigte in der ersten Messung eine sehr gute Inhibitionsfähigkeit von  $IC_{50} = 0.11 \mu M$  (siehe Kapitel 3.2.3). In weiteren Messungen musste dieser Wert zwar auf einen einstelligen mikromolaren Wert korrigiert werden, allerdings folgen aus ausgiebigen SAR-Optimierungen häufig sehr potente Inhibitoren.<sup>[175]</sup> Aufgrund der chemisch einfachen Funktionalisierbarkeit des Biphenyl-Scaffolds wurde in Absprache mit LDC eine Substanzbibliothek zusammengestellt (Schema 14), die im Anschluss als Grundlage für ein QSAR-Modell für die Berechnung neuer vielversprechender Inhibitoren dienen sollte.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

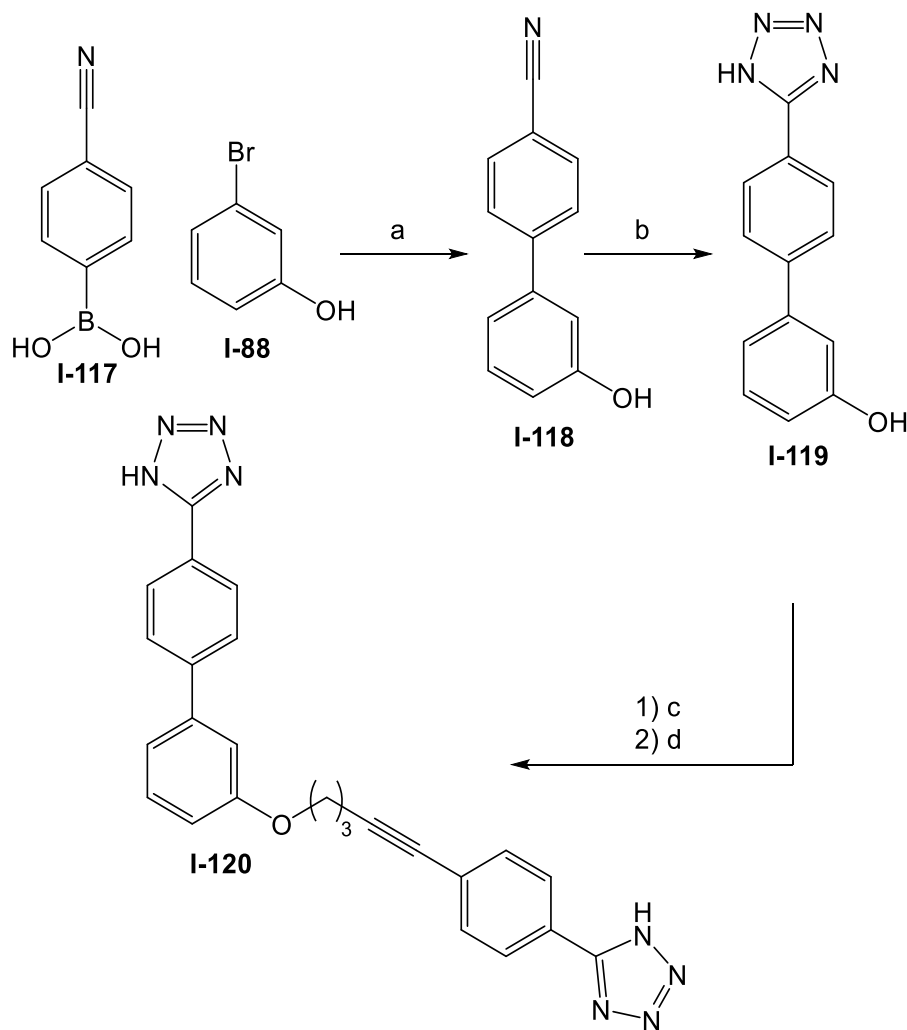


**Schema 14:** Aufbau der Biphenylbibliothek aus der Suzuki-Miyaura-Kupplung. a) PdDPPF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O (99:1), Reflux, 17 h.

Über die Suzuki-Miyaura-Kupplung wurden verschiedene Substitutionsmuster von Fluor-, Methoxy- und Morpholin-Substituenten sowie *para*-substituierte Biphenyle mit einer Trifluormethyl-, Nitril-, Sulfonylmethyl-, Aminosulfonyl-, Chlor-, Trifluormethoxy-, Amid- und einer *N,N*-Dimethylmethylene-Gruppe hergestellt. Des Weiteren wurden mit einer

### 3. Ergebnisse und Diskussion

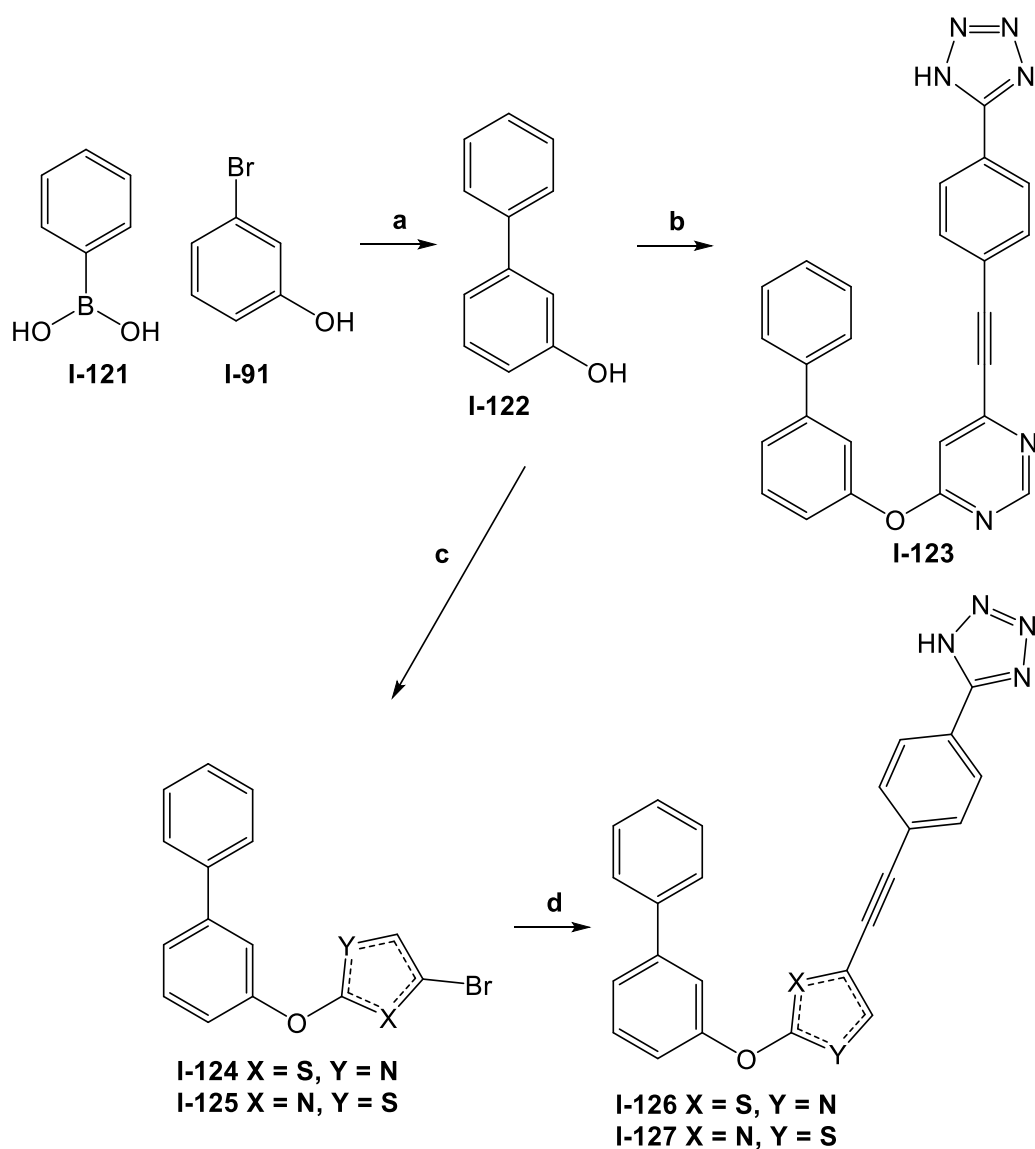
Furanyl- und einer Pyridinyl-Boronsäure zwei Heteroaromaten als alternative Ringsysteme eingefügt. Außerdem wurde eine zweite Tetrazoleinheit in *para*-Position des zweiten Rings als bioisostere Säurefunktion eingeführt. Die Verbindungen wurden in parallelen Ansätzen hergestellt und so ein entsprechender Durchsatz generiert. Nach der Filtration und der wässrigen Aufarbeitung wurden die Rohprodukte direkt über die präparative HPLC aufgereinigt. Mit diesem Verfahren wurde die gesamte Bibliothek, bestehend aus den 21 Substanzen **I-96–I-116**, innerhalb von sechs Wochen synthetisiert und charakterisiert. Während der Einführung der zweiten Tetrazoleinheit durch Zyklisierung der Cyanogruppe mit  $\text{NaN}_3$  wurde die Zersetzung des Eduktes **I-112** bei der für die Reaktion notwendigen Temperatur von 130 °C in DMF beobachtet. Deshalb wurde die zweite Tetrazoleinheit über eine alternative Vier-Schritt-Synthese eingeführt (Schema 15).



**Schema 15:** Herstellung des Ditetrazolids **I-120**. a) PdDPPF,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 1,4-Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1), Reflux, 17 h, 89%; b)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 130 °C, 17 h, 56%; c) **I-36**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; d) NaH, DMF, RT, 17 h, 16% über zwei Schritte.

Zu Beginn wurde das Biphenyl-Scaffold **I-118** über eine Suzuki-Miyaura-Kupplung in einer sehr guten Ausbeute von 89% aufgebaut. Darauffolgend wurde die Cyanogruppe mit  $\text{NaN}_3$  in einer moderaten Ausbeute von 56% zu dem Tetrazol **I-119** zyklisiert, das dann zu dem Zielprodukt **I-120** mit einer geringen Ausbeute von 16% verethert wurde.

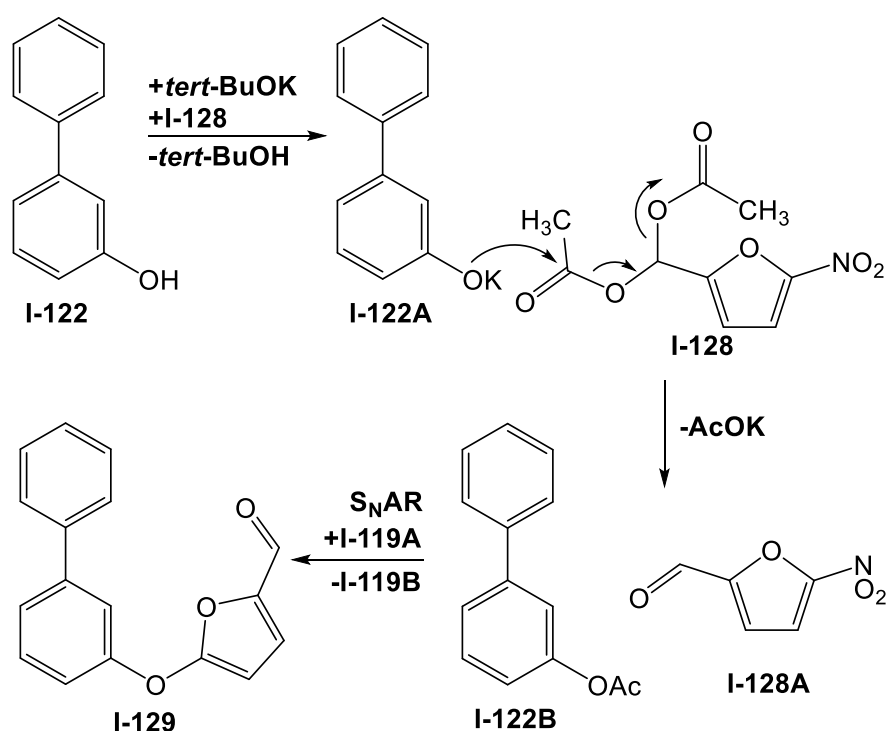
Analog zu dem Pyridazinon **I-22** wurde auch bei einer Biphenylverbindung die flexible Linkereinheit durch die Substitution der Propylkette mit einem Thiazol-, Pyridin- (Schema 16) und einem Furanring konformationell eingeschränkt. Da aus der Bibliothek in Schema 14 die Verbindung **I-96** den niedrigsten  $\text{IC}_{50}$ -Wert in den Messungen des GDP/GTP-Austauschassays aufwies (Kapitel 3.2.3.2), wurden an dem unsubstituierten Biphenyl-Scaffold die Ringsysteme eingeführt.



**Schema 16:** Synthese der disubstituierten Heteroaromaten **I-123**, **I-126** und **I-127**. a) PdDPPF,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 1,4-Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1), Reflux, 17 h, 98%; b) **I-64**,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, 80 °C, 2 h, 79%; c)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 2,4-Dibromthiazol bzw. 2,5-Dibromthiazol, DMSO, 100 °C, 3 h, **I-124** 86%, **I-125** 89%; d) **I-63**,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , CuI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 1,4-Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1), RT, 17 h, **I-126** 86%, **I-127** 81%;.

Dafür wurde aus der Phenylboronsäure **I-121** und dem *m*-Bromphenol (**I-91**) das Biphenyl **I-119** mit einer sehr guten Ausbeute von 98% hergestellt (Schema 16). Dieses wurde anschließend mit dem Pyridiniodid **I-64** zu dem Ether **I-123** mit einer guten Ausbeute von 79% umgesetzt. Außerdem wurden die Thiazole **I-124** und **I-125** regioselektiv mit reproduzierbaren, sehr guten Ausbeuten von 86% bzw. 89% isoliert. Über die Sonogashira-Reaktion mit dem terminalen Alkin **I-63** wurden die beiden Zielprodukte **I-126** und **I-127** mit 86% und 81% Ausbeute erhalten.

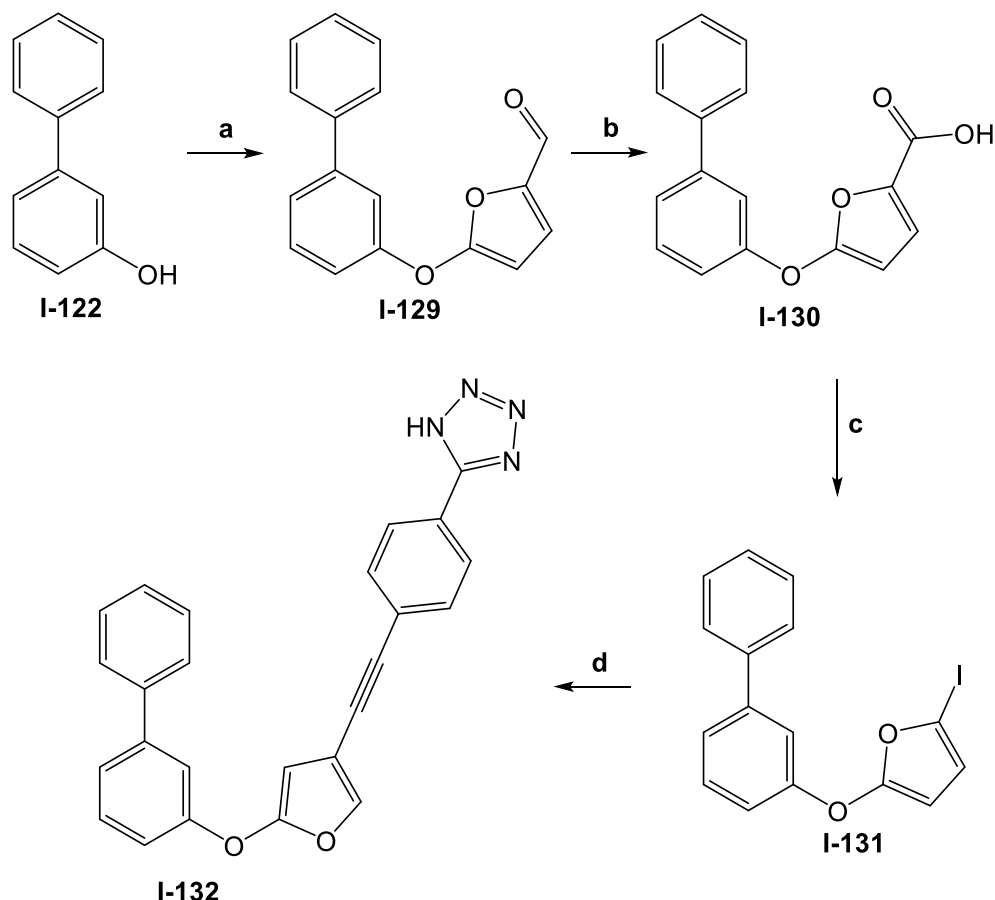
In der Syntheseroute nach DICKMAN *et al.* bestand der erste Schritt in der Veretherung des Phenols **I-122** mit 5-Nitro-2-furaldehyddiacetal **I-128** zu dem Aldehyd **I-129** mit einer Ausbeute von 52%.<sup>[176]</sup> Innerhalb dieser Reaktion wird die Nitrogruppe durch einen nukleophilen Angriff des Phenols **I-122** substituiert (Schema 17). Kalium-*tert*-butanolat sorgt als Base für die Deprotonierung des Phenols **I-122**, das daraufhin sowohl die Nitrogruppe substituiert als auch für die Spaltung des Diacetals sorgt.<sup>[177]</sup> Grund für die moderate Ausbeute ist der unvollständige Umsatz der Diacetals **I-128**. Auch eine Erhöhung der Äquivalente des Biphenyls **I-122** sowie der Reaktionstemperatur änderten diesen Umstand nicht.



**Schema 17:** Postulierter Mechanismus der Diacetalspaltung durch ein Phenolat mit anschließender nukleophiler aromatischer Substitution der Nitrogruppe.

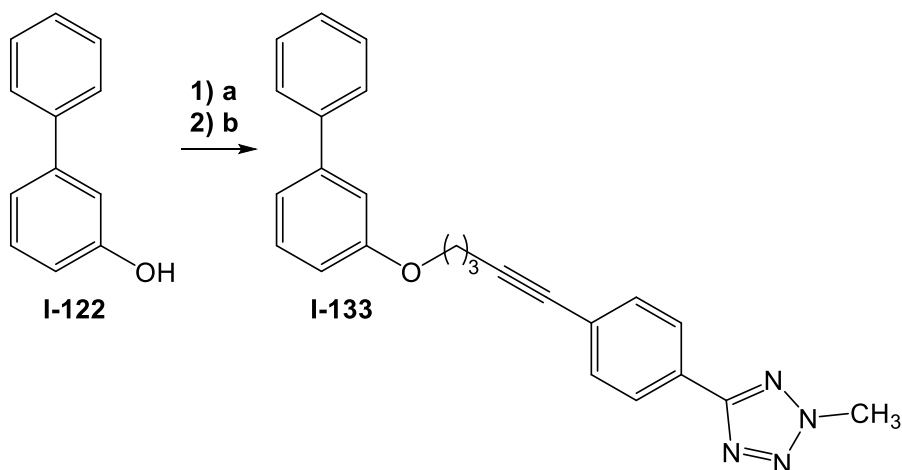
Im zweiten Schritt wurde der Aldehyd **I-129** zur entsprechenden Säure **I-130** oxidiert (Schema 18). In dieser Reaktion wurde mit 73% eine Ausbeute nahe der Literaturausbeute von 75% erhalten. Aus der Säure **I-130** wurde darauffolgend mit

Lugolscher Lösung das entsprechende Iodid **I-131** gebildet, das ohne Aufreinigung in der Sonogashira-Kupplung mit dem Alkin **I-63** zu der Zielverbindung **I-132** umgesetzt wurde.<sup>[176]</sup> Die Synthese ergab eine Ausbeute von 52% über zwei Schritte.



**Schema 18:** Syntheseroute des Furanderivats **I-132**. a) **I-128**, *tert*-BuOK, THF, 0→RT, 17 h, 52%; b) *tert*-BuOH, DMSO, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaClO<sub>2</sub>, THF, RT, 17 h, 73%; c) NaOH, KI, I<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O/EE (7:8), 50 °C, 3 h; d) **I-63**, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O (99:1), RT, 17 h, 52% über zwei Schritte

Analog zu dem Pyridazinontetrazol **I-36** wurde zusätzlich das methylierte Tetrazol **I-133** mit 52% Ausbeute über zwei Schritte hergestellt (Schema 19).

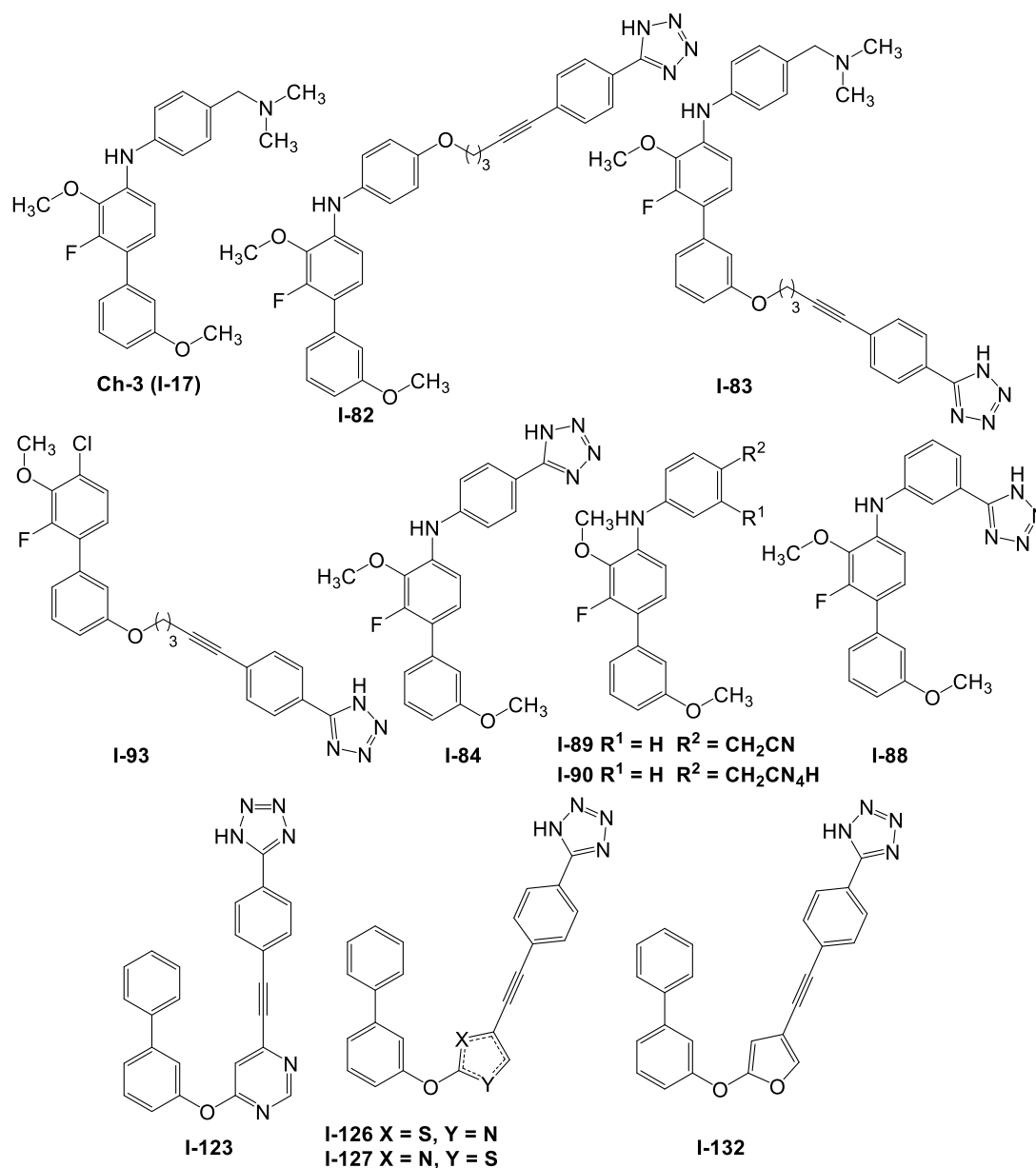


**Schema 19:** Synthese des methylierten Tetrazols **I-133**. a) **I-36**, TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; b) NaH, DMF, RT, 17 h, 52% über zwei Schritte.

## 3.2.3 Biologische Daten und Molecular Modeling

## 3.2.3.1 Rabbits-Hybride

Die biologischen Daten der Rabbits-Referenz **I-17** und der darauf basierenden Hybridsubstanzen (Abb. 36) sind in Tab. 9 aufgeführt.



**Abb. 36:** Chemische Strukturen der Substanzen aus Tab. 9.

Hieraus geht hervor, dass bis auf zwei Substanzen alle Verbindungen eine mikromolare Aktivität innerhalb des Nukleotidaustauschs im ein- bis niedrigen zweistelligen Bereich aufweisen. Lediglich das Nitril **I-89** und die Hybridsubstanz **I-83** zeigen analog zu der Referenz keine Aktivität.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 9:** Biologische Daten des Nukleotidaustauschassays

	NA <sup>G12D</sup> IC <sub>50</sub> [µM]	NA <sup>wt</sup> IC <sub>50</sub> [µM]	NA <sup>G12V</sup> IC <sub>50</sub> [µM]
<b>Ch-3 (I-17)</b>	>300	>300	n. d.
<b>I-82</b>	9.23 ± 1.21	4.35*	n. d.
<b>I-83</b>	>300	>300	n. d.
<b>I-84</b>	18.7 ± 9.12	24.3*	23.1*
<b>I-88</b>	25.1 ± 12.4	28.8*	22.7*
<b>I-89</b>	>300	>300	n. d.
<b>I-90</b>	14.7 ± 2.61	13.2*	13.9*
<b>I-93</b>	4.44 ± 2.56 0.110 <sup>a</sup>	6.01*	6.77*
<b>I-123</b>	10.6*	13.2*	n. d.
<b>I-126</b>	2.53*	4.90*	3.86 ± 0.370
<b>I-127</b>	5.35*	6.84*	n. d.
<b>I-132</b>	3.64*	5.13*	3.47*
<b>I-133</b>	>300	>300	n. d.

NA: Nukleotidaustauschassay; \*Einfachbestimmung; <sup>a</sup>Erster Messwert dieser Substanz

Während die Rabbits-Verbindung Ch-3 **I-17** als K-RasGTP-Ligand in dem Nukleotidaustausch inaktiv ist, resultiert aus der Substitution des basischen tertiären Amins (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) gegen das Tetrazol bei den Verbindungen **I-84**, **I-88** und **I-90** bemerkenswerterweise eine Aktivität im NA-Assays der G12D-Variante. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Tetrazole **I-84**, **I-88** und **I-90** liege bei 18.7 ± 9.12, 25.1 ± 12.4 bzw. 14.7 ± 2.6 µM. Die Substitution durch die Alkinyphenyleinheit führte lediglich bei der Verbindung **I-82** an der Position des tertiären Amins zu einem guten IC<sub>50</sub>-Wert von 9.23 ± 1.21 µM. Im Gegensatz dazu zeigt die an der 3'-Position mit der Alkinyphenyleinheit erweiterte Verbindung **I-83** (>300 µM) keine Inhibition des Nukleotidaustauschs. Die Substanzen **I-82**, **I-93**, **I-123**, **I-126**, **I-127** und **I-132** mit Linkereinheit zeigen mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 2.53 µM und 10.6 µM eine etwa zwei- bis dreifach stärkere Inhibition des GDP/GTP-Austauschs der G12D-Variante als die Rabbits-Hybride **I-84**, **I-88** und **I-90** ohne Linkereinheit. Die IC<sub>50</sub>-Werte des Wildtyps und der G12V-Variante liegen bei allen untersuchten Verbindungen im Bereich von der G12D-Variante.

Substanzen wie Ch-3 **I-17**, die an der aktiven K-Ras<sup>GTP</sup>-Struktur binden, sind im Na<sup>G12D</sup>-Assay unwirksam (>300µM). Die *in silico*-Ergebnisse an der Kristallstruktur 6GQY (GTP-

gebundenes K-Ras) erklären die Aktivität im NA-Assay der einzelnen K-Ras-Varianten nicht. Bei den Hybridsubstanzen ist es denkbar, dass die Substitution des tertiären Amins gegen das Tetrazol für eine unselektive Bindung an die SI/II-Bindetasche sowohl von K-Ras<sup>GDP</sup> als auch K-Ras<sup>GTP</sup>-Struktur sorgt. Daher wurden für die SI/II-Bindestelle weitere Docking Studien auf die Kristallstruktur 6ZL5 durchgeführt (Tab. 10). Für keine der in Tab. 10 aufgeführten Rabbits-Hybridsubstanzen wurde jedoch ein aussagekräftiger DS erreicht, sodass die SI/II-Bindestelle als Wirkort für die Hybridsubstanzen unwahrscheinlich ist.

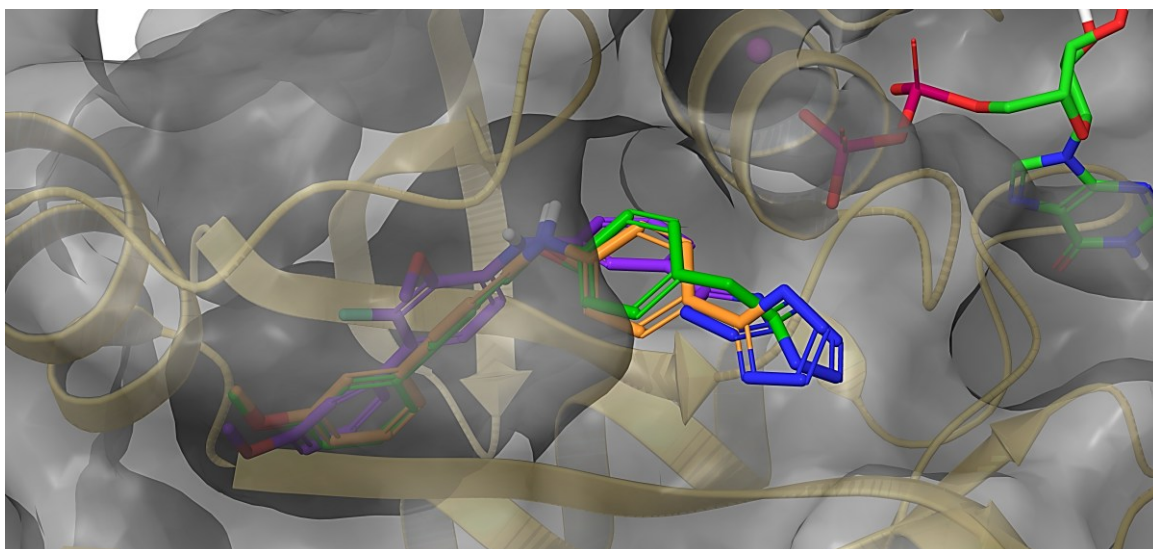
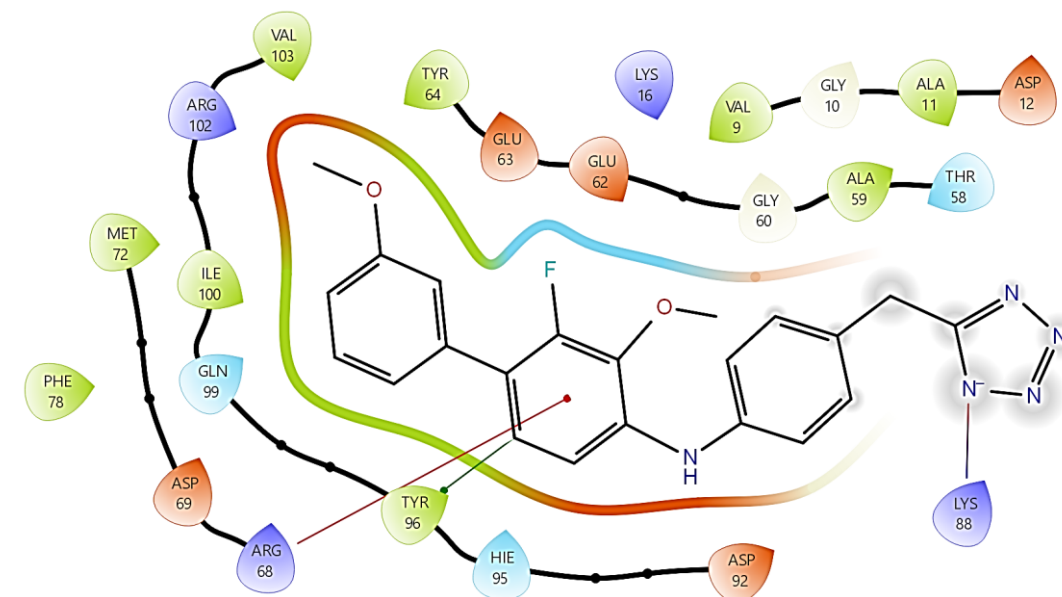
**Tab. 10:** Docking Ergebnisse der im NA<sup>G12D</sup>-Assay aktiven Substanzen

	DS 6ZL5 (BI-2852) [kcal/mol]	DS 7RPZ (MRTX1133) [kcal/mol]
<b>BI-2852 (I-15)</b>	-7.19	n. d.
<b>MRTX1133 (I-19)</b>	n. d.	-11.7
<b>I-22</b>	-2.74	-4.92
<b>I-82</b>	-4.72	-4.97
<b>I-84</b>	-3.95	-6.27
<b>I-88</b>	-4.12	-6.17
<b>I-90</b>	-4.04	-6.88
<b>I-123</b>	n. d.	-6.54
<b>I-126</b>	n. d.	-5.91

Des Weiteren wurde die SII-Bindestelle als Wirkort in Betracht gezogen. Die Substanzen **I-84**, **I-88** und **I-90** mit -6.17, -6.27 bzw. -6.88 kcal/mol günstigere Docking Scores als an der Kristallstruktur 6ZL5. Diese bleiben zwar deutlich hinter dem DS der MRTX1133-Referenz zurück, dies ist allerdings aufgrund der sub-nanomolaren Bindungsaffinität von MRTX1133 wenig überraschend. Basierend auf den biologischen Daten waren keine Docking Scores im Bereich der Referenz zu erwarten. Die Bindetasche wird durch die SII-Region (Thr58-Tyr64 und Arg68-Met72), einen Teil des P-Loops (Val9-Asp12) und den Bereich von His95 bis Val103 gebildet. Zwischen dem mittleren Phenylring und dem Arg68 werden  $\pi$ -Kation-Wechselwirkungen ausgebildet (Abb. 37 unten). Für die weitere Beurteilung der SII-Bindetasche als möglicher Wirkort wurde mit dem *Conformational Search*-Tool zunächst über Rotation der frei drehbaren Bindungen eine Reihe an energetisch günstigen Konformeren der Hybridsubstanzen **I-84**, **I-88** und **I-90** erzeugt. Von den jeweiligen Konformeren wurde die MM/GBSA-Bindungsenergie in der SII-Pocket

### 3. Ergebnisse und Diskussion

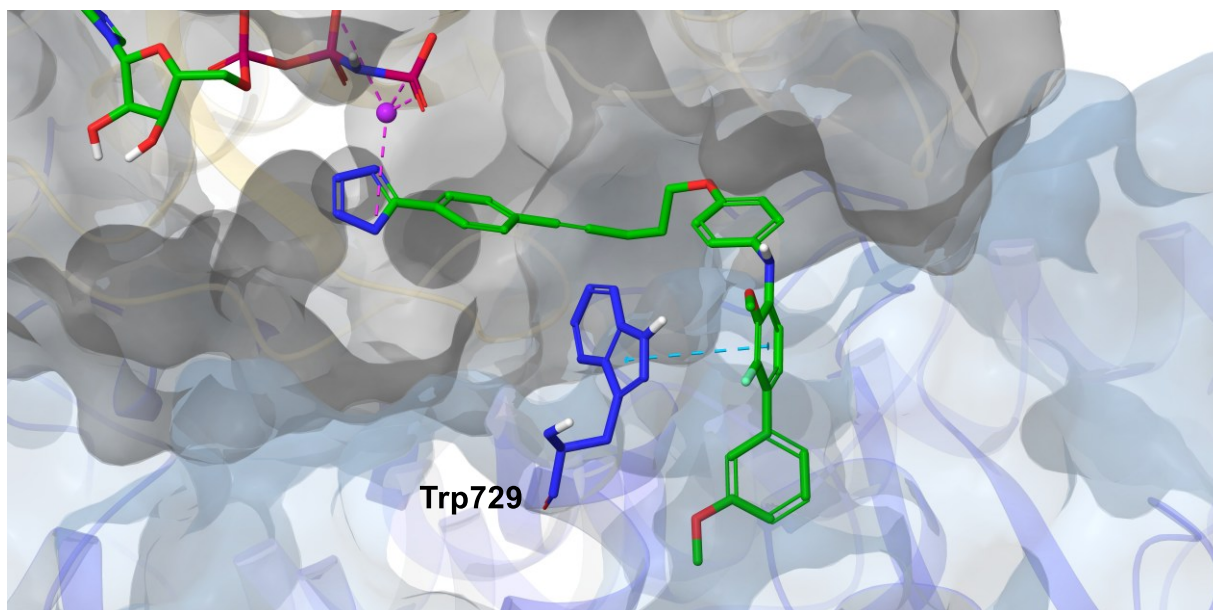
ermittelt. Die Werte für die Verbindungen **I-84** (orange), **I-88** (lila) und **I-90** (grün) waren mit -62.56, -64.61 bzw. -65.51 kcal/mol sehr ähnlich (Abb. 37 unten).



**Abb. 37:** oben: 2D-Interaktionsdiagramm von **I-90**. unten: Superposition der drei Hybridsubstanzen.

Damit zeigen die Hybridsubstanzen für die SII-Bindetasche die gleiche theoretische Bindungsaffinität wie anfangs für die Kristallstruktur 6GQY (Tab. 8). Für diese Kristallstruktur besaß auch die Rabbits-Verbindung **I-17** als Referenz eine Bindungsaffinität von -67.41 kcal/mol, sodass die *in silico*-Ergebnisse der Verbindungen **I-84**, **I-88** und **I-90** in einem plausiblen Bereich liegen. Dies wird zusätzlich durch die Superposition der drei Bindungsposen bestätigt (Abb. 37 links), die auf eine bevorzugte Bindungspose der drei Hybridsubstanzen **I-84**, **I-88** und **I-90** in der SII-Bindetasche hinweist.

Der nicht aussagekräftige DS für die Substanz **I-82** von  $-4.97$  kcal/mol und die schwächere MM/GBSA-Bindungsenergie von  $-51.78$  kcal/mol an der Kristallstruktur 7RPZ sind ein Indiz für einen anderen Wirkmechanismus als bei den Verbindungen **I-84**, **I-88** und **I-90**. Da die Verbindung **I-82** mit dem Pentinylphenyltetrazol die gleiche pharmakophore Einheit enthält und die gleichen Tendenzen in den biochemischen Daten aufweist, wurde ein möglicher Wirkmechanismus analog zum Pyridazinon **I-21** über die Bindung an das Ras<sup>all</sup>/SOS-Interface in Betracht gezogen. Innerhalb dieser Docking-Studie weist die Verbindung **I-82** mit  $-9.92$  kcal/mol eine dem Pyridazinon **I-22** nahezu identische Bindungsaffinität auf.



**Abb. 38:** Bindungspose (links) und 2D-Interaktionsdiagramm von **I-82** (SOS = blau, Ras = grau).

Dabei besetzt das Biphenyl **I-82** analog zu dem Pyridazinon **I-22** eine Bindetasche, die von der SOS-Rem-Domäne (Gln683-Asn691 und Val721-Val730) und dem SI/II-Bereich von K-Ras (SI = Tyr32-Glu37; SII = Asp57-Met67) aufgespannt wird. Statt über die Wasserstoffbrücke des Met726 zu dem Carbonylkohlenstoff des Diazingerüsts wechselwirkt das Scaffold über  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen mit dem Trp729 (Abb. 38 blau gestrichelte Linie). Der  $IC_{50}(NA^{G12D})$ -Wert von  $9.23 \mu\text{M}$  in Kombination mit dem Docking Score von  $-9.92$  kcal/mol gibt für das Biphenyl **I-82** einen Hinweis auf den gleichen Wirkmechanismus des Pyridazinons **I-22**. Allerdings sind zusätzliche Untersuchungen, wie bspw. PPI-HTRF-Assays, erforderlich, um diese Bindungshypothese weiter zu validieren.

In der Publikation zu dem Rabbits-Liganden **I-17** berichten CRUZ-MIGONI *et al.* von einer vollständigen Inhibition der pERK-Downstream-Kaskade bei einer Konzentration von

### 3. Ergebnisse und Diskussion

20  $\mu\text{m}$  für die DLD-1 Zelllinien mit einer KRas<sup>G13D</sup>-Mutation.<sup>[103]</sup> Für die G12D-Variante wurden von den Autoren keine experimentellen Daten erhoben.

In den von LDC durchgeführten pERK-Downstream-Assays zeigt keine der in Tab. 11 aufgeführten Substanzen eine Aktivität bei der G12D-Variante. In den pERK-Messungen der G12V-Variante ist die Verbindung **I-82** ebenfalls inaktiv. Positiv zu vermerken ist, dass die restlichen Verbindungen **I-84**, **I-88**, **I-90** und **I-93** in der pERK-Downstreamassays der H441-Zelllinie (G12V-Mutation) IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 13.0  $\mu\text{m}$  und 19.1  $\mu\text{m}$  aufweisen.

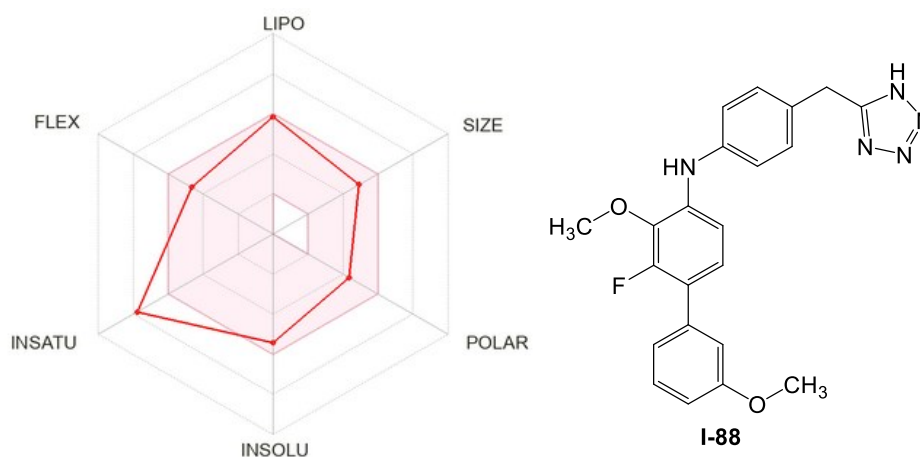
**Tab. 11:** Biologische Daten der pERK-Downstream-Kaskade der AGSo und H441-Zelllinien und die QPPCaco-Werte berechnet mit der Schrödinger-Software.

	pERK AGSo IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{m}$ ]	pERK H441 IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{m}$ ]
<b>Ch-3 (I-17)</b>	155 $\pm$ 50.6	21.7 $\pm$ 3.53
<b>I-82</b>	>300	>300
<b>I-84</b>	197*	16.5*
<b>I-88</b>	291*	14.1*
<b>I-90</b>	>300	13.0*
<b>I-93</b>	149*	19.1*

pERK: ERK-Phosphorylierungsassay; \*Einfachbestimmung

Eine Selektivität für die Valin-Mutation ist von besonderem Interesse, da es nur wenige spezifische Liganden für dieses Onkogen gibt.<sup>[178,179]</sup> Die unpolare Isopropyl-Seitenkette ist nur schwierig selektiv zu adressieren, da es keine funktionellen Gruppen gibt, die spezifische Interaktionen ausbilden. Somit stellen die Substanzen, bei denen das tertiäre Amin durch einen Tetrazolring substituiert ist, eine besonders interessante Substanzklasse für die Entwicklung selektiver G12V-Inhibitoren dar. Darüber hinaus zeigt die Berechnung der oralen Verfügbarkeit über *SwissADME*, dass fünf der sechs Parameter im optimalen Bereich liegen (Abb. 39).

### 3. Ergebnisse und Diskussion



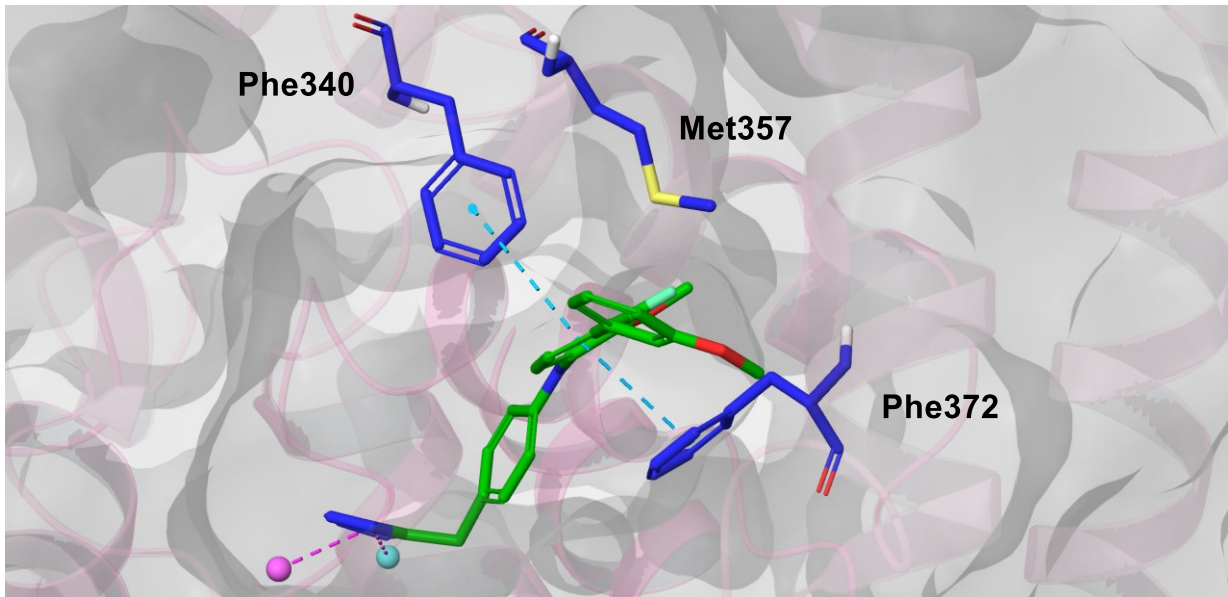
**Abb. 39:** Bioverfügbarkeitshexagramm von *SwissADME* für die Verbindung **I-87**.

Analog zu den Pyridazinonen könnte die in den zellulären Assays beobachtete Aktivität aus der Inhibition der PDE resultieren. Daher wurden für die im pERK-Assay aktiven Rabbits-Hybride **I-84**, **I-88**, **I-90** und **I-93** ebenfalls Docking-Studien auf die Kristallstruktur 8W4R der PDE4 durchgeführt (Tab. 12).

**Tab. 12:** Docking Ergebnisse der im pERK-Assay der Zelllinie H441 aktiven Verbindungen

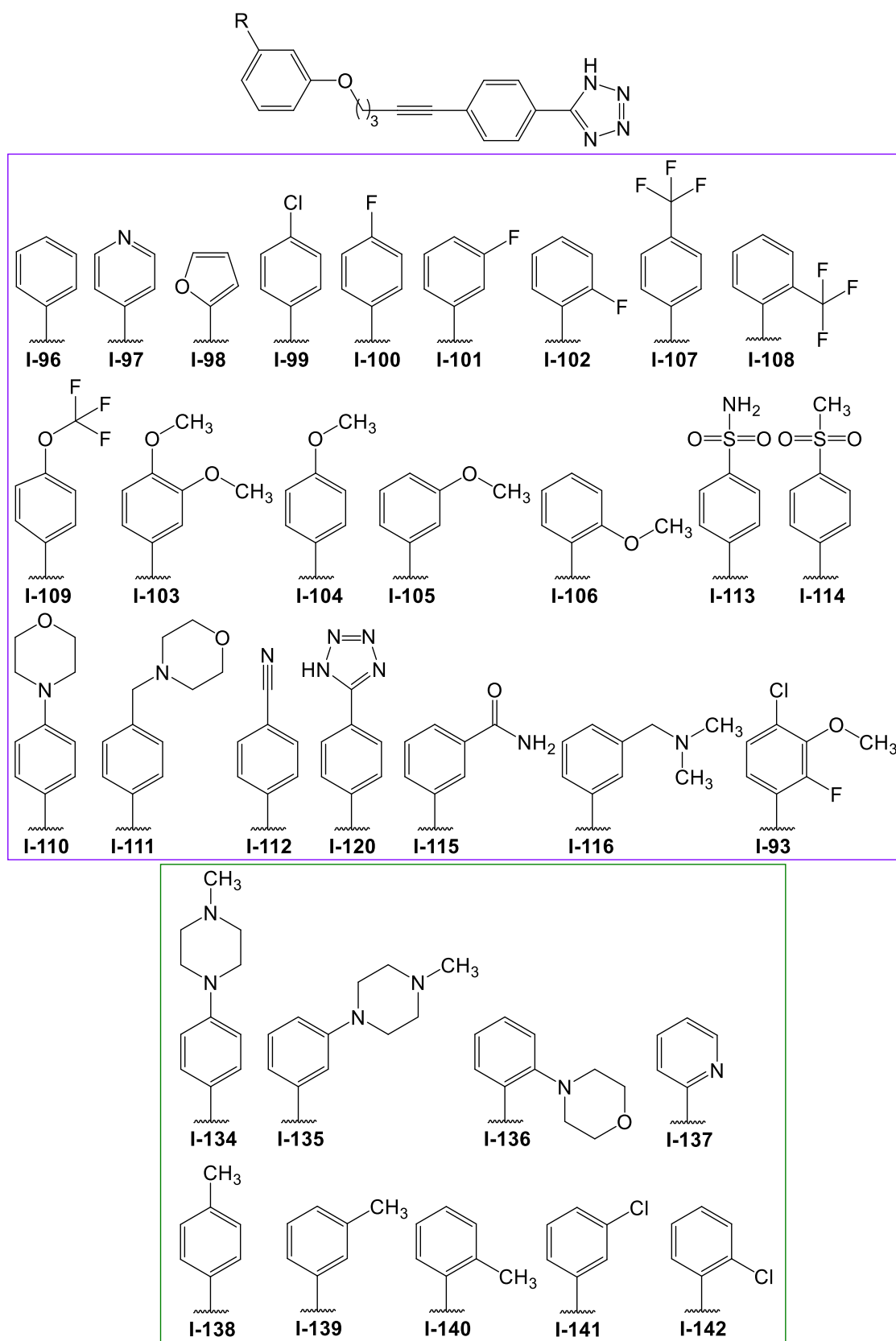
	<b>DS 8W4R [kcal/mol]</b>
<b>I-78</b>	-8.23
<b>I-84</b>	-8.30
<b>I-88</b>	-7.27
<b>I-90</b>	-8.41
<b>I-93</b>	-7.30

Genau wie die Pyridazinone zeigen auch die Rabbits-Hybride Docking Scores im Bereich von -8 kcal/mol. Die Bindungspose der Verbindung **I-90** ist in Abb. 40 abgebildet. Im Gegensatz zu den untersuchten Pyridazinonen komplexiert das Tetrazolid die beiden Co-Faktoren (magenta gestrichelte Linie). Dies war für alle gedockten Verbindungen aus Tab. 12 zu beobachten. Der mittlere Phenylring interagiert über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Phe340 und Phe372 (blau gestrichelte Linie). Die Verbindung **I-90** adressiert damit dieselben Aminosäuren innerhalb des katalytischen Zentrums der PDE4 wie der kristallisierte Inhibitor **I-78**. Somit weisen auch die Docking-Ergebnisse der Rabbits-Hybride an der Kristallstruktur 8W4R darauf hin, dass die beobachtete Aktivität in den zellulären pERK-Assays durch die Adressierung der katalytischen PDE-Bindetasche hervorgerufen werden könnte.



**Abb. 40:** Bindungspose der Verbindung **I-88** (grün,  $Zn^{2+}$  = cyan,  $Mg^{2+}$  = magenta,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen = blau gestrichelt; PDB = 8W4R).

## 3.2.3.2 Biphenylbibliothek



**Abb. 41:** Übersicht der 33 Substanzen der Biphenylbibliothek (lila = KKS-Verb., grün = LDC-Verb.).

Die eigens synthetisierten Verbindungen (lila Kasten) bilden zwei Drittel und die LDC-Verbindungen (grüner Kasten) ein Drittel der Biphenylbibliothek (Abb. 41).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 13:** IC<sub>50</sub>-Werte der Biphenylbibliothek im NA- und pERK-Assay.

	NA <sup>G12D</sup> IC <sub>50</sub> [μM]	NA <sup>wt</sup> IC <sub>50</sub> [μM]	pERK H441 IC <sub>50</sub> [μM]
I-96	3.35*	1.93*	18.2*
I-97	13.9*	6.48*	n. d.
I-98	10.3*	2.47*	25.3*
I-99	13.5*	2.90*	>30
I-100	6.23*	2.71*	20.0*
I-101	6.47 ± 1.53	3.34*	16.0*
I-102	12.5 ± 6.86	2.49*	18.5*
I-107	12.1*	2.27*	n. d.
I-108	7.90 ± 1.19	3.72*	15.0*
I-109	5.10 ± 2.19	3.17*	>30
I-103	18.3*	5.12*	8.21*
I-104	18.3*	3.74*	n. d.
I-105	8.05 ± 0.99	3.25*	15.0*
I-106	6.40 ± 3.27	3.01*	27.4*
I-113	42.8*	5.73*	13.1*
I-114	21.8*	7.26*	22.1*
I-110	22.8*	3.43*	n. d.
I-111	17.0*	5.12*	>30
I-112	8.08 ± 1.28	4.46*	17.0*
I-120	3.44 ± 1.14	1.34*	>30
I-115	37.0*	5.05*	23.6*
I-116	>300	>300	>30
I-93	4.44 ± 2.56	6.01*	19.1*
I-134	>300	>300	n. d.
I-135	>300	>300	n. d.
I-136	10.2*	4.15*	n. d.
I-137	27.7*	15.1*	n. d.
I-138	6.71*	2.91*	n. d.
I-139	8.45*	3.29*	n. d.
I-140	6.58*	2.96*	n. d.
I-141	7.19*	4.09*	n. d.
I-142	6.07*	3.69*	n. d.

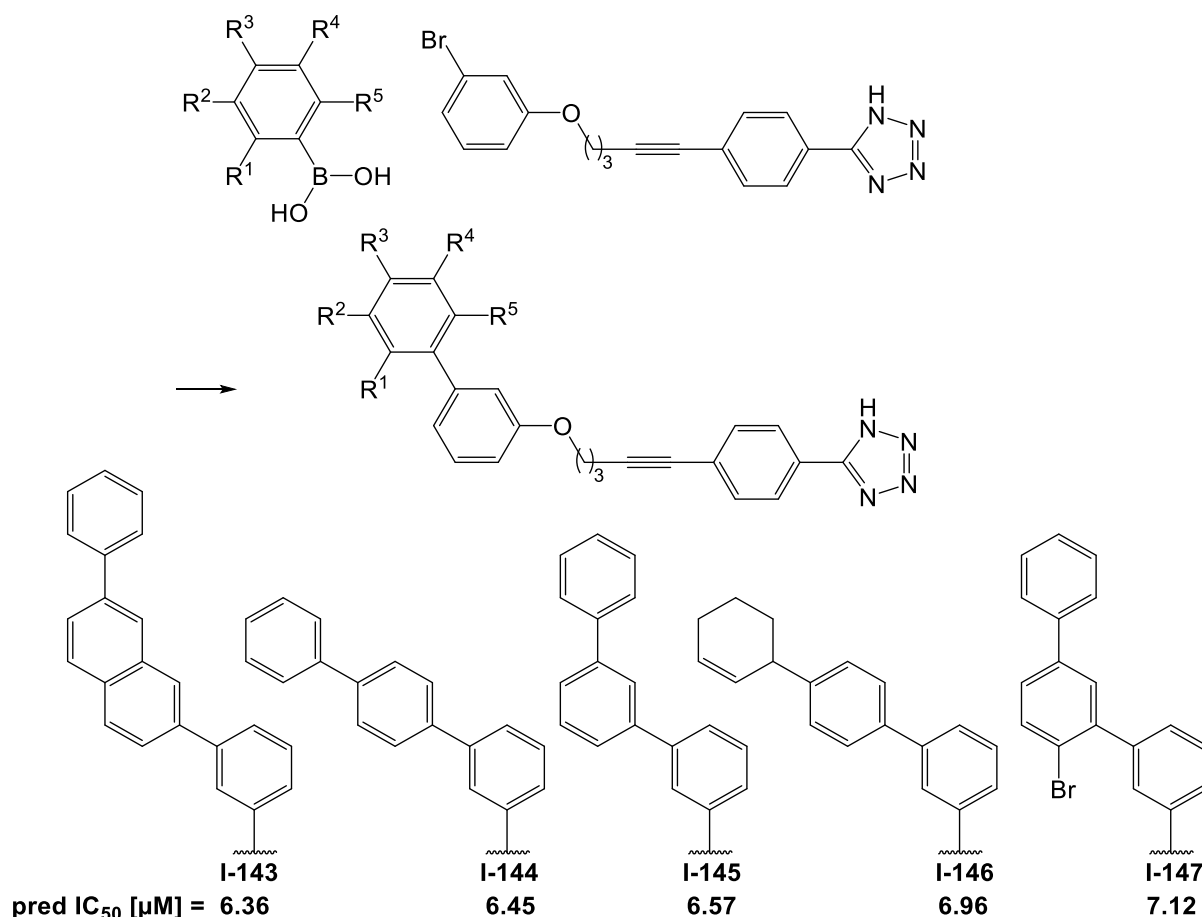
NA: Nukleotidaustauschassay; pER: ERK-Phosphorylierungsassay; \*Einfachbestimmung

Die Ergebnisse des Nukleotidaustauschassays (Tab. 13) erfüllten die Erwartungen nicht. Alle Derivate mit Ausnahme der Ausgangsstruktur **I-93** besitzen beim NA<sup>wt</sup> eine bis zu dreifach höhere Inhibitionsfähigkeit als bei der onkogenen G12D-Variante. Der Wirkungsbereich erstreckt sich im NA<sup>wt</sup> von 1.93  $\mu\text{M}$  bis 15.1  $\mu\text{M}$  und im NA<sup>G12D</sup> von 3.35  $\mu\text{M}$  bis 42.8  $\mu\text{M}$  jeweils über ungefähr eine Größenordnung.

Lediglich drei Derivate (**I-116**, **I-134**, **I-135**) sind in den Austauschassays beider K-Ras-Varianten inaktiv. Diese besitzen mit einem tertiären Amin und zwei methylierten Piperazinen in *para*- bzw. *meta*-Stellung jeweils eine basische Gruppe an dem Biphenyl-Rest. Das unsubstituierte Biphenyl **I-96** ist mit einem IC<sub>50</sub>-Wert im NA<sup>G12D</sup> von 3.35  $\mu\text{M}$  die aktivste Verbindung der gesamten Bibliothek (Tab. 13).

Die Ableitung einer detaillierten SAR war auf Basis der vorliegenden Daten aus mehreren Gründen nicht möglich. Zum einen waren die Unterschiede zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten insgesamt zu gering, zum anderen lagen bei 20 von 32 lediglich Einzelbestimmungen vor. Darüber hinaus weisen die verbleibenden Messwerte teilweise hohe Standardabweichungen auf. Beispielsweise zeigen die fluorsubstituierten Verbindungen **I-100**, **I-101** und **I-102** in dem GDP/GTP-Austauschassay der G12D-Variante IC<sub>50</sub>-Werte von 6.23  $\mu\text{M}$ , 6.47 $\pm$ 1.53  $\mu\text{M}$  und 12.5 $\pm$ 6.86  $\mu\text{M}$ , sodass unter Beachtung der Standardabweichung kein Substitutionsmuster heraussticht. Ein vergleichbarer Sachverhalt ist bei den IC<sub>50</sub>-Werten den Chloriden **I-99**, **I-141** und **I-142** und den Methoxyverbindungen **I-103** bis **I-106** zu beobachten.

Trotz der ernüchternden biologischen Daten wurde wie geplant über ein QSAR-Modell die Inhibition des Nukleotidaustauschs einer weiteren Bibliothek von 645 weiteren Biphenylderivaten vorhergesagt. Das Modell wurde von B. NAVA HÖER im Rahmen seiner Dissertation aufgestellt und wird in Projekt B (Kapitel 7.1.3) detailliert diskutiert.<sup>[180]</sup> Mit einigen MRTX-Derivaten enthält das Modell Inhibitoren, die K-Ras in nanomolaren Konzentrationen inhibieren, und umfasst eine Aktivitätsspanne im NA<sup>G12D</sup> von mehreren Größenordnungen (1 M bis 1 nM). Zusätzlich ist die Biphenylbibliothek der Tab. 13 enthalten, sodass Anlass zur Annahme bestand, potenziell aktivere Liganden als die oben aufgeführten zu finden. Für die Anfertigung der *in silico*-Bibliothek wurde die Datenbank der verfügbaren Arylboronsäuren von Enamine heruntergeladen und über die Software KNIME an das Phenylbromid-Scaffold gekoppelt. Die fünf aktivsten Substituenten der vorhergesagten Bibliothek sind in Abb. 42 aufgeführt.



**Abb. 42:** Schematische Synthese zum Aufbau der Bibliothek über KNIME und Ergebnisse der QSAR-Vorhersage.

Die aktivste Verbindung **I-143** besitzt eine theoretische Inhibition von 6.35  $\mu\text{M}$ , während die inaktivste Verbindung mit 30.1  $\mu\text{M}$  einen ungefähr um den Faktor fünf schwächeren  $\text{IC}_{50}$ -Wert aufweist. Dazu sind die vorhergesagten Verbindungen **I-143** bis **I-147** unter Beachtung der Lipinski RO5 nicht als Wirkstoffe geeignet. Die Polyphenylreste und die daraus resultierende hohe Lipophilie der Verbindungen **I-143** bis **I-147** bringen nachweislich negative ADME-Eigenschaften mit sich. So zeigen große unpolare Moleküle durch die schlechte Wasserlöslichkeit eine geringe Bioverfügbarkeit, eine unspezifische Bindung, die mit eingeschränkter Reproduzierbarkeit in ADME-Assays verbunden ist, sowie eine geringe metabolische Stabilität. Daher spricht der seifenähnliche, stark unpolare Molekülaufbau der Verbindungen **I-143** bis **I-147** deutlich gegen deren Einsatz als Wirkstoffkandidaten.

### 3.3 Pyrazolpyridine und Isoxazolpyridine

In einem HT-NA-Screening wurde von der Firma LDC unter anderem das Pyrazolpyridin **I-148** mit einer (zum damaligen Stand der Forschung) guten Aktivität von  $\text{IC}_{50}(\text{NA}^{\text{G12D}}) = 36.2 \mu\text{M}$  identifiziert (Abb. 43). Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zu

den bekannten SOS-Inhibitoren Bay-293 (**I-149**)<sup>[181]</sup> und Isoxazolpyridin **I-150**<sup>[182]</sup> sollte das Pyrazol[3,4-*b*]pyridin-Scaffold synthetisiert und mit variablen Substituenten funktionalisiert werden.

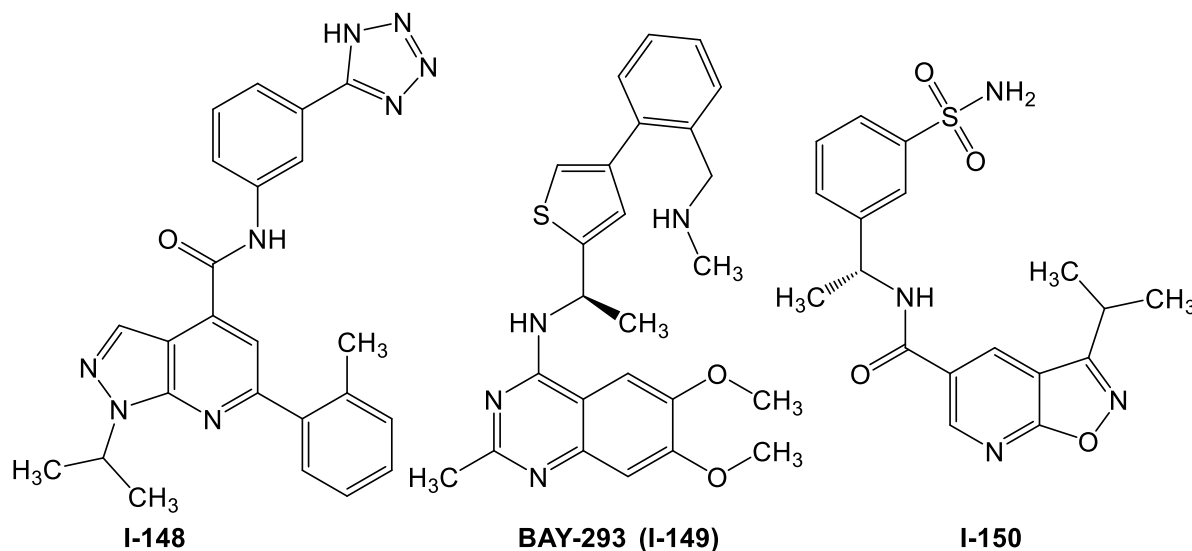


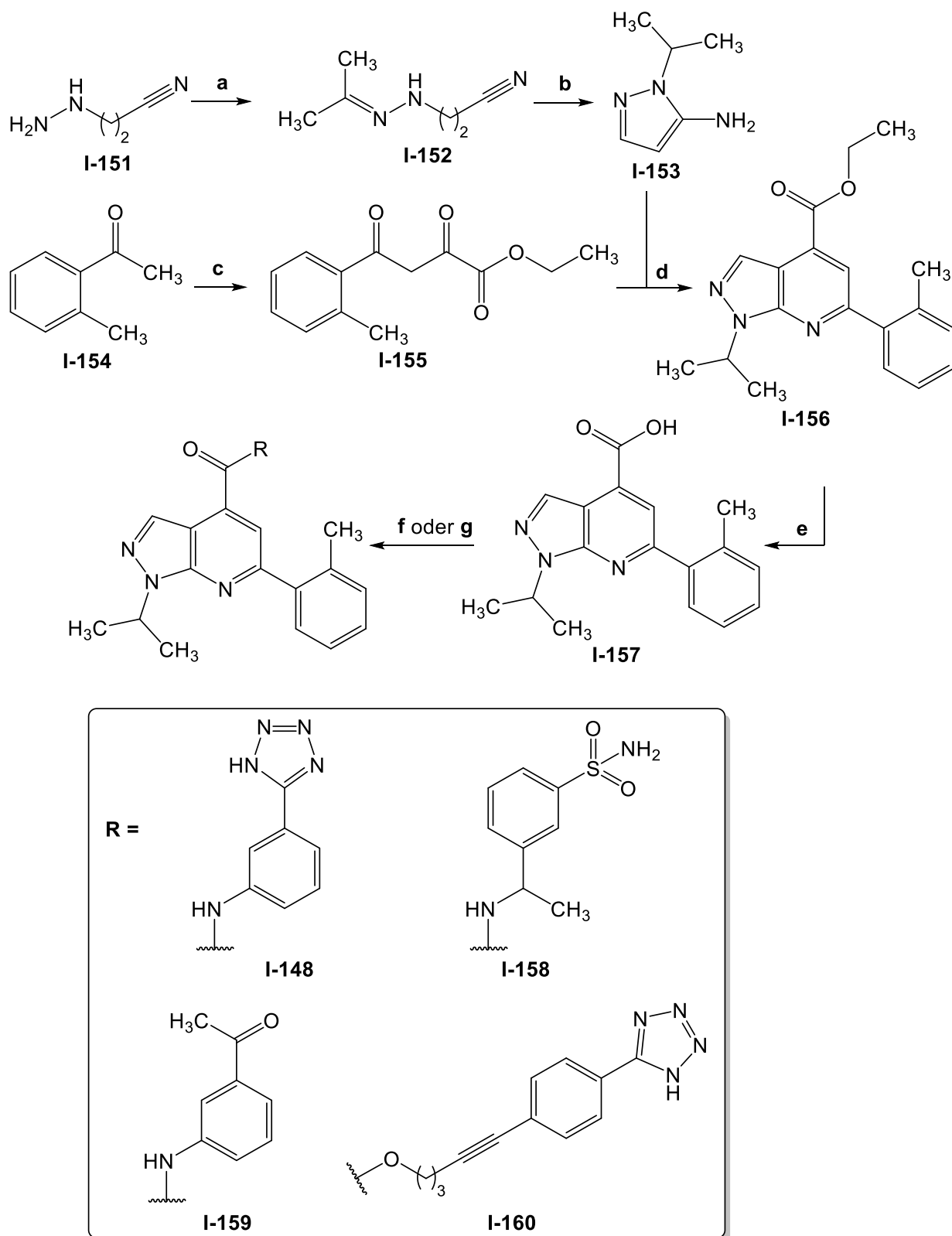
Abb. 43: Chemische Strukturen ausgewählter SOS-Inhibitoren und des LDC Hits **I-150**.

### 3.3.1 Synthesen

Die Synthese der Pyrazolpyridine erfolgte in einer konvergenten Syntheseroute nach XING *et al.* über insgesamt sechs Stufen (Schema 20).<sup>[183]</sup> Im ersten Schritt wurde aus Aceton und 2-Cyanoethylhydrazin (**I-150**) das entsprechende Hydrazon **I-151** gebildet, das im zweiten Schritt mit Natrium zum Aminopyrazol **I-152** zyklisiert wurde. Substituierte Pyrazole können über unterschiedlichste Nitril-Präkursoren gewonnen werden. Die Reduktion des Hydrazons **I-152** über Natrium bietet dabei den Vorteil, dass eine freie Aminogruppe entsteht und keine weitere Entschützung oder Eliminierung notwendig ist.<sup>[184]</sup>

Zeitgleich wurde aus dem Keton **I-154** und Diethyloxalat über eine Claisen-Kondensation der Diketocarbonsäureester **I-155** quantitativ gewonnen. Bei dieser Gleichgewichtsreaktion fällt das Produkt in trockenem Toluol aus, sodass das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite des Produktes verschoben wird. Durch eine Zyklisierung in Essigsäure wurde der Ester **I-155** mit dem Amin **I-153** zu dem Pyrazolpyridin **I-156** mit einer sehr guten Ausbeute von 95% umgesetzt. Eine Verseifung ergab die freie Carbonsäure **I-157** in einer Ausbeute von 87%. Über das entsprechende Säurechlorid von **I-157** wurden die Amide **I-148**, **I-158** und **I-159** mit Ausbeuten von 9%, 39% sowie 83% synthetisiert. Der Ester **I-160** wurde über eine Steglich-Veresterung mit einer Ausbeute von 69% gewonnen.

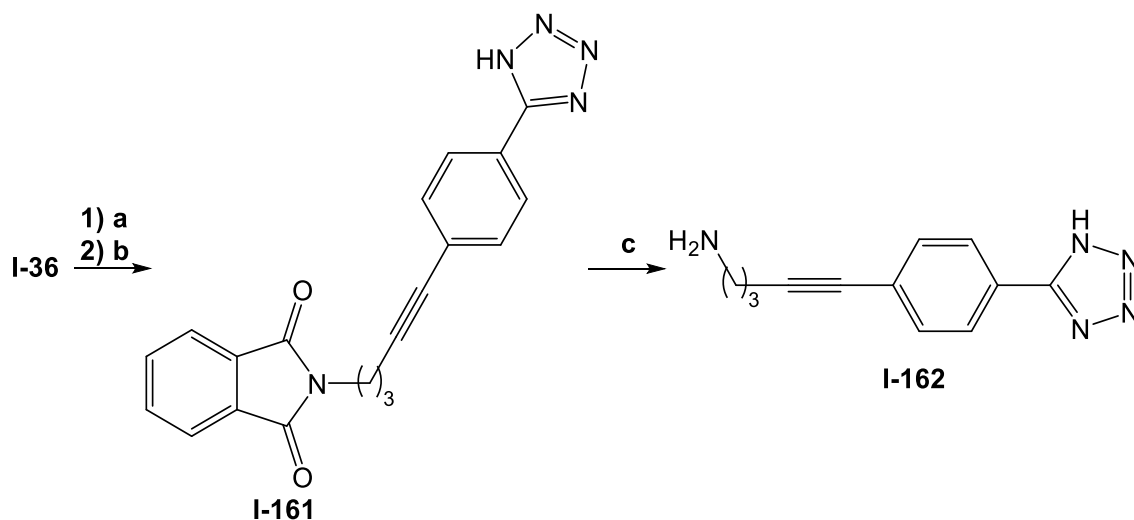
### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Schema 20:** Syntheseroute zu vier Pyrazolpyridinen. a) Aceton, RT, 17 h; b) Na, *n*-BuOH, Reflux, 16 h, 70% über zwei Schritte; c) *tert*-BuOK, Diethyloxalat, Tol, RT, 17 h, quant.; d) AcOH, Reflux, 4 h, 95%; e) KOH, DMF, RT, 4 h, 87%; f) 1. ClOCCOCl, DMF, DCM, RT, 4 h; 2. Tol, Reflux, 17 h, **I-148** 9%, **I-158** 39%, **I-159** 83%; g) **I-36**, DMAP, DIC, DCM, RT, 17 h, 69%.

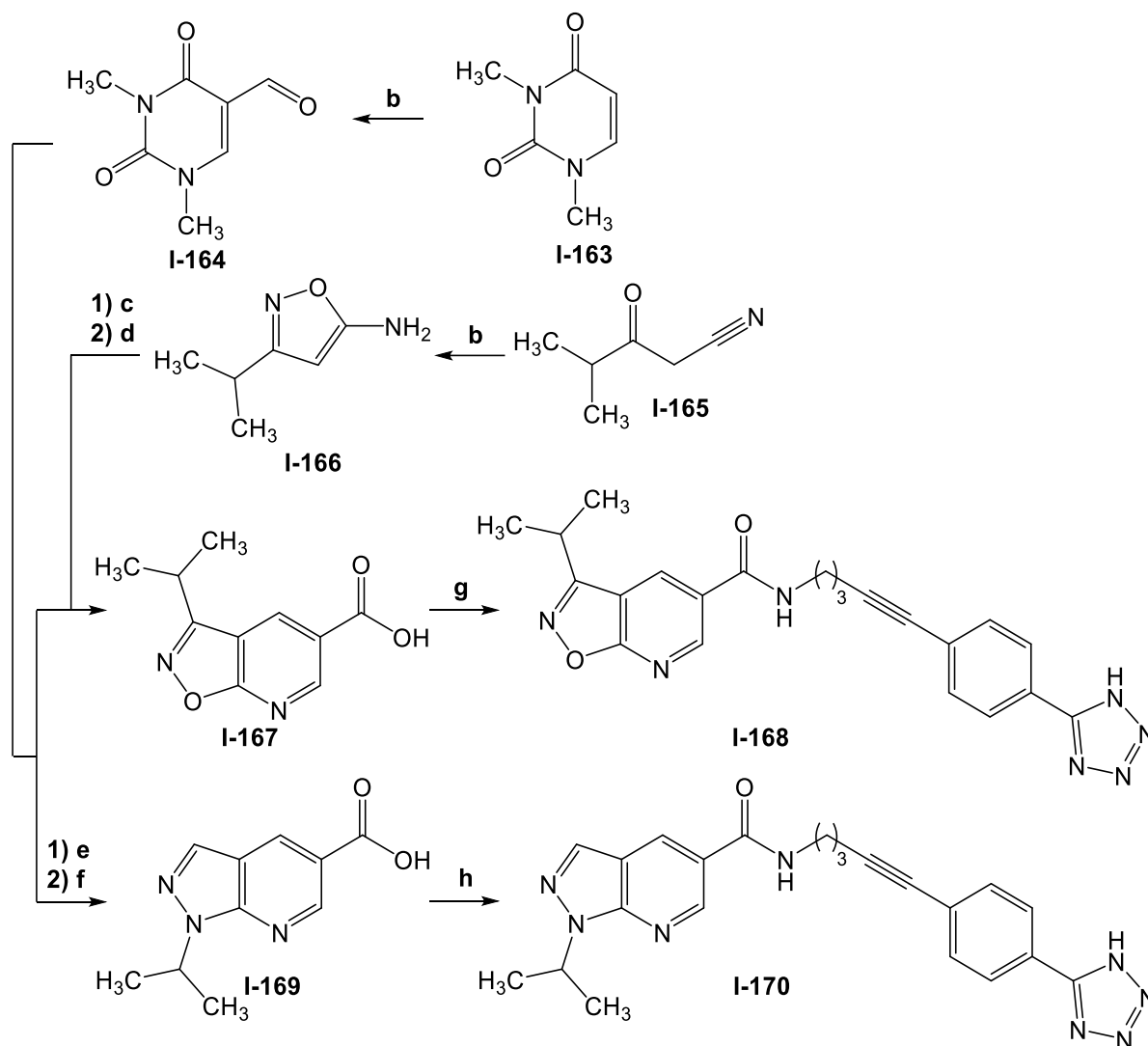
Zur Untersuchung der Bedeutung des Substitutionsmusters wurden sowohl das Isoxazol-Scaffold als auch das Pyrazolpyridin-Scaffold mit dem Alkinylphenyltetrazol **I-36** in *meta*-Stellung zum Pyridinstickstoff gekoppelt (Schema 21). Damit die physiologisch stabilere

Amidfunktion des von der Firma *Böhringer Ingelheim* identifizierten Sulfonamins **I-150** erhalten bleibt, wurde der Alkohol **I-36** in das Amin **I-162** überführt. Hierzu wurde das entsprechende Tosylat mit Kaliumphthalimid und [18]Krone-6 als Katalysator in das Phthalimid **I-161** in einer Ausbeute von 61% umgewandelt. Anschließend wurde durch eine Hydrazinolyse das primäre Amin **I-162** in einer moderaten Ausbeute von 59% erhalten. Die Aufreinigung des Produkts **I-162** gestaltete sich aufgrund der Wasserlöslichkeit und des Phthalhydrazid-Nebenprodukts aufwendig.



**Schema 21:** Einführung der Aminogruppe. a) TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; b) KPhthalimid, [18]Krone-6, DMF, RT, 17 h, 61% über zwei Schritte; c)  $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, Reflux, 3 h, 59%.

Im ersten Schritt wurde mittels einer Vilsmeier-Haack-Reaktion *N,N*-Dimethyluracil (**I-163**) zum Aldehyd **I-164** mit 69% Ausbeute umgesetzt (Schema 22).<sup>[185]</sup> Über die Zwischenstufe eines Pyrimidoylharnstoffs synthetisierten MITYUK *et al.* neben Pyrazolpyrimidinen und Isoxazolpyridinen zusätzlich Pyridinpyrimidione, Thiazolpyridine, Thiophenpyridine und Difuropyridine.<sup>[186]</sup> Für die Synthese des Isoxazol-Scaffolds wurde das primäre Amin **I-166** aus 4-Methyl-3-oxopentannitril (**I-165**) und Hydroxylamin mit einer Ausbeute von 71% gewonnen. Die primären Amine **I-153** sowie **I-166** zusammen mit dem Aldehyd **I-164** lieferten die freien Carbonsäuren **I-167** mit einer Ausbeute von 77% und **I-169** mit einer Ausbeute von 69%, jeweils über zwei Schritte. Im letzten Schritt wurde das Amid aus der Kupplung der entsprechenden Säuren mit dem Amin **I-166** erhalten. Die Zielprodukte **I-168** und **I-170** wurden dabei mit 53% bzw. 42% Ausbeute isoliert.



**Schema 22:** Syntheseroute zu den Heterozyklen **I-168** und **I-170**. a)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , DMF,  $90^\circ\text{C}$ , 1 h, 69%; b)  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1),  $80^\circ\text{C}$ , 15 min, 71%; c)  $\text{AcOH}$ , Reflux, 2 h; d)  $\text{HCl}$ ,  $\text{AcOH}$ , Reflux, 4 h, 77% über zwei Schritte; e) **I-157**,  $\text{AcOH}$ , Reflux, 2 h; f)  $\text{HCl}$ ,  $\text{AcOH}$ , Reflux, 4 h, 69%; g) **I-36**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 17 h, **I-168** 53%, **I-170** 42%.

### 3.3.2 Biologische Daten

Das Tetrazol **I-148** zeigt im NA  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $36.2\ \mu\text{M}$  für die G12D-Variante und  $42.8 \pm 30.6\ \mu\text{M}$  für den Wildtyp. Zu Beginn der Promotion wurde dies noch als aussichtsreiche Aktivität bewertet, erwies sich dies im weiteren Verlauf der Arbeiten jedoch im Vergleich zu neueren Referenzsubstanzen als schwach. Das Sulfonamin **I-159** und das Phenylmethylketon **I-160** sind jeweils inaktiv. Das Alkinylphenyltetrazol **I-160** weist dagegen mit  $2.75\ \mu\text{M}$  eine gute Aktivität im Nukleotidaustauschassay auf. Nach Einführung des Alkinyl-Linkers ist die Inhibition des GDP/GTP-Austauschs der  $\text{K-Ras}^{\text{G12D}}$ -Variante etwa um den Faktor 18 verbessert. Damit ist die Verbindung **I-160** zwar um das Fünffache potenter als die Referenz **I-150** mit  $13.6\ \mu\text{M}$ ., allerdings um den Faktor 10 schlechter als die beiden Verbindungen **I-149**. Eine Selektivität zum Wildtyp

### 3. Ergebnisse und Diskussion

wurde nicht beobachtet. Die Aktivität ist dabei signifikant von dem Substitutionsmuster abhängig. Sowohl das *meta*-substituierte Isoxazolpyridin- **I-168** als auch das *meta*-substituierte Pyrazolpyridin **I-170** weisen keine biologische Aktivität im GDP/GTP-Austauschassay auf.

**Tab. 14:** IC<sub>50</sub>-Werte des GDP/GTP-Austauschassays

	NA <sup>G12D</sup> IC <sub>50</sub> [μM]	NA <sup>wt</sup> IC <sub>50</sub> [μM]	NA <sup>G12V</sup> IC <sub>50</sub> [μM]
<b>Bay-293 (I-149)</b>	0.241 ± 0.219	0.339*	<0.300
<b>I-150</b>	36.2*	42.8 ± 30.6	51.2 ± 29.0
<b>I-148</b>	13.6*	14.9*	34.6*
<b>I-158</b>	n. d.	>300	n. d.
<b>I-159</b>	>300	>300	n. d.
<b>I-160</b>	2.75*	2.03*	6.75 ± 0.510
<b>I-168</b>	>300	n. d.	n. d.
<b>I-170</b>	>300	n. d.	n. d.

NA: Nukleotidaustauschassay; \*Einfachbestimmung

Die Verbindung **I-148** zeigt im PPI-HTRF-, Nano-BRET- und pERK-Assay keine Aktivität. Die gute Aktivität aus dem Nukleotidaustauschassay der Verbindung **I-160** geht im zellulären pERK-Downstreamassay der G12D-Variante verloren. Für die onkogene G12V-Variante zeigt das Tetrazol **I-160** eine geringe Aktivität von 18.0 μM auf (Tab. 15). Aufgrund der deutlich geringeren Aktivität im Vergleich zu den Referenzsubstanzen und der fehlenden Daten im Nano-BRET- und PPI-Assay konnte für die Substanz **I-160** kein belastbarer Rückschluss auf einen möglichen Bindungsmodus gezogen werden.

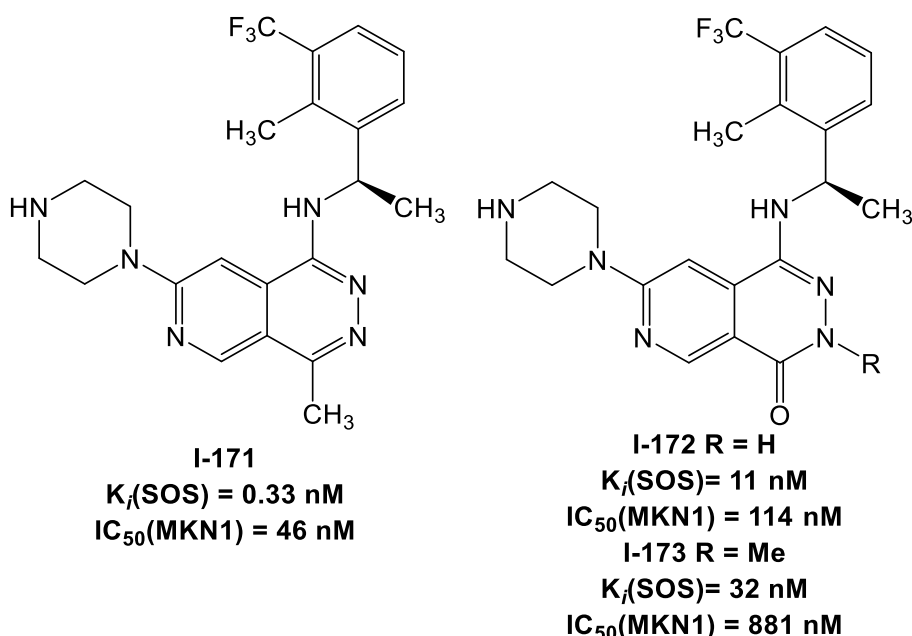
**Tab. 15:** Biologische Ergebnisse des NanoBRET-, PPI-, und pERK-Assays

	NanoBRET (G12D) IC <sub>50</sub> [μM]	PPI-HTRF IC <sub>50</sub> [μM]	pERK AGSo IC <sub>50</sub> [μM]	pERK H441 IC <sub>50</sub> [μM]
<b>Bay-293 (I-151)</b>	>100	<1.15	2.03*	7.69*
<b>I-150</b>	>100	>30	>30	>30
<b>I-164</b>	n. d.	n. d.	>30	18.0*

PPI-HTRF: K-Ras<sup>wt</sup>/SOS-PPI-HTRF-Assay; pERK: ERK-Phosphorylierungsassay; \*Einfachbestimmung

### 3.4 MRTX-0902-Hybrid und Scaffold-Variation

2022 publizierte die Firma *Mirati Therapeutics* die Verbindung MRTX-0902 (**I-195**), die analog zu den Pyridazinonen aus Kapitel 3.1 ein bicyklisches Diazin-Scaffold besitzt.<sup>[187]</sup> Als SOS-Ligand besitzt die Substanz **I-174** eine Bindungsaffinität von  $K_i(\text{SOS}) = 0.91 \text{ nM}$  im subnanomolaren Bereich und inhibiert die ERK-Phosphorylierung in MKN1-Zelllinien mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 46 nM. Im Rahmen der SAR-Optimierungen untersuchten KETCHAM *et al.* auch die Pyridazinone **I-172** und **I-173** (Abb. 44). Diese wiesen zwar zweistellig nanomolare Bindungsaffinitäten zu dem SOS-Protein auf, die allerdings um zwei Größenordnungen schwächer waren als für das methylierte Pyridinpyrazin **I-171** mit subnanomolarer Affinität (0.33 nM). Die Methylgruppe des Diazinrings unterbindet die Oxidation zum Pyridazinon und erhöht die metabolische Stabilität des Scaffolds.



**Abb. 44:** SOS-Inhibitoren mit Pyridazin- und Pyridazinon-Scaffolds und die dazugehörigen biologischen Daten.

Die Bildung des  $\text{Ras}^{\text{kat}}/\text{SOS}$ -Komplexes wird über die Bindung des Liganden **I-174** an die Cdc25-Domäne von SOS verhindert. Mittels einer Kombination des MRTX-Scaffolds mit der pharmakophoren Einheit der Verbindung **I-22** sollte untersucht werden, ob die Substitution des Pyridazinon- gegen das Pyridazin-Scaffold auch bei dem Inhibitor **I-22** zu einer Steigerung der Bindungsaffinität führt (Abb. 45a).

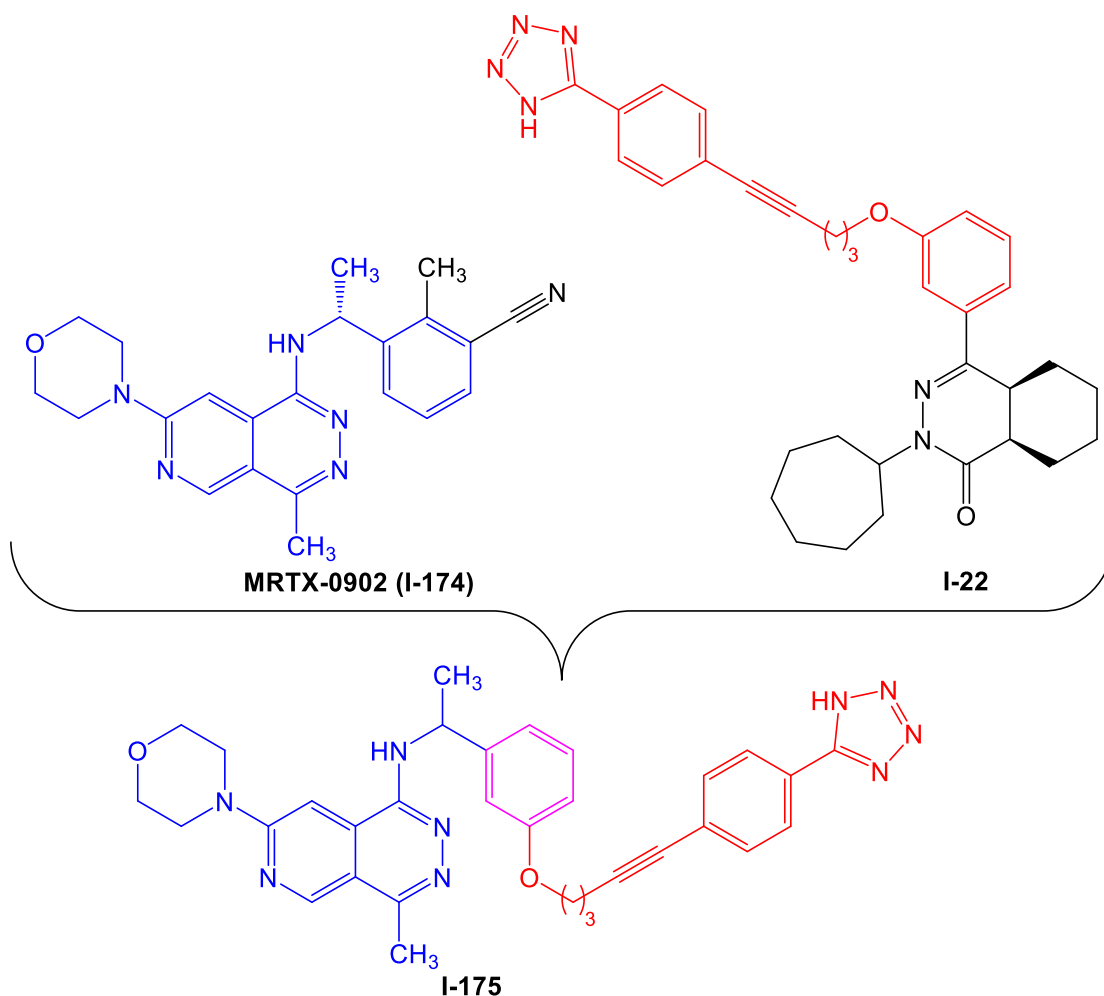


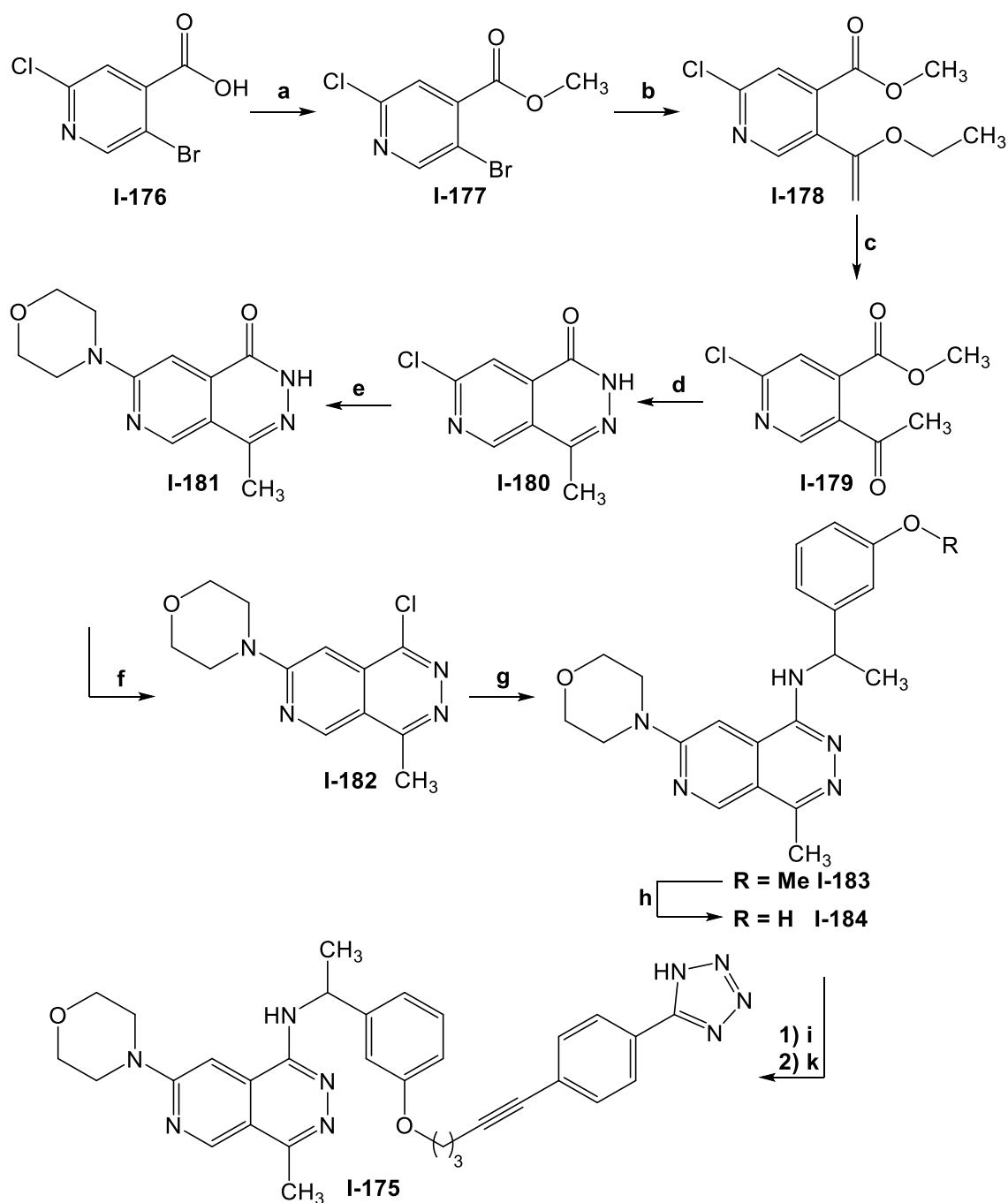
Abb. 45: Design der Hybridstruktur I-175.

### 3.4.1 Synthesen

Die ersten vier Stufen der Synthese erfolgten analog zu KETCHAM *et al.* (Schema 23). Nach einer Methylierung, gefolgt von einer Stille-Kupplung, einer sauren Enoletherspaltung mit anschließender Zyklisierung des Esters I-179, wurde das Diazin I-180 mit einer Ausbeute von 62% über vier Stufen erhalten.<sup>[188]</sup>

Bei der Zyklisierungsreaktion waren nicht nur die eingesetzten Äquivalente des Hydrazins, sondern auch die Reaktionszeit entscheidend. KETCHAM *et al.* führten diese Reaktion mit drei Äquivalenten Hydrazin bei einer Reaktionszeit von 30 min durch. Unter diesen Bedingungen wurde neben der Bildung des Produkts auch die Substitution des Chlorids gegen das Hydrazin beobachtet. Mit 1.5 Äq. Hydrazin und einer Reaktionszeit von 20 min konnte jedoch die Bildung des Nebenprodukts verhindert und eine gute Ausbeute von 76% erhalten werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion



**Scheme 23:** Synthese der Hybridverbindung **I-175**. a)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH, Reflux, 4 h, 97%; b) Tributyl(1-ethoxyvinyl)zinn,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , Dioxan, 80 °C, 17 h, c) konz. HCl, THF, RT, 17 h, 84% über zwei Schritte; d)  $\text{H}_2\text{NNH}_2$ , EtOH, Reflux, 20 min, 76%; e) Morpholin, DIPEA, EtOH, Reflux, 20 min, 92%; f)  $\text{POCl}_3$ , 110 °C, 3 h, 86%; g) 3(1-Aminoethyl)phenol,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , RuPhos,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , Dioxan, Reflux, 17 h, 81%; h)  $\text{BBr}_3$ , DCM, RT, 17 h, 85%; e) **I-36** TsCl, DMAP, DCM, RT, 2 h; f) NaH, DMF, RT, 17 h, 52% über zwei Schritte.

Nach einer nukleophilen aromatischen Substitution des Chlorids gegen Morpholin wurde das Pyridazin **I-182** anschließend durch eine Aromatisierung mit Phosphorylchlorid mit einer guten Ausbeute von 79% über zwei Schritte gewonnen.

Für die Einführung des Substituenten am Diazin-Ring nutzten KETCHAM *et al.* eine Substitutionsreaktion mit Caesiumfluorid in DMSO. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde jedoch lediglich die Hydrolyse des Chlorids **I-182** und keine Umsetzung zum

gewünschten Produkt beobachtet. Auch der Einsatz von Caesiumcarbonat oder Caesiumhydroxid änderten diesen Umstand nicht. Daher wurde der Substituent über eine Buchwald-Hartwig-Aminierung eingeführt. Diese verhindert nicht nur die Hydrolyse des Chlorids, sondern lieferte zudem mit 81% eine deutlich höhere Ausbeute als die von den Autoren beschriebene Substitutionsreaktion mit 43%. Nach der Entschützung der Methoxygruppe erfolgte die Bildung des Zielprodukts **I-175** über die Veretherung des Phenols **I-184** in 52% Ausbeute über zwei Schritte. Die Gesamtausbeute des Pyridazins **I-175** betrug 17% über zehn Schritte.

### 3.4.1 Biologische Daten

Die Verbindung **I-175** zeigt in dem Nukleotidaustauschassay der K-Ras<sup>G12D</sup>-Mutante einen schwachen IC<sub>50</sub>-Wert von 38.2 ± 5.01 µM, der in etwa um den Faktor 10 höher ist als bei dem Pyridazinon **I-22** (Tab. 16).

**Tab. 16:** Biologische Daten des Nukleotidaustauschassays für den *wt* und die K-Ras<sup>G12D</sup>-Variante

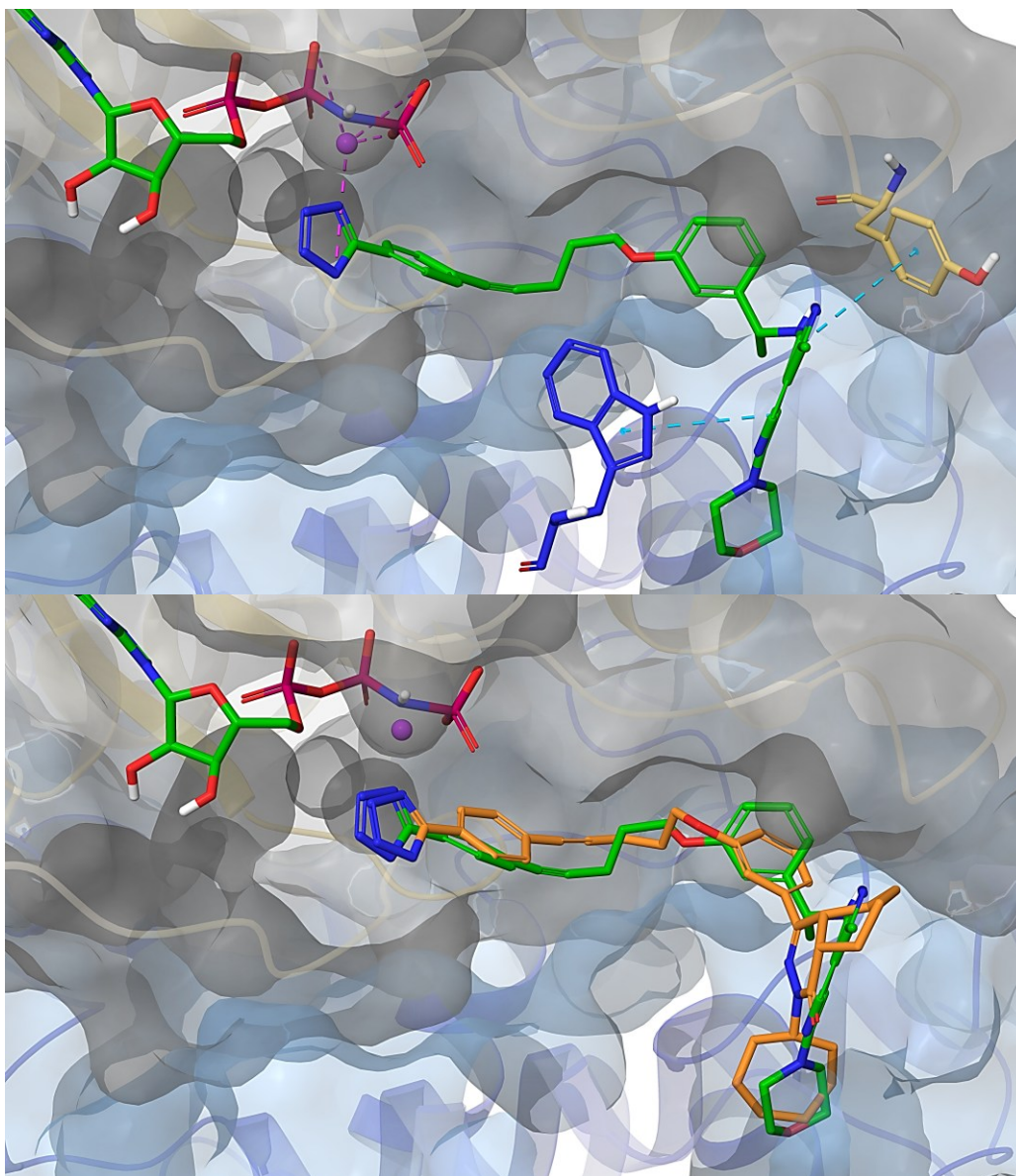
	<b>I-196</b>	<b>I-22</b>	<b>I-174</b>
<b>NA<sup>G12D</sup> IC<sub>50</sub> [µM]</b>	38.2 ± 5.01	3.53 ± 1.71	n. d.
<b>DS 7UKR (MRTX-0902) [kcal/mol]</b>	-4.88 <sup>a</sup> -4.47 <sup>b</sup>	n.d.	6.91
<b>DS 7KFZ [kcal/mol]</b>	-8.84 <sup>a</sup> -8.53 <sup>b</sup>	-9.92	n. d.
<b>MM/GBSA- Bindungsenergie 7KFZ [kcal/mol]</b>	-92.4 <sup>a</sup> -87.0 <sup>b</sup>	-104	n. d.

NA: Nukleotidaustauschassay; a: (*R*)-Enantiomer; b: (*S*)-Enantiomer

An der Kristallstruktur 7UKR mit MRTX-0902 **I-174** als kristallisierten Liganden besaßen das (*R*)- und das (*S*)-Enantiomer die Hybrids substanz **I-175** nicht aussagekräftige Docking Scores von -4.88 bzw. -4.47 kcal/mol. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine sehr schwache oder fehlende Bindung des Liganden an dieser Bindetasche.

In dem Docking-Lauf an dem Ras<sup>allo</sup>/SOS-Interface besitzt das (*R*)-Enantiomer der Hybrids substanz **I-175** einen günstigen Docking Score von -8.84 kcal/mol und eine MM/GBSA-Bindungsenergie von -92.4 kcal/mol. Die *in silico*-Ergebnisse des (*S*)-Enantiomers unterscheiden sich mit einem DS von -8.53 kcal/mol und einer MM/GBSA-Bindungsenergie von -87.0 kcal/mol geringfügig. Die Docking-Pose offenbart, dass zwischen dem Pyridazin-Scaffold und dem Protein werden π-π-Wechselwirkungen zum Tyr64 des allosterischen Ras und dem Trp729 von SOS ausgebildet werden (Abb.

46 oben). Die Komplexbildung des Magnesiums über das Tetrazolid bleibt wie bei dem Pyridazinon **I-22** und dem Rabbits-Hybrid **I-82** erhalten.

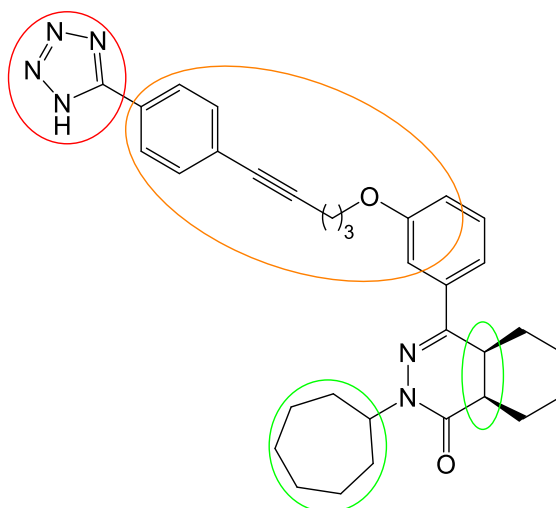


**Abb. 46:** Bindungspose des Pyridazins **I-175** an dem Ras<sup>allo</sup>/SOS-Interface (oben) und Superposition mit dem Pyridazinon **I-22** (unten)

Während die Docking Scores beider Enantiomere des Pyridazins **I-175** im gleichen Bereich wie der des Pyridazinons **I-22** (-9.92 kcal/mol) liegen, weisen die MM/GBSA-Bindungsenergien eindeutige Unterschiede auf. Für das (*R*)-Enantiomer ergibt sich eine Differenz von -12 kcal/mol und für das (*S*)-Enantiomer eine Differenz von -17 kcal/mol im Vergleich zu dem Pyridazinon **I-22**. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den beobachteten Unterschieden in den biologischen Messungen des Nukleotidaustauschassays der K-Ras<sup>G12D</sup>-Mutante. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Pyridazin **I-175** ein schwächerer Ligand für das Ras<sup>allo</sup>/SOS-Interface ist als das Pyridazinon **I-22**.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Projekt dieser Dissertation wurde ausgehend von dem LDC-Hit **I-22** eine Reihe von 12 Pyridazinonen für die SAR-Untersuchung dieser Substanzklasse synthetisiert. Die jeweiligen Derivate wurden über sechs Stufen jeweils mit 10-12% Gesamtausbeute synthetisiert. Die Analyse des GDP/GTP-Austauschassays der synthetisierten und den neun von LDC zur Verfügung gestellten Pyridazinonen ergab, dass die Substitution des aziden Protons unmittelbar zur Unwirksamkeit führt. Dagegen sind der Cycloheptylrest und die Linkereinheit unter bestimmten Voraussetzungen variabel. Das im HTS ausfindig gemachte Pyridazinon **I-22** zeichnete sich mit einem  $IC_{50}$ -Wert im  $NA^{G12D}$  von  $3.53 \pm 1.71 \mu\text{M}$  als die aktivste Verbindung innerhalb dieser Substanzklasse aus. Die Strukturmodifikationen führten zu keiner verbesserten Inhibition des Nukleotidaustauschs.

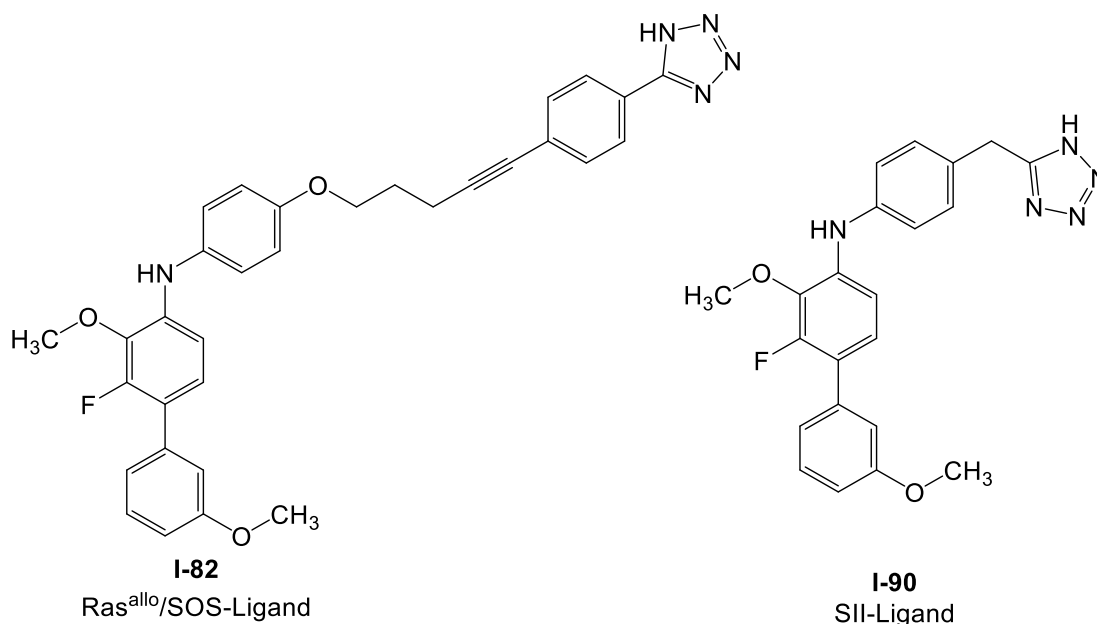


**Abb. 47:** Schematische Darstellung der derivatisierten Bereiche und der Einfluss auf die  $IC_{50}$ -Werte des Nukleotidaustauschassays (rot = essenziell, orange = teilweise variierbar, grün = variabel).

Über den Vergleich mit den experimentellen Daten der Referenzverbindungen MRTX1133 (SII-Ligand), Bay-293 (SOS-Inhibitor), Ch-3 ( $Ras^{GTP}$ -Inhibitor) und BI-2852 (SI/II-Ligand) war es nicht möglich, einen eindeutigen Wirkmechanismus auszumachen. Auch die Docking Studien an den etablierten K-Ras Kristallstrukturen 6GQY, 7RPZ und 6ZL5 ergaben keine aussagekräftigen Resultate. Erst das Ligand Docking mit anschließender Moleküldynamiksimulation der Verbindung **I-22** an der Kristallstruktur 7KFZ gab einen Hinweis auf den Wirkmechanismus. Anscheinend adressieren die Pyridazinone dieselbe Bindetasche am  $Ras^{allo}/SOS$ -Interface, die von BENARY *et al.* für eine Reihe von Phthalsäurederivaten der Triterpene postuliert wurde. Innerhalb dieses Bindungsmodus komplexiert das Tetrazolid das Magnesium des allosterischen Ras-Proteins. Der gute  $IC_{50}$ -Wert von  $3.53 \mu\text{M}$  innerhalb des  $NA^{G12D}$ -Assays des Tetrazols **I-22**

wurde durch einen günstigen Docking Score von -9.91 kcal/mol und eine MM/GBSA-Bindungsenergie von -104.1 kcal/mol wiedergegeben. Die adressierten Aminosäuren spielen eine essenzielle Rolle bei der Autoinhibition des SOS-Proteins, sodass der Ras/SOS-Komplex in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Im Gegensatz zu den Triterpenen weisen die Pyridazinone deutlich verbesserte ADME-Parameter auf.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde aus dem Pyridazinon **I-22** und dem Rabbits-Liganden Ch-3 (**I-17**) eine Serie von Hybridsubstanzen designt, die in *in silico*-Analysen an der 6GQY Kristallstruktur vielversprechende Ergebnisse lieferten. Die 12 hergestellten Hybridstrukturen zeigten im Gegensatz zum Rabbits-Liganden eine beträchtliche Inhibition des Nukleotidaustauschs von bis zu 2.53  $\mu\text{M}$ . Docking- und MM/GBSA-Studien gaben einen Hinweis auf unterschiedliche Wirkmechanismen innerhalb dieser Substanzklasse. So legten die Ergebnisse der Verbindungen **I-84**, **I-88** und **I-90** eine mögliche Bindung an die SII-Bindetasche nahe, während die Substanz **I-82** mit der Linkereinheit anscheinend den gleichen Wirkmechanismus der Pyridazinone annimmt. Das Tetrazol **I-82** und das Pyridazinon **I-22** zeigten einen identischen DS von -9.92 kcal/mol, der im Einklang mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten des  $\text{NA}^{\text{G12D}}$  beider Verbindungen steht.



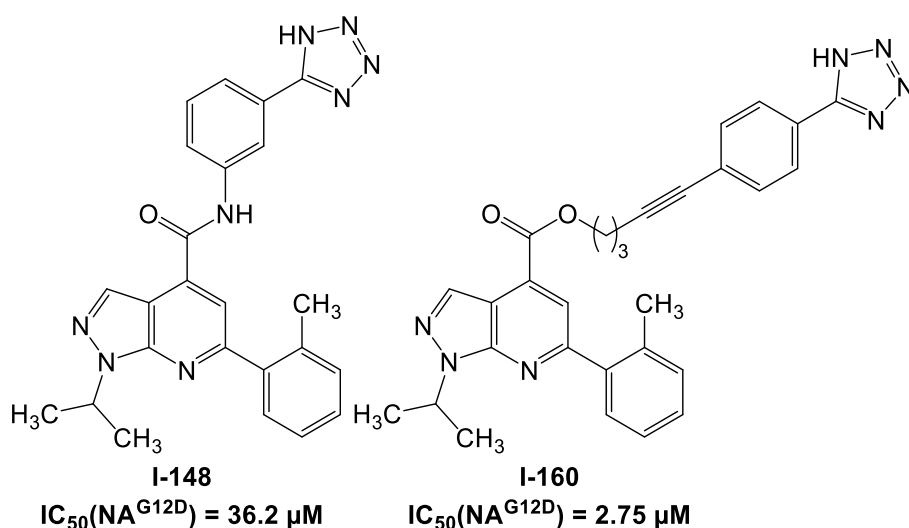
**Abb. 48:** Strukturformeln der zwei synthetisierten Rabbits-Hybride.

In den Messungen der pERK-Phosphorylierungsassays wiesen vier der Hybridsubstanzen eine Selektivität für die G12V-mutierte H441-Zelllinie auf. Da es aufgrund der unpolaren Isopropylseitenkette bislang nur wenige valinselektive Inhibitoren

gibt, bieten diese Ergebnisse einen geeigneten Startpunkt für die gezielte K-Ras<sup>G12V</sup>-Adressierung.

Aus einer Bibliothek von 32 Biphenylen zeigte keine der Verbindungen eine potentere Inhibition des GDP/GTP-Austauschs als die Ausgangssubstanz **I-93**. Auch die Vorhersage der IC<sub>50</sub>-Werte des GDP/GTP-Austauschassays einer virtuellen Bibliothek von 645 Substanzen mittels eines QSAR-Modells lieferte keinen potenziellen Inhibitor mit einem niedrigeren vorhergesagten IC<sub>50</sub>-Wert als die Ausgangssubstanz **I-93**.

Innerhalb des von LDC durchgeführten NA-HT-Screenings wurde mit der Verbindung **I-148** ein weiteres Tetrazol identifiziert. Nach Einführung des Alkynylphenyltetrazols an das Scaffold wies die Verbindung **I-160** mit einem IC<sub>50</sub> = 2.75 µM eine gute Inhibition des GDP/GTP-Austauschs der G12D-Variante auf. Allerdings zeigte die Substanz **I-164** in den pER-Downstreamassays der G12D-Variante keine Aktivität und der G12V-Variante nur einen schwachen IC<sub>50</sub>-Wert von 18.0 µM.



**Abb. 49:** Strukturen der synthetisierten Inhibitoren und die IC<sub>50</sub>-Werte des Nukleotidaustauschs.

Im letzten Ansatz wurde aus dem MRTX-0902-Scaffold (**I-174**) und dem Pyridazinon **I-22** die Hybridsubstanz **I-175** entwickelt. Dieses wurde mit einer Ausbeute von 17% über zehn Stufen synthetisiert. Im Gegensatz zu dem Pyridazinon **I-22** zeigt das Pyridazin **I-175** lediglich eine schwache Inhibition des Nukleotidaustauschs von IC<sub>50</sub> = 38.2 µM. Eine mögliche Erklärung lieferte die durchgeführten MM/GBSA-Bindungsenergie-Studie, in der die beiden Enantiomere des Pyridazin **I-175** mit -92.4 kcal/mol bzw. -87.0 kcal/mol erheblich schlechtere Bindungsenergien im Vergleich zum Pyridazinon **I-22** von -104 kcal/mol aufweisen.

## Projekt B: Design und Synthese von trisubstituierten Kohlenhydraten für die SII-Bindestelle

### 5. Theoretischer Hintergrund

Im Zusammenhang mit K-Ras wurden Kohlenhydrate gezielt in pharmakologischen Strategien eingesetzt. Bereits 1997 berichteten TAVERNAS *et al.* über ein Hydroxylamin, das über ein Sulfonamid an Glucose gebunden ist.<sup>[189]</sup> Der Inhibitor SCH-54292 (II-1), benannt nach dem Forschungsinstitut *Schering-Plough*, besitzt eine biologische Aktivität von  $IC_{50} = 0.7 \mu\text{M}$  in dem Nukleotidaustausch der onkogenen G12V-Variante. Die Glucoseeinheit sorgte für einer erheblich bessere Wasserlöslichkeit im Vergleich zu ähnlichen Inhibitoren ohne Zuckerkomponente. In massenspektrometrischen Analysen wurde die Bildung eines nicht kovalenten-ternären-Komplexes beobachtet.<sup>[190]</sup> In NMR-Analysen wurde der Bindungsort innerhalb der SII-Region identifiziert, die daraufhin ihren Namen erhielt.<sup>[191]</sup> Zudem zeigten weitere NMR-Untersuchungen mit Glucosaminen, dass die Kohlenhydrate zwar nicht direkt an der Ras-Bindung beteiligt sind, den Pharmakophoren jedoch eine bestimmte räumliche Orientierung und konformationelle Beweglichkeit ermöglichen. Dies führte zu einer deutlich erhöhten Affinität der glykosylierten Liganden gegenüber Ras.<sup>[192]</sup>

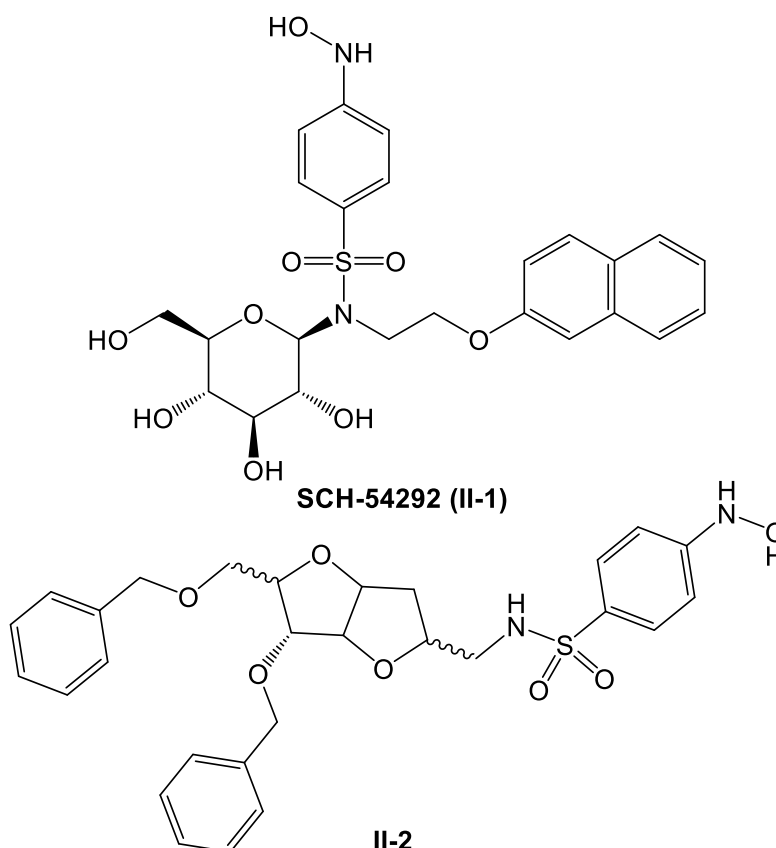


Abb. 50: Strukturformeln der K-Rasinihibitoren II-1 und II-2.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen entwickelten PERI *et al.* über das Molecular Modeling *via* Glide Docking weitere Rasinhibitoren (**II-2**), die sich lediglich in den Stereozentren der anomeren Zentren unterschieden.<sup>[193]</sup> Statt des Glucoseliganden wurde ein bityklisches Arabinose-Scaffold verwendet, das über Amide sowie Sulfonamide mit einem Phenylhydroxylamin an der C1-Position erweitert wurde. Die biologischen Aktivitäten der Arabinosederivate im Bereich der Ausgangsverbindung ( $35.5 \pm 0.7 \leq IC_{50} \leq 76.0 \pm 1.4 \mu M$ ) wurden über Docking Studien begründet. Die Gesamtanalyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen weist auf zwei charakteristische Pharmakophore der zuckerbasierten Liganden hin: ein zweiwertiges Phenol oder Phenylhydroxylamin sowie einen Benzylether.<sup>[194]</sup>

### 6. Motivation und Zielsetzung

In dem Zeitraum von 2015 bis 2020 wurden von der FDA über 200 *Small Molecules* als Arzneistoffe zugelassen, von denen lediglich neun eine Zuckereinheit enthielten.<sup>[195]</sup> Kohlenhydrate sind damit in der Arzneimittelforschung trotz ihrer weiten Verbreitung in der Natur und ihrer hohen biologischen Relevanz deutlich unterrepräsentiert. Dabei bieten ihre definierte stereochemische Struktur, die Möglichkeit zur orthogonalen Funktionalisierung und die natürlich vorkommende Isomerenvielfalt die ideale Grundlage für den Einsatz als Scaffold. Bereits die Verwendung von zwei Substituenten und einem variablen Substitutionsmuster führt zu 80 verschiedenen Strukturen. Mit einem dritten Substituenten steigt die Anzahl auf 480 mögliche Verbindungen an, sodass einzigartige Einblicke in die SAR möglich sind.<sup>[196]</sup>

Neueste Studien belegen inzwischen Resistenzbildungen gegen MRTX1133 bei Pankreaskrebs,<sup>[114,115]</sup> sodass die Suche nach weiteren Präzisionsmedikamenten für die onkogenen K-Ras-Varianten unumgänglich ist. Im Projekt B liegt der Fokus auf der Untersuchung und Erweiterung des chemischen Raums von K-Ras-Inhibitoren mittels einem Ligand-basierten Designansatz. Dafür sollen die Substituenten des MRTX-Liganden **I-19** mit einem Hexosescaffold kombiniert werden. Auf Basis dieser Hybridstruktur sollen die Substituenten systematisch variiert und so eine individuelle virtuelle Substanzbibliothek generiert werden (Abb. 51).

Anschließend soll der chemische Raum dieser *in silico*-Bibliothek durch die Analyse ausgewählter ADME-Parameter charakterisiert und im Vergleich mit kommerziellen Substanzdatenbanken eingeordnet werden. Durch die Kombination einer *machine*

*learning*-basierten Aktivitätsvorhersage mit Docking-Studien sollen die vielversprechendsten Inhibitoren der Bibliothek identifiziert und schließlich synthetisiert werden.

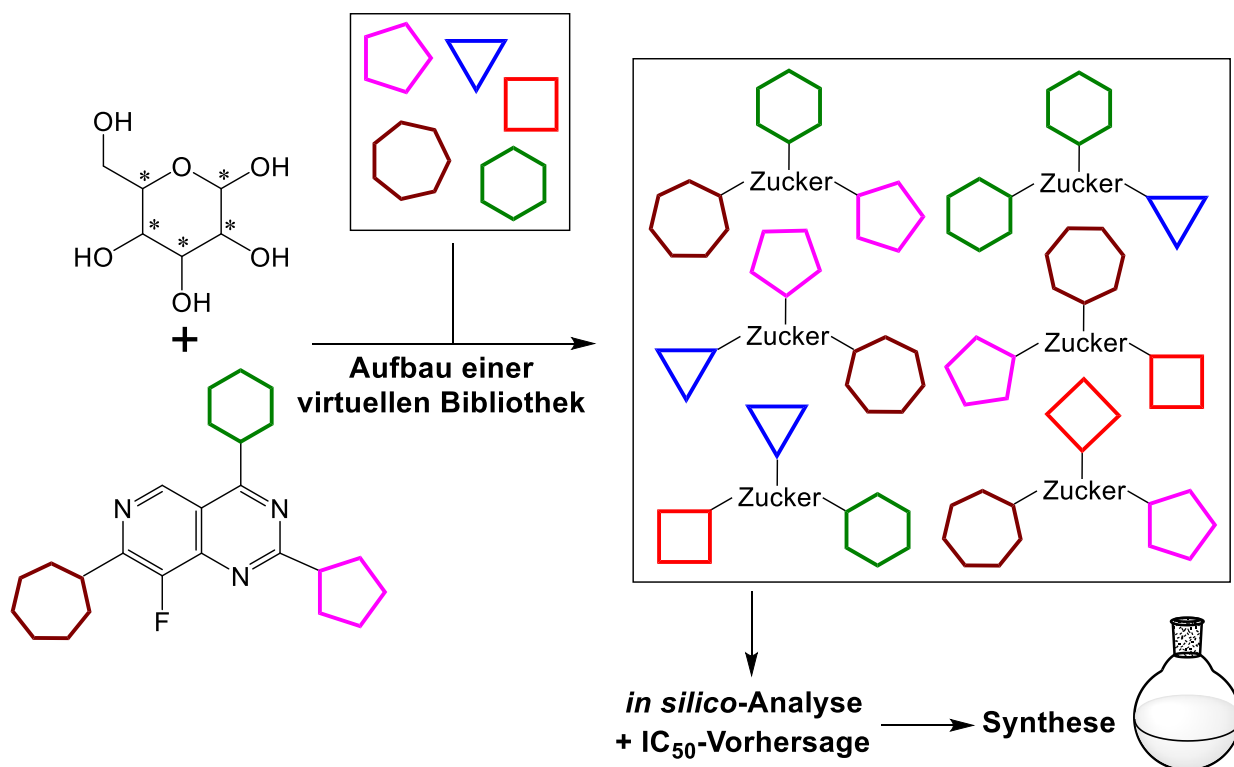
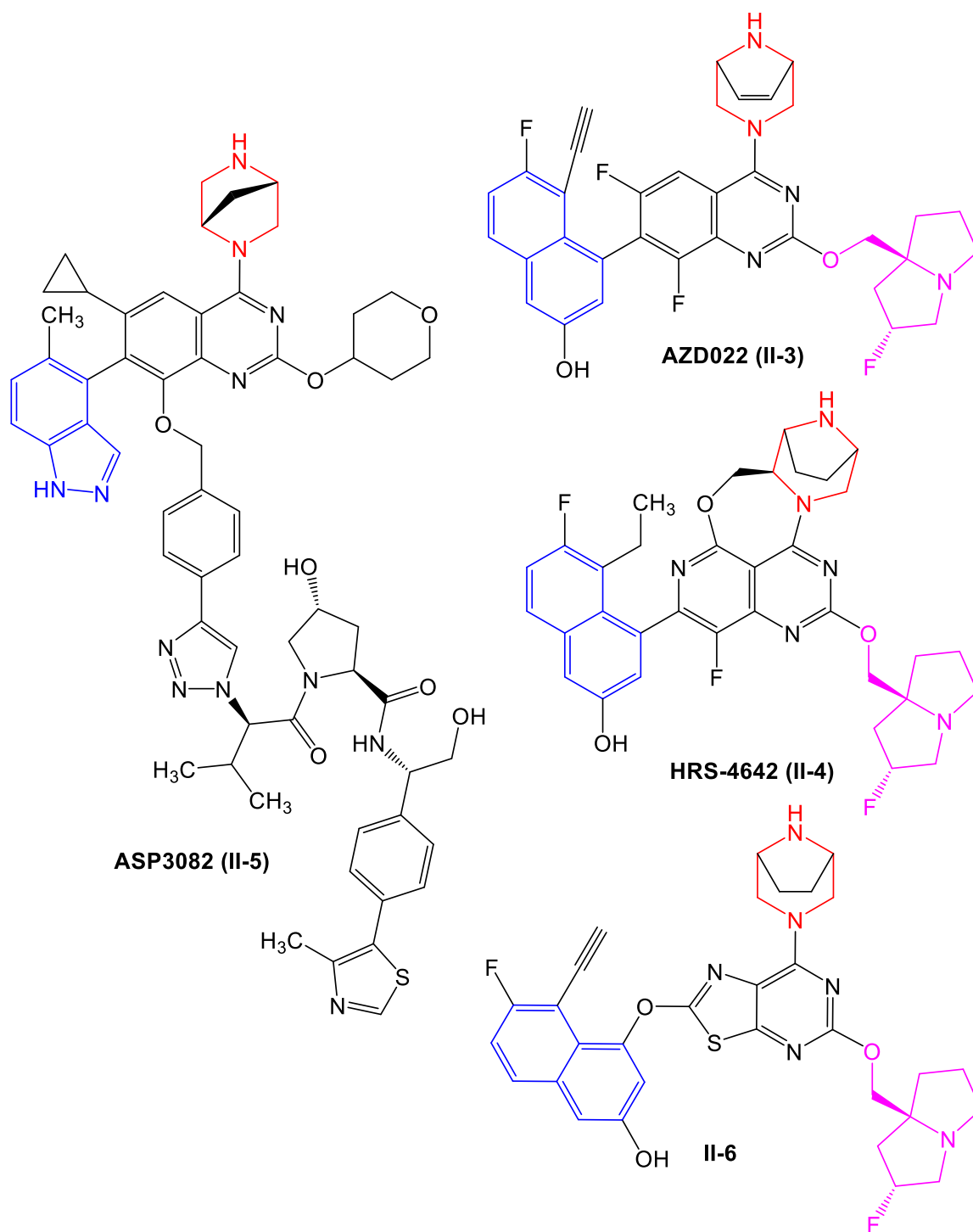


Abb. 51: Schematischer Ablaufplan für das Projekt B.

## 7. Ergebnisse und Diskussion

Nach der Entdeckung von MRTX1133 (**I-19**) sind viele K-Ras<sup>G12D</sup>-Inhibitoren mit ähnlicher Struktur veröffentlicht und patentiert worden. In Abb. 52 sind die Inhibitoren der Firmen AstraZeneca AZD0022 (**II-3**),<sup>[197,198]</sup> Jiangsu Hengrui Pharmaceuticals HRS-4642 (**II-4**),<sup>[199,200]</sup> Astellas ASP3082 (**II-5**)<sup>[201,202]</sup> und Bayer **II-6**<sup>[203]</sup> dargestellt, die sich momentan in unterschiedlichen klinischen Phasen befinden.

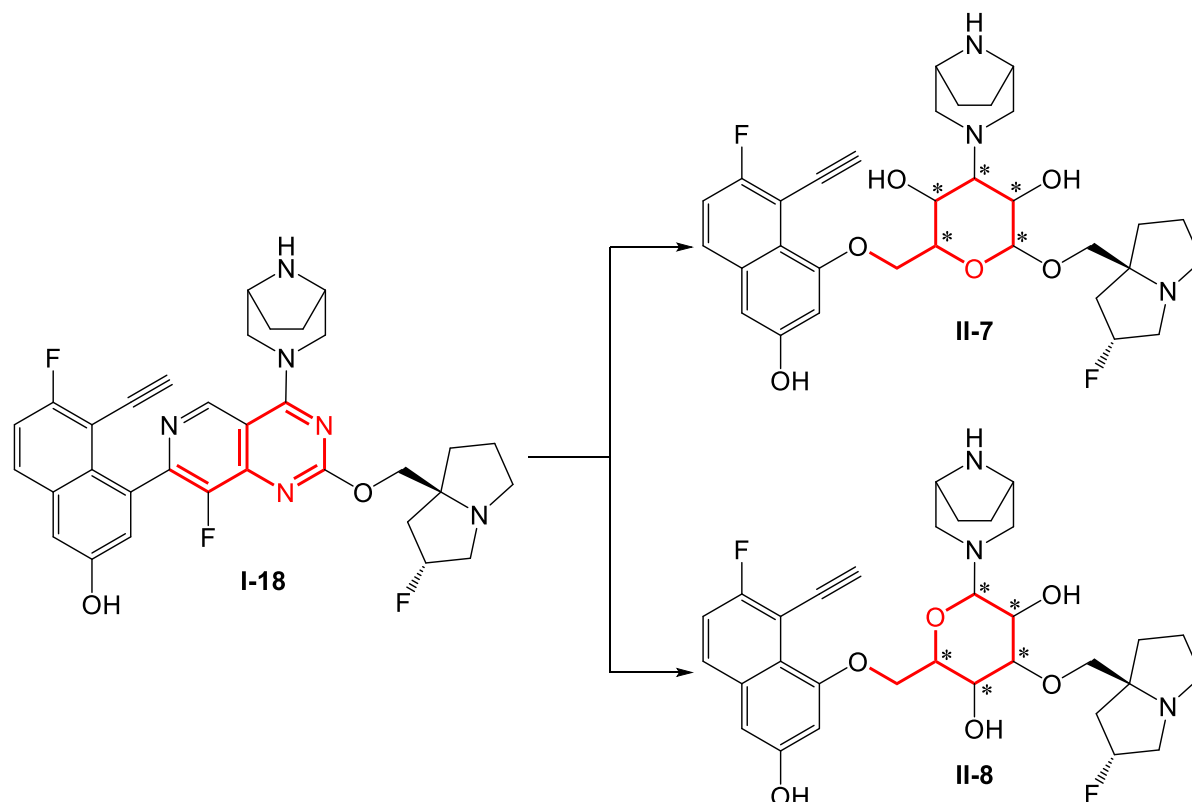
Alle Verbindungen sind aus chemisch ähnlichen Strukturkomponenten aufgebaut. So besitzen alle vier Inhibitoren einen verbrückten Piperazinring (rot) und einen bicyklischen Substituenten (blau), der bei drei der vier Verbindungen aus einem Naphthalengerüst mit Fluor- sowie Hydroxylsubstituenten besteht. Der dritte Substituent wird ebenfalls bei drei von vier Substanzen von einem Fluorpyrrolizidin (magenta) repräsentiert. Lediglich die Bayerverbindung **II-6** besitzt mit dem Thiazolpyrimidinscaffold einen 6,5-Ring, der mit denselben Substituenten versehen ist wie MRTX1133 (**I-19**). Damit die räumliche Ausrichtung des 6,6-Bizyklus erhalten bleibt, ist dieser über eine Ethereinheit an den Thiazolring gebunden.



**Abb. 52:** Strukturen der K-Ras<sup>G12D</sup>-Inhibitoren AZD022 (**II-3**), HRS-4642 (**II-4**), ASP3082 (**II-5**) und **II-6**.

Der Austausch des Chinazolin-Scaffolds gegen eine Hexose führt ebenfalls zu einer Hybrids substanz mit einem neuen Scaffold, das die zweidimensionale Ausrichtung der Substituenten beibehält. Die Methylengruppe der C6-Position imitiert einen Teil des Pyridinrings von MRTX1133 (**I-19**). Aufgrund der unsymmetrischen Natur der Kohlenhydratringe, liefert die unterschiedliche Positionierung des Sauerstoffs die beiden Regioisomere **II-7** und **II-8** (Abb. 53). Unter Berücksichtigung der Stereoinformationen –

einschließlich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere sowie der D- und L-Konfiguration - ergeben sich je 32 mögliche Stereoisomere.



**Abb. 53:** Substitution des MRTX-Scaffolds gegen eine Hexose.

Damit die strukturelle Ähnlichkeit chemischer Verbindungen quantifiziert werden kann, werden in der Cheminformatik molekulare Deskriptoren eingesetzt. Dabei handelt es sich um numerische Ausdrücke der strukturellen Eigenschaften von Verbindungen. Die einzelnen Deskriptoren werden, abhängig davon welche unterschiedlichen Eigenschaften sie beschreiben, in 0D, 1D, 2D, etc. eingeteilt (Tab. 17).

In der medizinischen Chemie dienen molekulare Deskriptoren vor allem als *in silico*-Filter bei der Suche nach geeigneten Wirkstoffen. Die wohl bekannteste Zusammensetzung von Deskriptoren wurde von LIPINSKI in Form der *Rule of five* (RO5) formuliert.<sup>[143]</sup> Im Gegensatz zu den RO5 stehen die *Rule of four* (RO4), die spezifisch für die in Kapitel 1.4.1 diskutierten Herausforderungen bei der Inhibition von PPI definiert wurden.<sup>[204]</sup> Demnach benötigen Inhibitoren eine molekulare Masse > 400 g/mol, einen LogP > 4, > 4 H-Brückenakzeptoren und > 4 Ringsysteme. Deskriptoren, die ausschließlich Informationen über die Atome einer Verbindung, wie bspw. bei dem Molekulargewicht oder der Summenformel, jedoch keine Angaben über deren Verknüpfung enthalten, werden als 0D-Deskriptoren bezeichnet (Tab. 17).

Sind in den numerischen Repräsentationen Informationen der Substruktur eines Moleküls enthalten, wie bspw. funktionelle Gruppen oder H-Brückendonoren und -akzeptoren, ist von 1D-Deskriptoren die Rede. Die 2D-Deskriptoren beziehen die chemische Struktur der Verbindungen ein. Während 3D-Deskriptoren die räumliche Struktur, bspw. bei dem Volumen oder der elektrostatischen Verteilung, mit einbeziehen, handelt es sich bei 4D-Deskriptoren um raum- und zeitabhängige numerische Repräsentationen.

**Tab. 17:** Einteilung der Deskriptoren nach Dimension und die darin enthaltenen Informationen

Dimension	enthaltene Information	Beispiele
0D	atomare Zusammensetzung, Mess- und Zählwerte	Molekulargewicht, Anzahl bestimmter Atome, Anzahl Bindungen, etc
1D	Bindungs- und Fragmentarten	H-Brückendonoren und -akzeptoren, Art der funktionellen Gruppen, Ringsysteme
2D	Strukturmerkmale: Art der Verbindung von Atomen, Topologie, Struktur als Graph	<i>Fingerprints</i> , Distanzmatrix, TPSA, Wiener-Index
3D	räumliche Struktur (dreidimensionale Aufbau), Anordnung der Atome, Konformationen	elektrostatische Verteilung, Sterik, Volumen, WHIM-Deskriptoren
4D	Ensemble-Beschreibung: raum- und zeitabhängige Variabilität dynamischer Zustände; verschiedene Konformationen	räumliche Distanzverteilung, Volumenänderungen, Flexibilitätsindizes

Einer der wichtigsten 2D-Deskriptoren ist der *Fingerprint* eines Moleküls. Die Sammlung von booleschen Werten („*bits*“) bestimmter Länge enthält das Vorkommen bestimmter struktureller Merkmale einer Verbindung.<sup>[205,206]</sup> Welche Eigenschaften in die Berechnung einbezogen werden, ist stark von der ausgewählten Methode abhängig. Zu den am häufigsten genutzten Varianten zählen der RDKit-, Morgan- und MACCS-Fingerprint. Über den Fingerprint besteht die Möglichkeit, die strukturelle Ähnlichkeit zweier oder mehrerer Substanzen zu quantifizieren. Der Tanimoto-Koeffizient ( $T_c$ ) wird aus dem Verhältnis der Gesamtzahl der *bits* zweier Moleküle (AB) zur Summe der einzigartigen *bits* (Ubits) beider Moleküle zusammen mit der Gesamtzahl der *bits* gebildet (Gl. 3). Der resultierende Wert liegt zwischen 0 (keine Übereinstimmung der Verbindungen) und 1 (identische Substanz).<sup>[207]</sup>

$$T_c = \frac{\sum \text{bits}(AB)}{\sum \text{Ubits}(A) + \sum \text{Ubits}(B) + \sum \text{bits}(AB)} \quad (3)$$

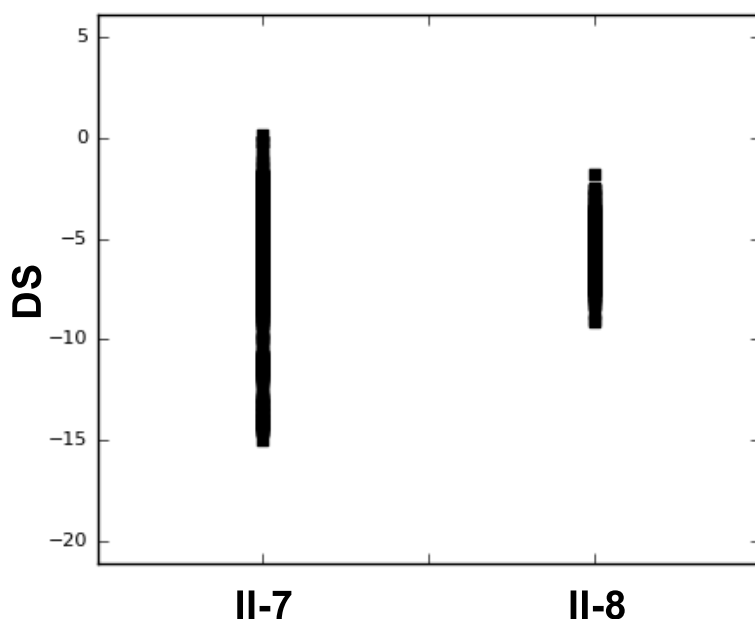
Für die biologische Aktivität im Zusammenhang mit dem Tanimoto-Koeffizienten müssen zwei Dinge beachtet werden. Zum einen ist eine chemisch-strukturelle Übereinstimmung zwischen neuen und bereits bekannten Verbindungen wichtig, da die Ähnlichkeit in der Regel der Aktivität korreliert. Seit einer Studie von PATTERSON *et al.* 1996 hat sich daher ein  $T_c \geq 0.85$  als Schwellenwert etabliert.<sup>[208]</sup> Eine Aktivitätsanalyse von diversen Datenbanken ist jedoch unausweichlich, da ansonsten daraus folgende QSAR-Modelle zu einseitig („*biased*“) sind. In einer Analyse von 19 verschiedenen Substanzbibliotheken fanden DUNN *et al.* heraus, dass der RDKit-Fingerprint in Zusammenhang mit dem  $T_c$  die Ähnlichkeit der Moleküle in diesen Datenbanken am besten beschreibt.<sup>[209]</sup> Folglich wurde dieser für alle Berechnungen dieser Dissertation verwendet.

Über den  $T_c$  der jeweiligen RDKit-*Fingerprints* wurde die chemische Ähnlichkeit der MRTX1133 (**I-19**) zu den K-Ras<sup>G12D</sup>-Inhibitoren **II-3**, **II-4**, **II-5** und **II-6**, den beiden Zuckerhybriden **II-7** und **II-8** sowie den kovalenten G12C-Inhibitoren **I-10** und **I-11** berechnet (Tab. 18). Die biologischen Aktivitäten der G12D-Inhibitoren stehen in hoher Korrelation zu der chemischen Ähnlichkeit, da alle Substanzen einen  $T_c \geq 0.910$  besitzen. Auch die hohe Übereinstimmung der chemischen Strukturen zwischen den beiden G12C-Inhibitoren Sotorasib (**I-10**) und Adagrasib (**I-11**) ist wenig verwunderlich, da MRTX1133 (**I-19**) aus der Optimierung der Verbindung **I-11** hervorgekommen ist.

**Tab. 18:** Tanimoto Koeffizienten der verschiedenen K-Ras-Inhibitoren mit MRTX1133 (**I-19**) als Referenz

Verbindung	$T_c$
MRTX1133 ( <b>I-19</b> )	1.0
Sotorasib ( <b>I-10</b> )	0.93
Adagrasib ( <b>I-11</b> )	0.89
AZD022 ( <b>II-3</b> )	0.95
HRS-4642 ( <b>II-4</b> )	0.97
ASP3082 ( <b>II-5</b> )	0.94
<b>II-6</b>	0.91
<b>II-7</b>	0.83
<b>II-8</b>	0.85

Die Zuckerhybride **II-7** und **II-8** bilden mit einem  $T_c$  von 0.83 bzw. 0.85 eine sehr gute Ergänzung zu den bisherigen Inhibitoren. Dies weist auf eine potenzielle K-Ras-Inhibition analog zu der MRTX-Verbindung **I-19** und deren Derivaten hin. Aufgrund der Tatsache, dass durch strukturelle Exploration der MRTX-SAR ein neues Scaffold mit ähnlicher biologischer Wirkung gefunden werden soll, ist ein  $T_c$  von knapp unter 0.85 durchaus erwünscht. Zur Auswahl des geeigneteren Substitutionsmusters wurden die Regioisomere **II-7** und **II-8** auf die Kristallstruktur 7RPZ gedockt (Abb. 54).



**Abb. 54:** Docking Ergebnisse der beiden Regioisomere **A** und **B**.

Die Docking Studie zeigt einen deutlichen Unterschied in den berechneten Docking Scores beider Isomere. Für das Regioisomer **II-7** ergeben sich Docking Scores im Bereich von bis zu -15 kcal/mol, wohingegen die Werte des Stereoisomers **II-8** einen deutlich ungünstigeren Bereich von lediglich bis zu -9.5 kcal/mol einnehmen. Diese Ergebnisse favorisieren damit das Substitutionsmuster des Regioisomers **II-7**, das als Grundlage für den weiteren Aufbau der virtuellen Bibliothek diene.

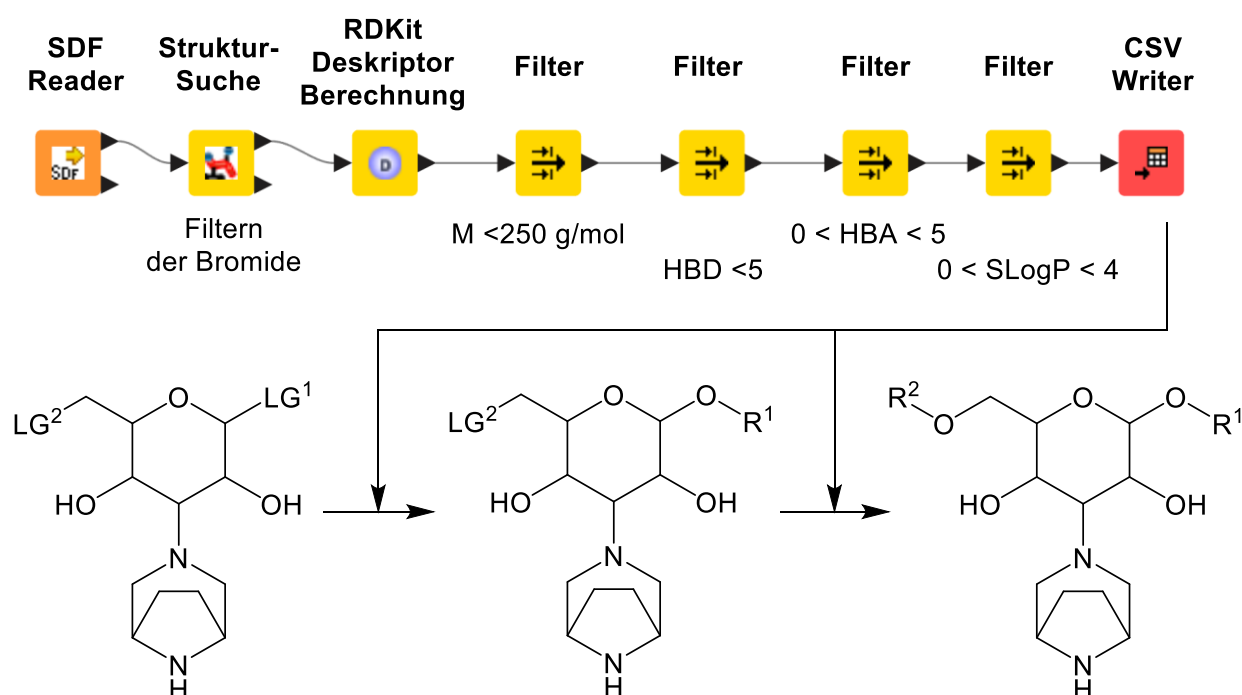
## 7.1 *In silico*-Arbeiten

### 7.1.1 Anfertigung einer *in silico*-Bibliothek und Analyse des chemischen Raums

Für die Inhibition onkogener Proteine ist es wichtig, dass eine Bandbreite an chemisch diversen Wirkstoffen zur Verfügung steht. Nur so können Resistenzbildungen des Zielproteins, bspw. durch Punktmutationen oder Umgehung des Signalweges (Bypass), verhindert und die Selektivitäts- sowie die Sicherheitsprofile der Wirkstoffe optimiert

werden.<sup>[210,211]</sup> Die bislang beschriebenen hochaffinen K-Ras<sup>G12D</sup>-Inhibitoren weisen eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit auf, die sich in den hohen Tanimoto-Koeffizienten widerspiegelt (Tab. 18). Daher wurde auf Basis der Hybrids substanz **II-7** mit der Konstanz Information Miner- (KNIME)<sup>[212]</sup> Software eine individuelle Substanzbibliothek erstellt.

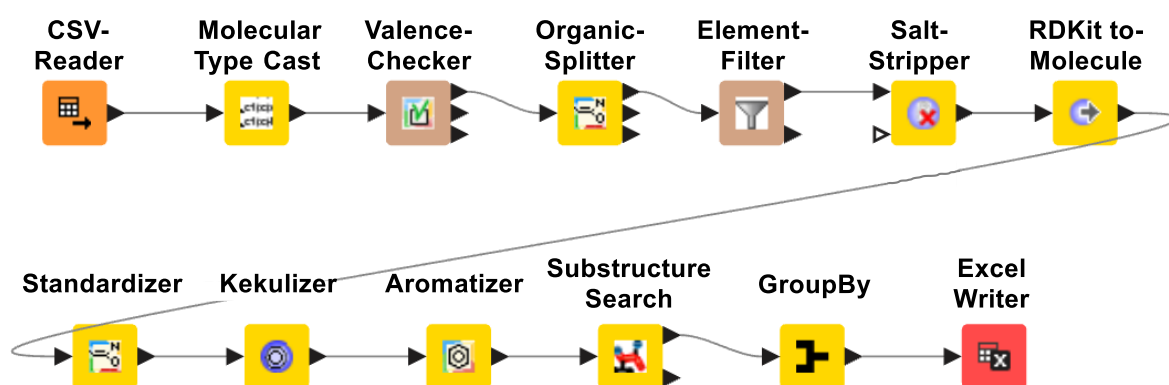
Aus Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass die Hardware den limitierenden Faktor darstellt und maximal eine Substanzbibliothek von 2.5 Mio Verbindungen verarbeiten kann. Die G12D-Selektivität der MRTX-Verbindung (**I-19**) resultiert aus einer H-Brücke zwischen dem Asp12 und dem verbrückten Pyridazinring. Daher wurden lediglich die zwei Substituenten an der C1- und C6-Position variiert und so die Anzahl der möglichen Derivate eingeschränkt. Für den Aufbau der Bibliothek sollte eine Datenbank aus Substituenten erstellt werden, die über einen Ether zunächst an die C1-Position und dann an die C6-Position gekoppelt wird. Da so die Gesamtzahl der Zielverbindungen dem Quadrat der Anzahl an Substituenten entspricht, durfte die Summe der ausgewählten Substituenten nicht mehr als 1581 betragen. In der ChEMBL-Datenbank<sup>[213,214]</sup> sind insgesamt 96397 Bromide gelistet. Durch die Filter  $M < 250$  g/mol, Anzahl der Ringe  $\geq 1$ , HBD  $< 5$ , HBA  $< 5$  und  $0 < SLogP < 4$  wurde die Menge auf 1485 Bromide reduziert, die als Substituenten an die C1- und C6-Position des Glucosescaffolds gebunden wurden. So wurde eine Bibliothek von 2205225 einzigartigen Verbindungen für die Aktivitätsvorhersage aufgebaut. Eine Abbildung des Workflows ist im Anhang (Abb. 77) aufgeführt.



**Abb. 55:** Schematische Darstellung (oben) des KNIME-Workflows (unten) für die Erstellung der Zuckerbibliothek.

Die Analyse des chemischen Raums („*chemical space*“) ist aus zwei Gesichtspunkten notwendig. Zum einen können durch Untersuchungen von fokussierten Bibliotheken Struktureigenschaften erkannt werden, die für die biologische Aktivität besonders relevant sind. Zum anderen können Regionen des *chemical space* identifiziert werden, die in bisherigen Studien außer Acht gelassen wurden und so die Strukturdiversität erhöhen. Der Begriff *chemical space* beschreibt in diesem Zusammenhang die Gesamtheit aller chemischen Moleküle und deren Eigenschaften. Nach aktuellen Schätzungen haben etwa  $10^{33}$  der möglichen Moleküle ein theoretisches pharmazeutisches Potential.<sup>[215]</sup> Zu diesem Zweck wurde zunächst der chemische Raum der bisherigen K-Ras<sup>G12D</sup>-Inhibitoren in Bezug auf die ADME-Parameter analysiert und mit anderen Bibliotheken verglichen. Während die Vorbereitung der Datenbanken und die Workflows für die Analysen des chemischen Raums zu gleichen Teilen mit Benjamin Nava Hörer erarbeitet wurden, wurden die Arbeiten zu dem QSAR-Modell ausschließlich von Benjamin Nava Hörer im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.<sup>[180]</sup>

Im Vorfeld der Analysen wurden die einzelnen Bibliotheken standardisiert, da inkorrekte Rohdaten in der Datenverarbeitung ein ernstzunehmendes Problem darstellen.<sup>[216]</sup> Eine Studie von YOUNG *et al.* zeigte, dass pro Publikation in der medizinischen Chemie durchschnittlich zwei Annotationsfehler auftreten.<sup>[217]</sup> Eine weitere Studie von OLAH *et al.* ergab zudem, dass in kommerziellen Datenbanken 0.1-3.4% der chemischen Strukturen fehlerhaft sind.<sup>[218]</sup> Daher wurden alle Bibliotheken mit dem in Abb. 56 aufgeführten Workflow bereinigt.

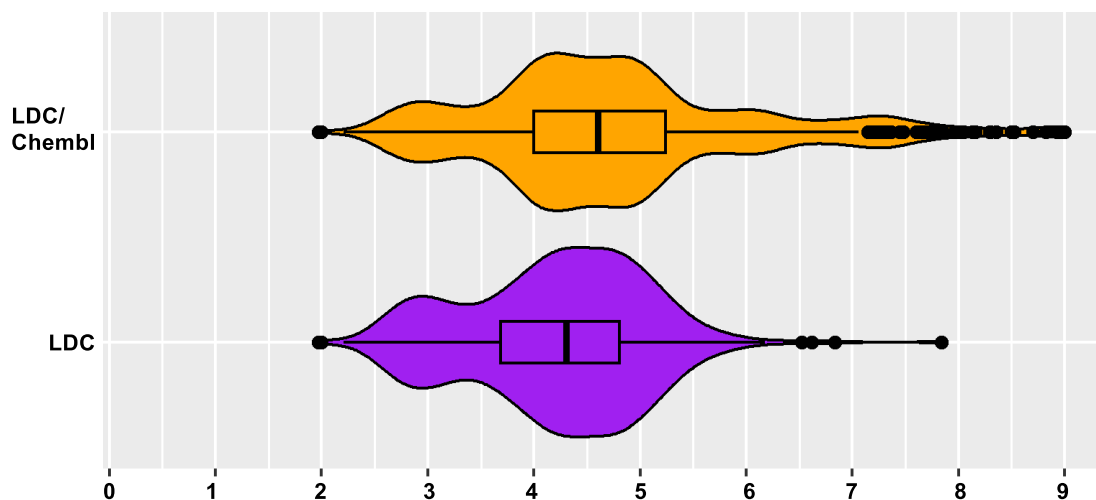


**Abb. 56:** KNIME-Standardisierungsworkflow der Bibliotheken.

Zu Beginn wurden die Valenzstrukturen überprüft (Valence Checker), organische Salze in die jeweiligen Säuren oder Basen überführt (Organic Splitter) und Verbindungen mit bestimmten Elementen (bspw. Arsen oder Silicium) entfernt (Element Filter). Im Folgenden wurden die Stereozentren entfernt (Standardizer) und Kekulé-Strukturen

aromatisiert (Aromatizer). Aromatisierte Strukturen sind notwendig, da Resonanzstrukturen (bspw. von disubstituierten Benzolringen) von der Software in unterschiedliche Verbindungen eingeteilt werden. Am Ende wurden kovalente Inhibitoren in Form von Michael-Akzeptoren (Substructure Search) sowie Duplikate entfernt (GroupBy). Außerdem wurden alle Verbindungen, die bereits Teil der LDC/ChEMBL-Datenbank waren, aus den Datenbanken entfernt.

Für die Analyse wurde die LDC-Bibliothek mit K-Ras<sup>G12D</sup>-Inhibitoren der ChEMBL-Datenbank erweitert. Dies hat zwei grundlegende Vorteile: Zum einen garantiert die ChEMBL-Erweiterung einen vollständigen Einblick in den chemischen Raum der bekannten Ras-Inhibitoren, zum anderen wurde so eine bessere Aktivitätsverteilung für das QSAR-Modell erhalten. Aus der Auftragung des Violinen-Plots der LDC- und der LDC/ChEMBL-Datenbank wird der Vorteil der Erweiterung deutlich (Abb. 57). Während der Anteil an Verbindungen mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 1-5 geringfügig abnimmt, nimmt der Anteil an Verbindungen mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von >5 erheblich zu. Die LDC-Datenbank besaß 600 Substanzen verteilt auf einen pIC<sub>50</sub>-Bereich von 0-6 besaß. Mit der ChEMBL-Erweiterung erhöhte sich die Anzahl an K-Ras-Inhibitoren auf insgesamt 917 Verbindungen, die eine deutlich günstigere pIC<sub>50</sub>-Verteilung von 0-9 aufweisen.

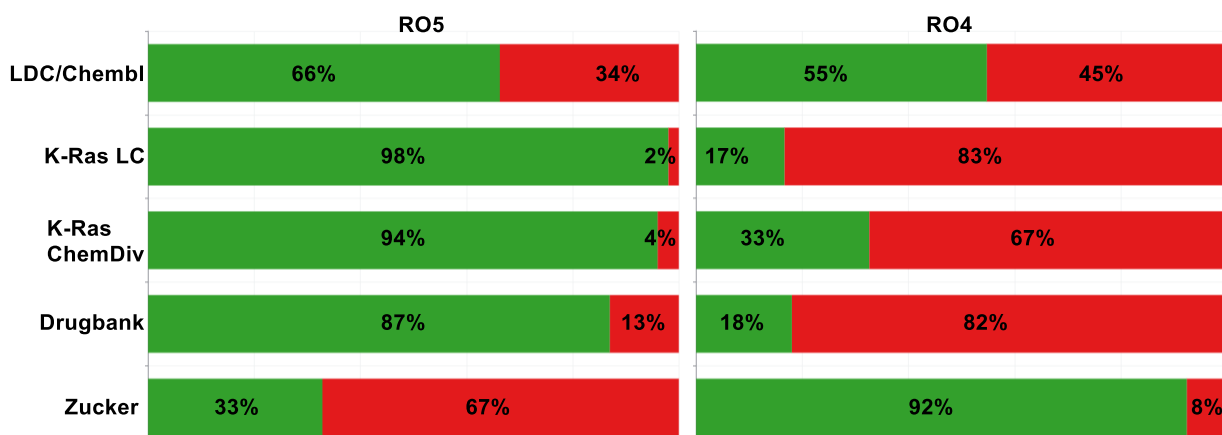


**Abb. 57:** Violinen-Plot für die LDC- (oben) und die LDC/ChEMBL-Datenbank. [Modifiziert nach B. NAVA HÖER]

Die Gegenüberstellung des *chemical space* der Ras-Inhibitorbibliothek mit einer iPPI- sowie einer diversen Bibliothek wurde bereits von Benjamin Nava Höer beschrieben.<sup>[180]</sup> Das Unternehmen ChemDiv bietet eine fokussierte K-Ras-Inhibitor-Bibliothek mit 16000 Verbindungen an, die mittels standardisierter MedChem-Filter (drug-likeness, Synthetisierbarkeit, etc.), und der Tanimoto-Ähnlichkeit zu bekannten Ras-Inhibitoren erstellt wurde. Analog zu der LDC-Datenbank basiert die Screening-Bibliothek von ChemDiv auf Inhibitoren der SI/II- sowie der SII-Bindetasche und bietet damit eine

geeignete Vergleichsmöglichkeit. Auch die Firma LifeChemicals (LC) bietet eine fokussierte Bibliothek an, die Inhibitoren speziell für den Ras/MAPK-Signalweg enthalten soll. Analog zur ChemDiv-Bibliothek wurde auch diese Datenbank aus der Anwendung von MedChem-Filtern mit anschließender *similarity search* in Bezug auf aktive Ras-Inhibitoren aufgebaut. Die Ras/MAPK-Inhibitor-Datenbank enthält 1700 Verbindungen und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die LDC-Datenbank. Außerdem wurde die Drugbank-Datenbank in die Analyse des chemischen Raums mit einbezogen. Diese enthält neben Prüfpräparaten auch die von der FDA zugelassenen Arzneimittel Wirkstoffe und ermöglicht es, Rückschlüsse auf das pharmakologische Potenzial der Bibliotheken zu ziehen und Optimierungsmöglichkeiten zu erkennen.

Zu Beginn wurde analysiert, welcher Anteil der Bibliotheken wie MRTX1133 (**I-19**) mindestens vier Kriterien der RO5 erfüllen (Abb. 58). Außerdem wurde der Prozentsatz bestimmt, der drei der vier Parameter der RO4 einhält. Während die fokussierten Datenbanken von ChemDiv und LifeChemicals sowie die Drugbank-Bibliothek überwiegend RO5-konforme Verbindungen (87-98%) enthalten, zeigt die LDC/ChEMBL-Datenbank eine ausgeglichene Verteilung. Die Zuckerbibliothek hingegen erfüllt die RO5 nur zu 33%.

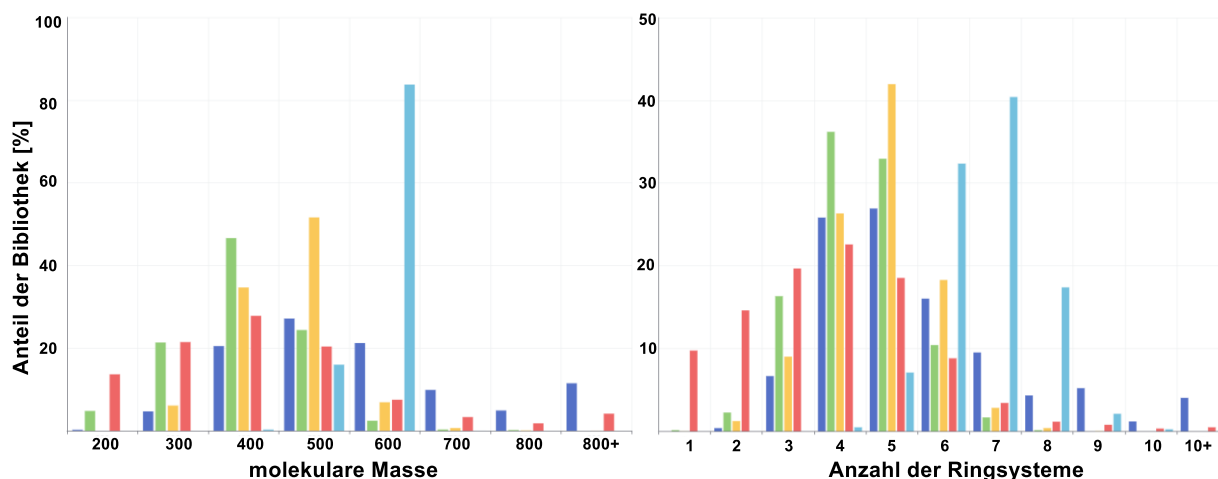


**Abb. 58:** Anteil der Verbindungen in den Bibliotheken, der die RO5 und RO4 erfüllt.

Die RO4-Analyse zeichnet ein differenziertes Bild. Zwar weist die LDC/ChEMBL-Datenbank eine gleichwertigere Verteilung zu den RO5 auf, allerdings erfüllen nur geringe Anteile der LC, ChemDiv und Drugbank die RO4 (17%, 33% und 18%). Die Verbindungen der Zucker-Datenbank halten zu 92% mindestens drei der vier RO4-Parameter ein. Damit positioniert sich die Zuckerbibliothek außerhalb des klassischen von Lipinski aufgestellten Raum für pharmazeutische Wirkstoffe. Dagegen erfüllen die

Verbindungen in hohem Maße die Anforderungen für Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren.

Im Folgenden wurden die Bibliotheken (lila = LDC/ChEMBL; grün = LC; gelb = ChemDiv; rot = Drugbank, hellblau = Zucker) mit drei 0D-Deskriptoren (molekulare Masse, Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren), drei 1D-Deskriptoren (Anzahl der Ringsysteme, Anzahl rotierbarer Bindungen sowie SLogP) dem Principal Moments of Inertia (PMI) als 3D-Deskriptor analysiert.

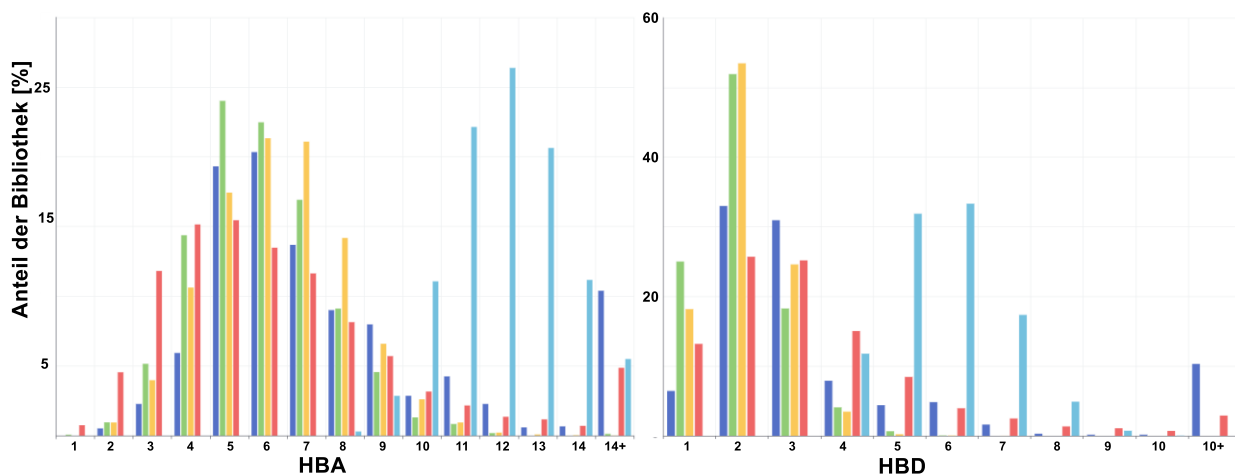


**Abb. 59:** Verteilung der molekularen Masse (links) und Anzahl der Ringsysteme innerhalb der einzelnen Bibliotheken (lila = LDC/ChEMBL; grün = LC; gelb = ChemDiv; rot = Drugbank, hellblau = Zucker).

Die Analyse der molaren Masse der LDC/ChEMBL-, LC-, ChemDiv- und Drugbank-Datenbanken zeigt vergleichbare glockenförmige Verteilungen mit Maxima bei 400-500 Da (Abb. 59). Im Gegensatz dazu ist die Zuckerdatenbank zu höheren Molekülmassen (~80% der Bibliothek besitzt eine Masse von 600 Da) verschoben. Dies ist auf die Vorfilter der Substituenten zurückzuführen. Die in den LDC/ChEMBL- und Drugbank-Bibliotheken auftretenden Verbindungen mit  $M > 700$  Da werden durch Makrozyklen und Cyclopeptide repräsentiert.

Auch hinsichtlich der Ringsysteme zeigt die Zuckerbibliothek eine höhere Anzahl (sieben Ringsysteme) als die verbleibenden vier Bibliotheken (Maximum bei vier-fünf Ringsystemen, Abb. 59). Die Analyse der beiden Parameter verdeutlicht, dass die Zuckerbibliothek im Vergleich zu klassischen Wirkstoffdatenbanken zu größeren, stärker funktionalisierten und topologisch komplexeren Molekülen tendiert. Ähnliches ist bei der Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren und-donoren zu beobachten (Abb. 60).

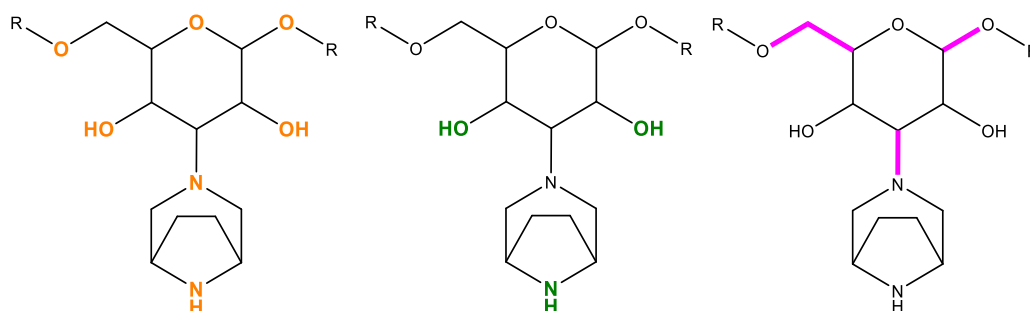
## 7. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 60:** Verteilung der Wasserstoffbrückenakzeptoren (links) und -donoren (rechts) innerhalb der einzelnen Bibliotheken (lila = LDC/ChEMBL; grün = LC; gelb = ChemDiv; rot = DrugBank, hellblau = Zucker).

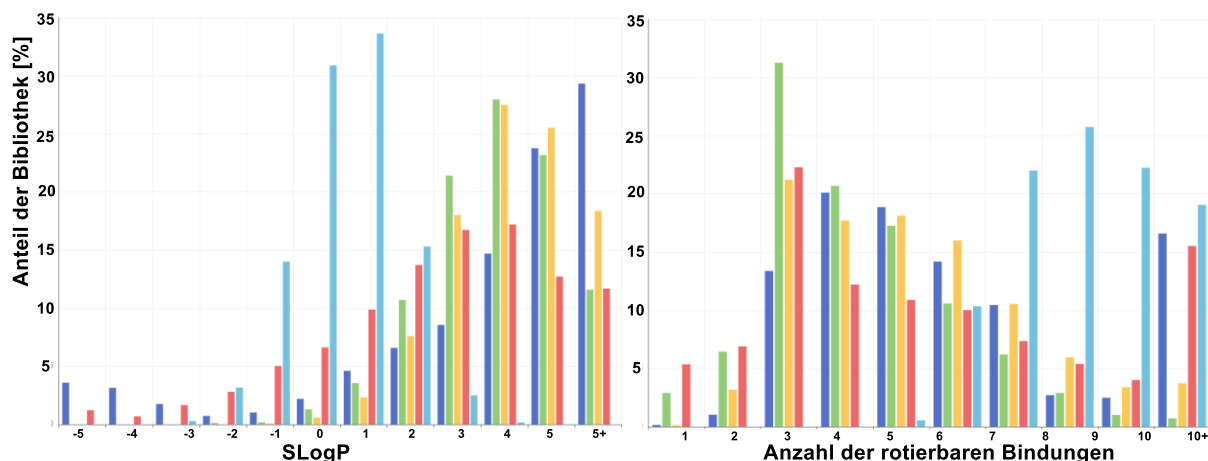
Die Anzahl der H-Brückenakzeptoren ist bei den kommerziellen und der LDC/ChEMBL-Bibliothek glockenförmig über den Bereich von 2-10 verteilt, mit einem Maximum bei 4-6 (Abb. 60). Demgegenüber ist die Zucker-Datenbank zu deutlich höheren Werten (9-14+) verschoben. Dies ist auf das Grundgerüst der Hexose und dem Piperazinring zurückzuführen, da beide Strukturen bereits sieben H-Akzeptoren besitzen (Abb. 61).

Analog verhält es sich bei den Wasserstoffbrückendonoren. Während die vier Bibliotheken (LC, ChemDiv, DrugBank, LDC/ChEMBL) Maxima bei zwei Donoren aufweisen (Bereich eins-fünf), enthält die Zuckerbibliothek überwiegend Verbindungen mit fünf bis sechs Donoren.



**Abb. 61:** Anzahl der H-Brückenakzeptoren (orange, links) -donoren (grün, mitte) und rotierbaren Bindungen (pink, rechts) des Ausgangsscaffolds der Zuckerbibliothek.

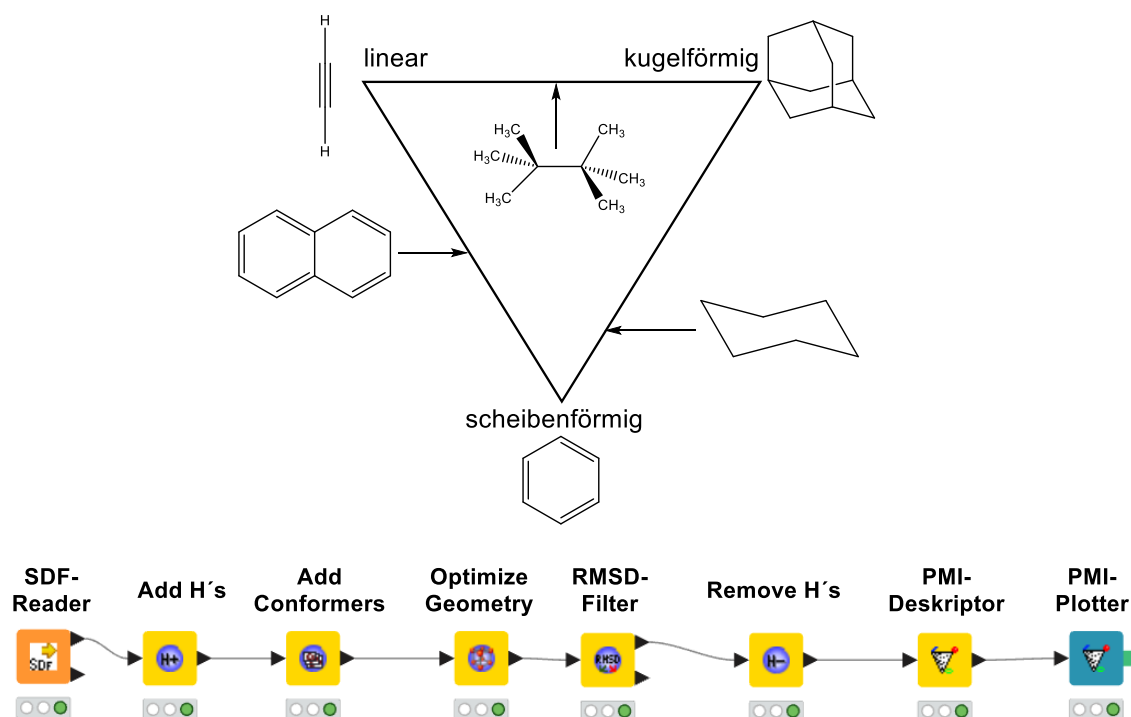
Die Analyse der H-Brückendonoren und -Akzeptoren zeigt eine hohe Polarität der Zuckerbibliothek und ein starkes Potential für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Dies spiegelt sich konsistent in den SLogP-Werten wider (Abb. 62).



**Abb. 62:** Verteilung des SLogP (links) und der Anzahl an rotierbaren Bindungen innerhalb der einzelnen Bibliotheken (lila = LDC/ChEMBL; grün = LC; gelb = ChemDiv; rot = DrugBank, hellblau = Zucker).

Während die LC-, ChemDiv-, LDC/ChEMBL- und DrugBank-Datenbanken überwiegend aus lipophilen Verbindungen ( $SLogP > 4$ ) aufgebaut sind, enthält die Zuckerbibliothek größtenteils hydrophile Verbindungen ( $SLogP \leq 1$ ). In Hinsicht auf die molekulare Flexibilität besitzen der Großteil der vier Vergleichsbibliotheken drei-fünf rotierbare Bindungen. Die Zuckermoleküle weisen aufgrund des bereits flexiblen Grundgerüsts (Abb. 61 magenta) deutlich mehr rotierbare Bindungen (sieben-zehn) auf (Abb. 62). Damit verstößt die Zuckerbibliothek gegen einen Großteil der klassischen ADME-Parameter in Form der RO5.

Die oben beschriebenen Deskriptoren decken den Bereich von 0D bis 2D ab. Da die biologische Erkennung von Liganden allerdings ein räumlicher Prozess ist, ist eine Analyse des räumlichen Aufbaus der Bibliotheken von hoher Relevanz. Ein geeigneter Deskriptor für Beschreibung der räumlichen Molekülstrukturen wurde 2003 von SAUER und SCHWARZ entworfen.<sup>[219]</sup> Dieser basiert auf den Hauptträgheitsmomenten der Verbindungen („*Principal Moment of Inertia*“ oder PMI). Zunächst wird dafür der sogenannte Trägheitstensor berechnet, der die Massenverteilung eines Moleküls relativ zu den drei orthogonalen Hauptachsen erfasst. Die Diagonalisierung dieser Matrix führt zu den drei Hauptträgheitsmomenten  $I_1$ ,  $I_2$  und  $I_3$ . Diese beschreiben, wie flach, langgezogen oder kugelförmig ein Molekül ist. Durch die Normierung der Werte ( $npr1 = I_1/I_3$ ,  $npr2 = I_2/I_3$ ) können die Molekülformen in einem zweidimensionalen, dreieckige (baryzentrisch)) PMI-Diagramm dimensionslos aufgetragen werden. Die Lage des Datenpunktes ist unabhängig von der Größe und beschreibt die Form des Moleküls (Abb. 63 oben). Lineare Moleküle sind demnach oben links, scheibenförmige Moleküle unten und sphärische Moleküle oben rechts abgebildet.



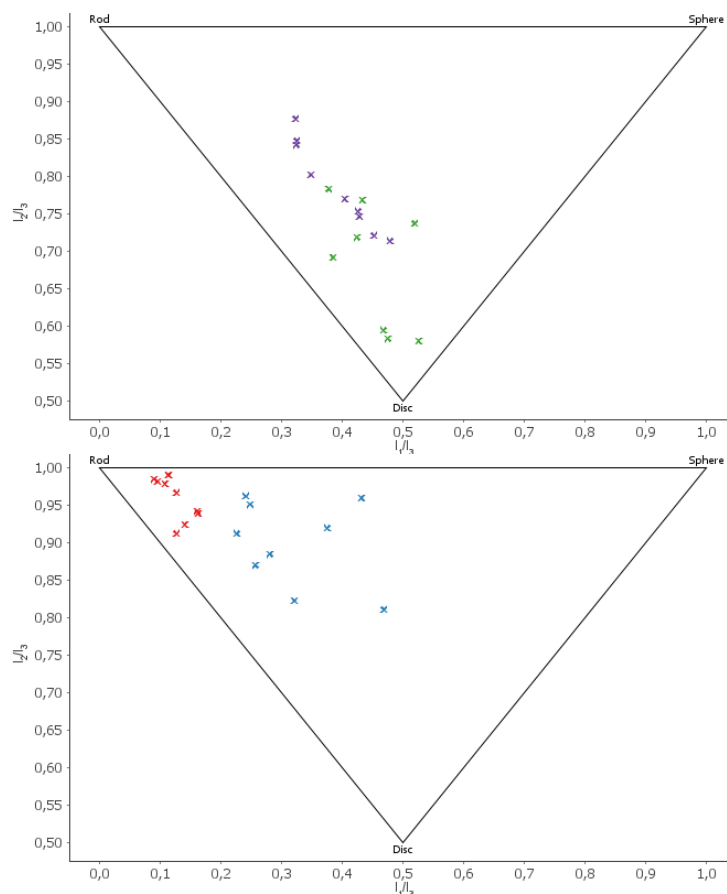
**Abb. 63:** oben: Einordnung bestimmter Molekülformen in das PMI-Diagramm. [Abbildung modifiziert nach SAUER *et al.*]<sup>[219]</sup> unten: PMI-Workflow in KNIME.

Die Berechnung und Auftragung des PMI-Plots wurden mit einem bereits verfügbaren Workflow<sup>[220]</sup> der KNIME-Software durchgeführt (Abb. 63 unten). Zunächst wurden explizit die Wasserstoffe der Verbindungen hinzugefügt (RDKit Add H's). Daraufhin wurden zehn Konformere jeder Substanz erzeugt (RDKit Add Conformers), die daraufhin Geometrieoptimierung unterzogen wurden (RDKit Optimize Geometry). Über einen RMSD-Filter wurden identische Konformationen entfernt und die Hauptträgheitsmomente  $I_{1-3}$  berechnet und normiert (PMI Derived Properties).

Die Analyse von mehreren Konformeren ist notwendig, da bereits kleine Änderungen der Torsionswinkel einen Einfluss auf die Trägheitsmomente haben. Das Einbeziehen mehrerer Konformere verbessert somit die Aussagekraft, indem es die Formvielfalt des Moleküls widerspiegelt. Die Unterschiede werden bei der Auftragung der drei K-Ras-Inhibitoren MRTX1133 (**I-19**, lila), BI-2852 (**I-15**, blau) und Ch-3 (**I-17**, rot) ersichtlich (Abb. 69 unten).

Obwohl MRTX1133 (**I-19**) ein rigides, planares Molekül darstellt, liegen die Konformere mittig zwischen dem linearen und scheibenförmigen Bereich. Der Glucosehybrid **II-7** zeigt die gleiche Tendenz innerhalb des Plots, mit einer etwas breiteren Verteilung hin zu scheibenförmig. Da das bicyklische Scaffold der MRTX-Verbindung **I-19** zu einem Zyklus umgewandelt wurde und das zweite Ringsystem über die Methylenetherkomponente lediglich imitiert wird, ist die breitere PMI-Verteilung eine logische Folge.

## 7. Ergebnisse und Diskussion

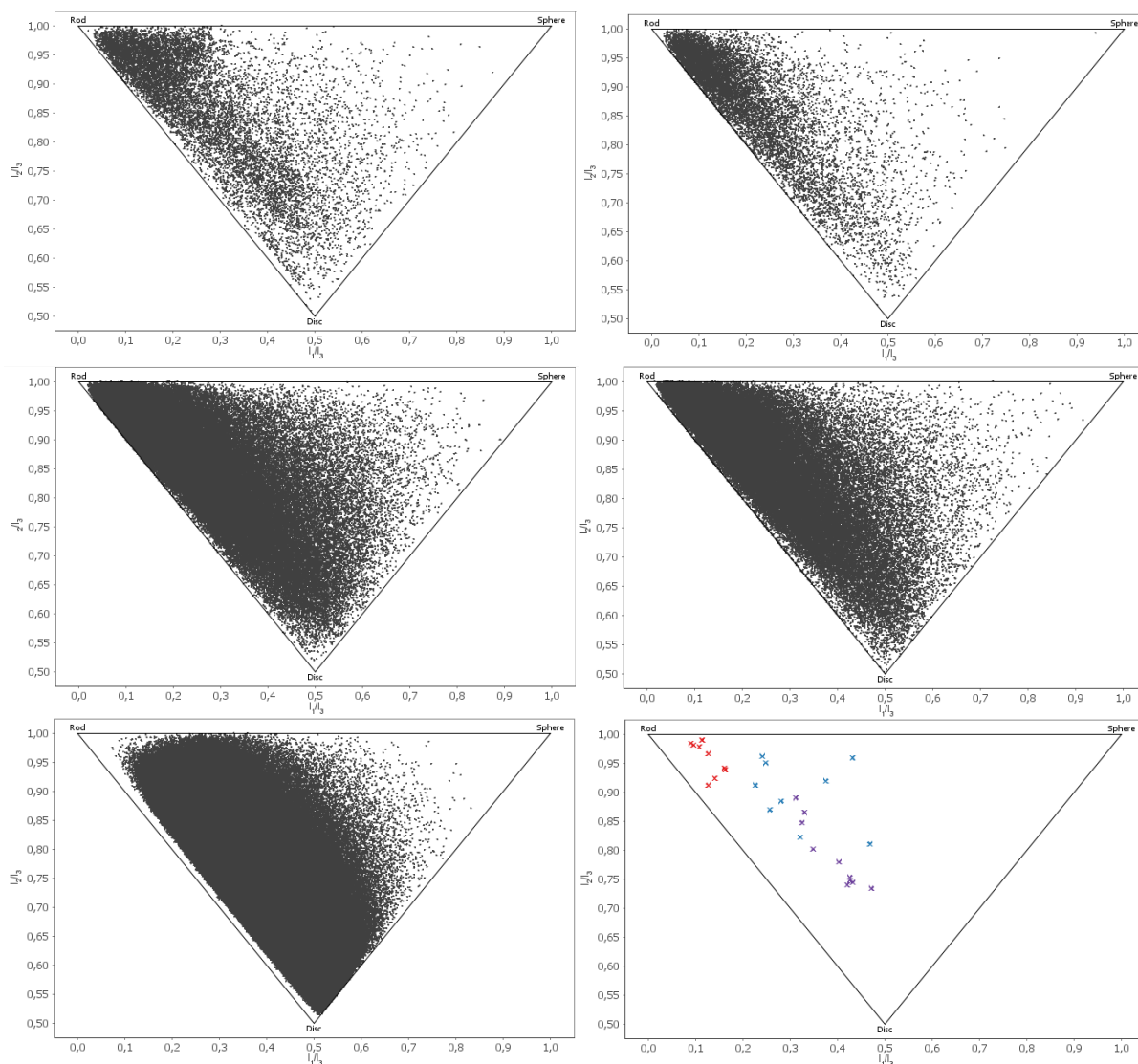


**Abb. 64:** PMI-Diagramm von MRTX1133 (**I-19**, lila) und dem Glucosehybrid **II-7** (grün, oben) sowie der Rabbits-Verbindung Ch-3 (**I-17**, rot) und BI-2852 (**I-15**, blau, unten).

Dahingegen weisen die Rabbits-Verbindung **I-17** und der BI-Inhibitor **I-15** einen deutlich lineareren Charakter im Bereich auf, der bei dem BI-Inhibitor **I-15** bis in den zentralen Bereich des Diagramms ausgeweitet ist. Da die BI-2852-Verbindung **I-15** mit sieben rotierbaren Bindungen die meisten der drei genannten Substanzen besitzt, ist dies auch plausibel. Im weiteren Verlauf wurden die fünf Bibliotheken (LDC, LC, ChemDiv, Drugbank, Zucker) mit dem PMI-Deskriptor analysiert (Abb. 65).

Aus der Analyse geht hervor, dass die vier Referenzbibliotheken eine vergleichbare Verteilung aufweisen. Die LDC/ChEMBL- im Vergleich mit der LC-Datenbank und die Drugbank-Bibliothek im Vergleich mit der ChemDiv-Datenbank zeigen in diesem Zusammenhang nahezu identische Diagramme. Den größten Anteil aller Bibliotheken bilden lineare Verbindungen. Die Menge der Substanzen nimmt entlang der Achse zu den scheibenförmigen Molekülen ab. Sphärische Verbindungen sind in den Bibliotheken wenig vorhanden.

## 7. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 65:** PMI-Plots der LDC/ChEMBL- (oben links), LC- (oben rechts), ChemDiv- (Mitte links), Drugbank- (Mitte rechts); Zuckerbibliothek (unten links) und der Referenzverbindungen aus Abb. 64 (unten rechts).

Den gleichen graphischen Verlauf weist die Zucker-Datenbank auf. Der Vergleich der Zuckerbibliothek mit den etablierten K-Ras-Inhibitoren MRTX1133 (**I-19**), Ch-3 (**I-17**) und BI-2852 (**I-15**) verdeutlicht (unten), dass die *in silico*-generierten Verbindungen trotz unterschiedlicher ADME-Eigenschaften denselben conformationalen Raum einnehmen. Allerdings wird aus den unterschiedlich großen Bibliotheken ein relevanter Nachteil ersichtlich: Da die Bibliotheken in den PMI-Darstellungen nicht normiert werden, hängt die Ausdehnung der einzelnen Punkte direkt von der Größe der jeweiligen Bibliotheken ab. Größere Datenbanken decken folglich einen wesentlich größeren Bereich des PMI-Raums ab. Daher ist die Interpretation und der direkte Vergleich der PMI-Plots zwischen unterschiedlich großen Bibliotheken nur begrenzt möglich.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die chemischen Strukturen der Zuckerbibliothek in den 0D-, 1D- und 2D-Deskriptoren deutlich von den fokussierten Ras-

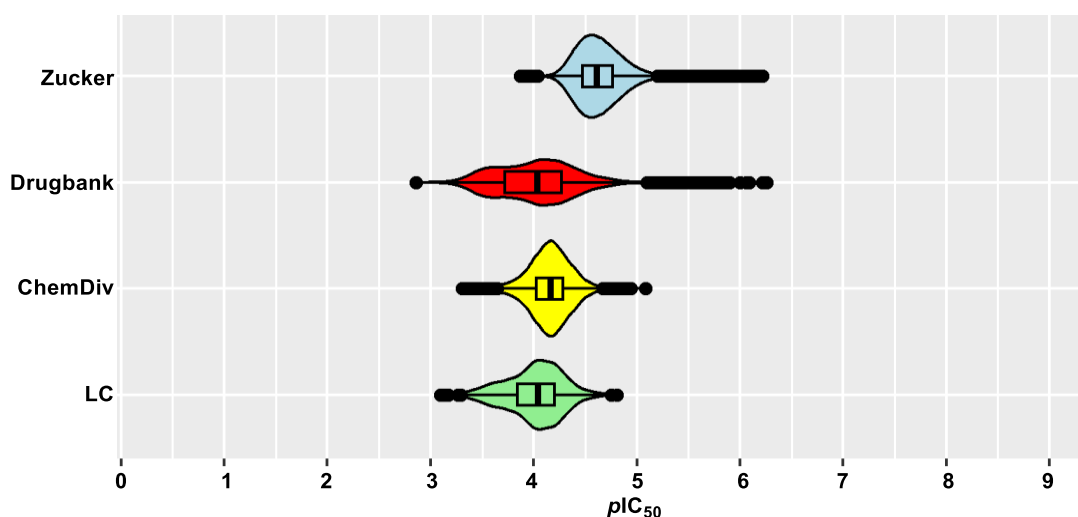
Bibliotheken der kommerziellen Anbieter LC und ChemDiv sowie der LDC/ChEMBL- und DrugBank-Datenbanken unterscheiden. So beinhaltet die erstellte Datenbank Verbindungen mit einer höheren Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren, Ringsystemen sowie rotierbaren Bindungen und besitzt deutlich lipophobere Verbindungen. Damit weicht die erstellte Bibliothek wesentlich von den etablierten ADME-Parametern, insbesondere den RO5, ab. Während allerdings zwei Drittel der Bibliothek gegen die Lipinski-Regeln verstoßen, erfüllen mehr als 90% der Substanzen mindestens drei der vier RO4-Kriterien. Die Inhibition des GDP/GTP-Austauschs an K-Ras beruht auf der allosterischen Blockade der Interaktionen mit dem SOS-Protein und die entsprechenden Verbindungen sind somit als Protein-Protein-Wechselwirkungsinhibitoren (iPPI's) einzustufen. Die PMI-Analyse verdeutlicht, dass die räumliche Orientierung der Verbindungen innerhalb der designten Zuckerdatenbank vergleichbare Tendenzen aufweist wie die fokussierten K-Ras-Bibliotheken. Insbesondere der Vergleich mit den etablierten K-Ras-Inhibitoren **I-15**, **I-17** und **I-19** weist eine hohe Übereinstimmung der dreidimensionalen Strukturen auf. Unter dem Aspekt, dass ein Großteil der Kohlenhydratverbindungen die RO4 erfüllen und es sich um grundlegend neue und modular variable Scaffolds handelt, wurde die Datenbank als geeigneter Ausgangspunkt für die Suche nach neuen K-Ras-Inhibitoren angesehen.

### 7.1.2 Vorhersage der biologischen Aktivität und Docking Analyse

Nach der Analyse des chemischen Raums soll die biologische Aktivität der *in silico*-Zuckerbibliothek mit dem QSAR-Modell von NAVA HÖER vorhergesagt werden. Das Modell enthält keine Stereoinformationen und liefert für die einzelnen Stereoisomere chiraler Substanzen die gleichen Ergebnisse. Daher soll die Vorhersage der Bibliothek zunächst die vielversprechendsten Substituenten für das Zuckerscaffold liefern und nachfolgend die aussichtsreichste Konfiguration des Monosaccharids in einer Docking Studie ermittelt werden.

Für die Identifikation von SOS1-Inhibitoren publizierten DUO *et al.* 2024 ein Python-basiertes QSAR-Modell.<sup>[221]</sup> Dieses basiert auf einem 512-bit ECFP („*Extended Connectivity Fingerprint*“), der eine eindimensionale Repräsentation der zweidimensionalen Struktur ist. Die Erweiterung mit 20 weiteren Deskriptoren führte zu einer Zusammensetzung aus 532 Deskriptoren, die für die Beschreibung der LDC/ChEMBL-Datenbank verwendet wurden. Das QSAR-Modell von NAVA HÖER basiert auf den gemessenen IC<sub>50</sub>-Werten des NA<sup>G12D</sup>-Assays, da für diesen Assay biologische

Daten für alle Verbindungen vorlagen. Die Analyse von zehn verschiedenen Regressor-Modellen wies nach, dass der *random forest*-Regressor die beste Voraussagekraft bewies. Dies wurde über den Vergleich der Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) und der RMSE- („*Root Mean Square Error*“) Werte ermittelt. Der  $R^2$ -Wert gibt den durchschnittlichen Abstand der experimentellen Datenpunkte zu der Regressionsgerade an und liegt zwischen 0 (keine Abhängigkeit der Variablen) und 1 (perfekte Korrelation). 2018 publizierten LAGUNIN *et al.* einen Vergleich von SAR- und QSAR-Modellen ebenfalls basierend auf ChEMBL-Daten für die Vorhersage von Inhibitoren an Antitargets.<sup>[222]</sup> Während die Autoren für das entsprechende QSAR-Modelle einen  $R^2$ -Werte von 0.59 und einen RMSE-Wert von 0.73 erhielten, ergab der *random forest*-Regressor von NAVA HÖER mit  $R^2 = 0.794$  und  $RMSE = 0.638$  deutlich höherwertige Kennzahlen und bildet somit ein solides Prognosemodell für unbekannte K-Ras-Inhibitoren. Die Ergebnisse der Vorhersage sind in Abb. 66 in Form von Violinen-Plots aufgeführt.

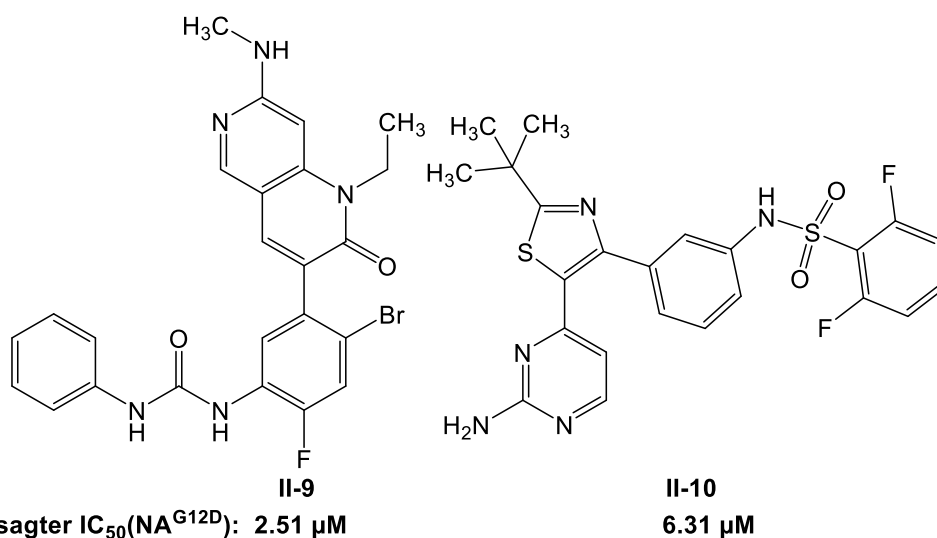


**Abb. 66:** Violinenplots der vorhergesagten Ergebnisse.

Aus den Auftragungen wird ersichtlich, dass die beiden kommerziellen, fokussierten Datenbanken von LC und ChemDiv annähernd gleiche Verläufe zeigen. Beide Bibliotheken lieferten lediglich vorhergesagte  $pIC_{50}$ -Werte zwischen 3 und 5. Dies entspricht  $IC_{50}$ -Werten von  $10 \mu M$  bis  $1 mM$ . Vor dem Hintergrund einiger im Projekt A diskutierten Verbindungen bieten diese Datenbanken somit keine vielversprechenden Inhibitoren.

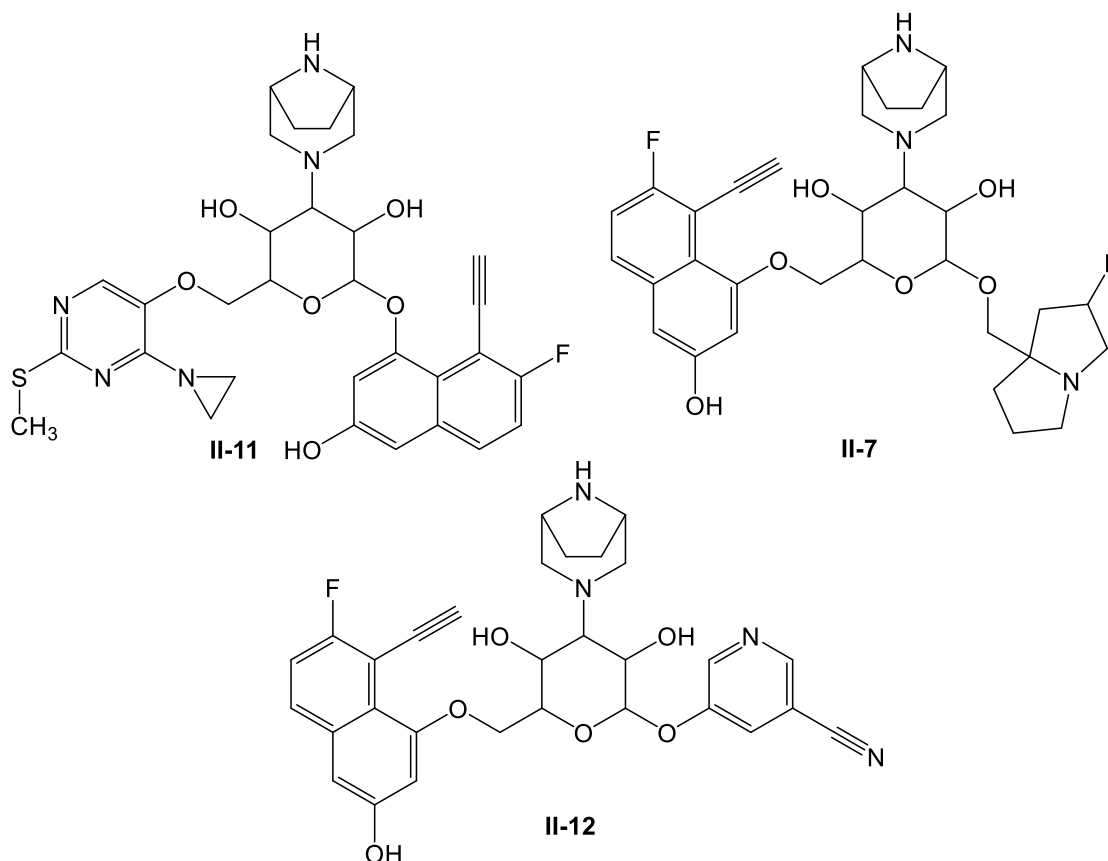
Die Drugbank-Datenbank erzielte zwar prognostizierte  $IC_{50}$ -Werte bis zu  $630 nM$  ( $pIC_{50} = 6.2$ ), diese aussichtsreichen Ergebnisse relativieren sich allerdings bei Betrachtung der Strukturformeln. Alle im nanomolaren Bereich vorhergesagten Verbindungen stellen Makrozyklen bzw. große Naturstoffe mit Molmassen  $>1000 Da$  dar

(siehe Anhang Abb. 78). Da für die K-Ras-Inhibition bislang keine makromolekularen Naturstoffe bekannt sind und in der LDC/ChEMBL-Datenbank dementsprechend keine enthalten waren, basieren die auffallend guten Ergebnisse wahrscheinlich auf der Extrapolation der wenigen Zyklopeptide in der für das Training genutzten LDC-Bibliothek. Daher erlauben die Prognosen der Naturstoffe nur eine vorsichtige Interpretation und sind mit entsprechender Zurückhaltung zu betrachten. Immerhin lieferten der Harnstoff **II-9** und das Sulfonamid **II-10** als Vertreter der *Small Molecules* mit 2,51  $\mu\text{M}$  bzw. 6,31  $\mu\text{M}$  auffällige Ergebnisse (Abb. 67).



**Abb. 67:** *Small Molecules* mit den niedrigsten vorhergesagten  $\text{IC}_{50}$ -Werten aus der DrugBank-Bibliothek.

Im Gegensatz dazu ergab die Vorhersage der designten Zuckerbibliothek insgesamt 21 Verbindungen im nanomolaren Bereich. Hervorzuheben ist, dass alle Substanzen den Naphthalen-Substituenten der MRTX-Verbindung enthalten. Da lediglich MRTX1133 (**I-19**) und die Derivate also nanomolare K-Ras-Inhibitoren bekannt sind, ist die hohe strukturelle Übereinstimmung bei den Vorhersagen für die niedrigsten  $\text{IC}_{50}$ -Werte eine logische Konsequenz. In Abb. 68 sind einige der vorhergesagten Strukturen aufgeführt.



**Abb. 68:** Vorhergesagte Verbindungen aus der *in silico*-Zuckerbibliothek.

Bemerkenswerterweise zeigen acht Verbindungen eine höhere vorhergesagte Aktivität als die Hybrids substanz **II-7** mit 904 nm. Der Naphthalen-Substituent ist dabei nicht konsequent an der C6-Position lokalisiert (Abb. 68). Beispielsweise ist der Naphthalen-Substituent bei der Verbindung **II-11**, die mit 603 nm den niedrigsten vorhergesagten  $IC_{50}$ -Wert aufweist, an der C1-Position gebunden. Der dritte Substituent des Zuckers **II-11** ist ein dreifach substituierter Pyrimidinring an der C6-Position. Aufgrund der im Vergleich zu MRTX1133 (**I-19**) veränderten räumlichen Anordnung wurden Verbindungen wie **II-11** mit dem Naphthalen-Substituenten an der C1 statt der C6-Position nicht weiter für die weiteren Arbeiten berücksichtigt.

**Tab. 19:** Vorhergesagte  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen aus Abb. 68.

	vorhergesagter $IC_{50}(NA^{G12D})$ [nm]
<b>II-11</b>	603
<b>II-7</b>	800
<b>II-12</b>	904

19 der 21 Verbindungen im vorhergesagten nanomolaren Bereich besaßen als dritten Substituenten ein stickstoffhaltiges Ringsystem. Darunter fiel auch die Verbindung **II-12** mit einem vorhergesagten  $IC_{50}$ -Wert von 800 nm, das einen Cyanopyridinrest als dritten

Substituenten aufwies. Die wiederholte Präsenz stickstoffhaltiger Heterozyklen unter den bestbewerteten Strukturen deutet auf eine zentrale Rolle dieses Motivs für Ras-Inhibitoren hin. Vor diesem Hintergrund sollte zusätzlich zu der MRTX-Zucker-Hybridverbindung **II-7** für die Verbindung **II-12** das vielversprechendste Monosaccharidgerüst über das Ligand Docking identifiziert werden.

Daher wurden alle Stereoisomere von der Hybridverbindung **II-7** auf die Kristallstruktur 7RPZ mit dem MRTX-Liganden **I-19** gedockt. Die Docking-Studie verdeutlicht, dass der DS signifikant von der räumlichen Ausrichtung der Substituenten und damit von den einzelnen Monosacchariden abhängig ist (Tab. 20).

**Tab. 20:** Docking Scores der einzelnen Monosaccharide-Scaffolds von Verbindung **II-7** auf die SII-Bindestelle (PDB Code: 7RPZ)

Substanz	DS 7RPZ [kcal/mol]	Substanz	DS 7RPZ [kcal/mol]	Substanz	DS 7RPZ [kcal/mol]
<b>MRTX [1]</b>	<b>-11.7</b>	$\alpha$ -L-Galactose	-4.47	$\beta$ -D-Idose	-8.06
$\alpha$ -D-Allose	-7.62	<b><math>\beta</math>-L-Galactose</b>	<b>-10.9</b>	$\alpha$ -L-Idose	-7.00
$\beta$ -D-Allose	-6.07	$\alpha$ -D-Glucose	-8.20	$\beta$ -L-Idose	-6.43
$\alpha$ -L-Allose	-7.69	<b><math>\beta</math>-D-Glucose</b>	<b>-14.7</b>	$\alpha$ -D-Mannose	-5.71
<b><math>\beta</math>-L-Allose</b>	<b>-14.8</b>	$\alpha$ -L-Glucose	-6.05	$\beta$ -D-Mannose	-7.42
$\alpha$ -D-Altrose	-8.15	$\beta$ -L-Glucose	-8.93	$\alpha$ -L-Mannose	-5.95
$\beta$ -D-Altrose	-6.57	$\alpha$ -D-Gulose	-7.00	<b><math>\beta</math>-L-Mannose</b>	<b>-11.5</b>
$\alpha$ -L-Altrose	-7.54	$\beta$ -D-Gulose	-8.66	$\alpha$ -D-Talose	-7.61
$\beta$ -L-Altrose	-7.27	$\alpha$ -L-Gulose	-7.00	$\beta$ -D-Talose	-8.62
$\alpha$ -D-Galactose	-6.59	$\beta$ -L-Gulose	-7.60	$\alpha$ -L-Talose	-8.53
$\beta$ -D-Galactose	-7.75	$\alpha$ -D-Idose	-7.95	$\beta$ -L-Talose	-7.34

Mit  $\beta$ -L-Allose (-14.8 kcal/mol),  $\beta$ -D-Glucose (-14.7 kcal/mol),  $\beta$ -L-Mannose (-11.5 kcal/mol) und  $\beta$ -L-Galactose (-10.9 kcal/mol) besitzen lediglich vier der 32 Hybridsubstanzen einen DS, der im gleichen Bereich der Referenzverbindung **I-19** oder besser liegt. Auffallend ist, dass alle vier Verbindungen das  $\beta$ -Anomer darstellen und drei der vier Verbindungen, die nicht natürliche L-Form aufweisen.

Im Gegensatz zu den natürlich vorkommen D-Zuckern sind die L-Formen der Kohlenhydrate nur synthetisch zugänglich und daher sehr kostspielig. Aufgrund der gleichwertigen *in silico*-Ergebnisse des Allose- und Glucosehybrides bietet sich aufgrund

der einfacheren Zugänglichkeit die Synthese des Glucosederivats **II-7** an. Mit einem aussichtsreichen DS von -12.5 kcal/mol sollte auch das Derivat **II-12** in der *gluco*-Konfiguration synthetisiert werden. Beide Substanzen zeigen außerdem eine hohe Übereinstimmung in der räumlichen Ausrichtung der Substituenten (Abb. 69) mit MRTX1133 (**I-19**).

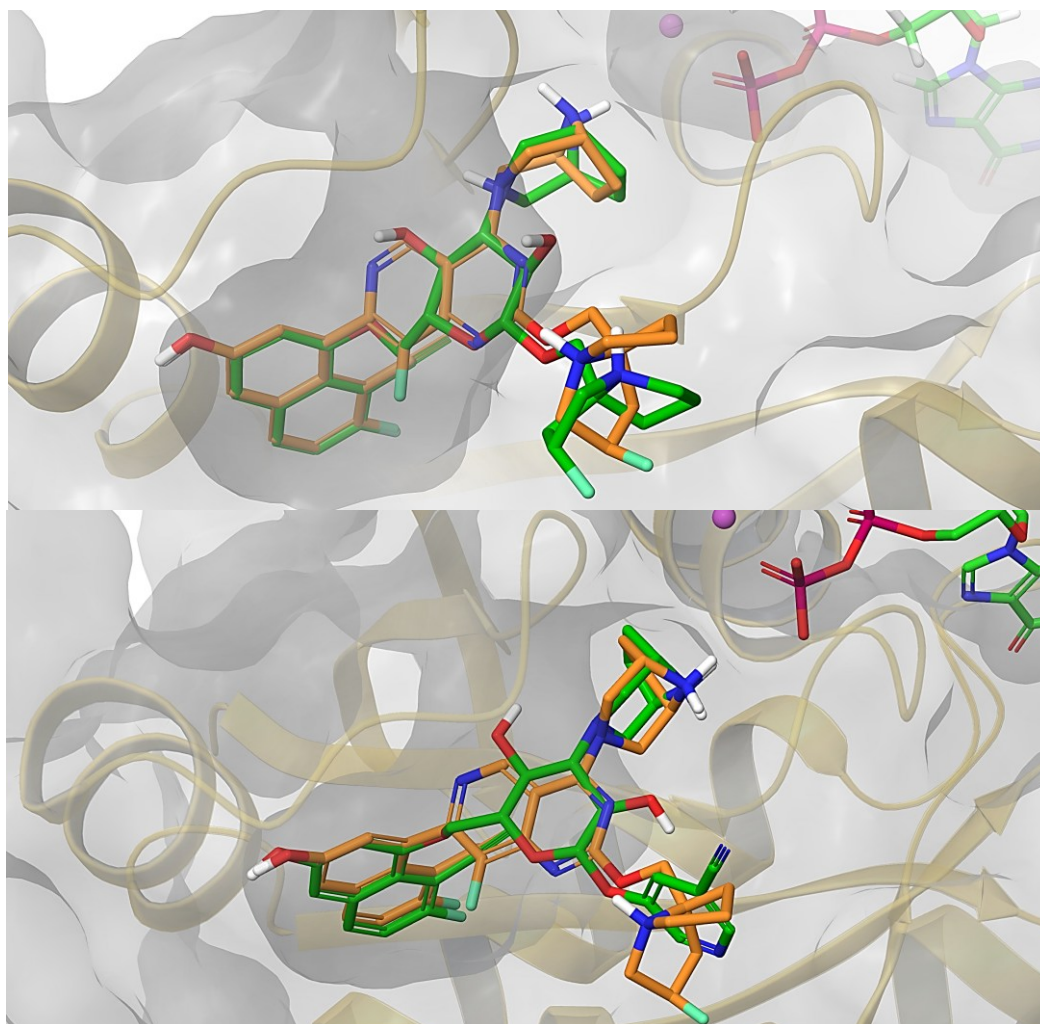


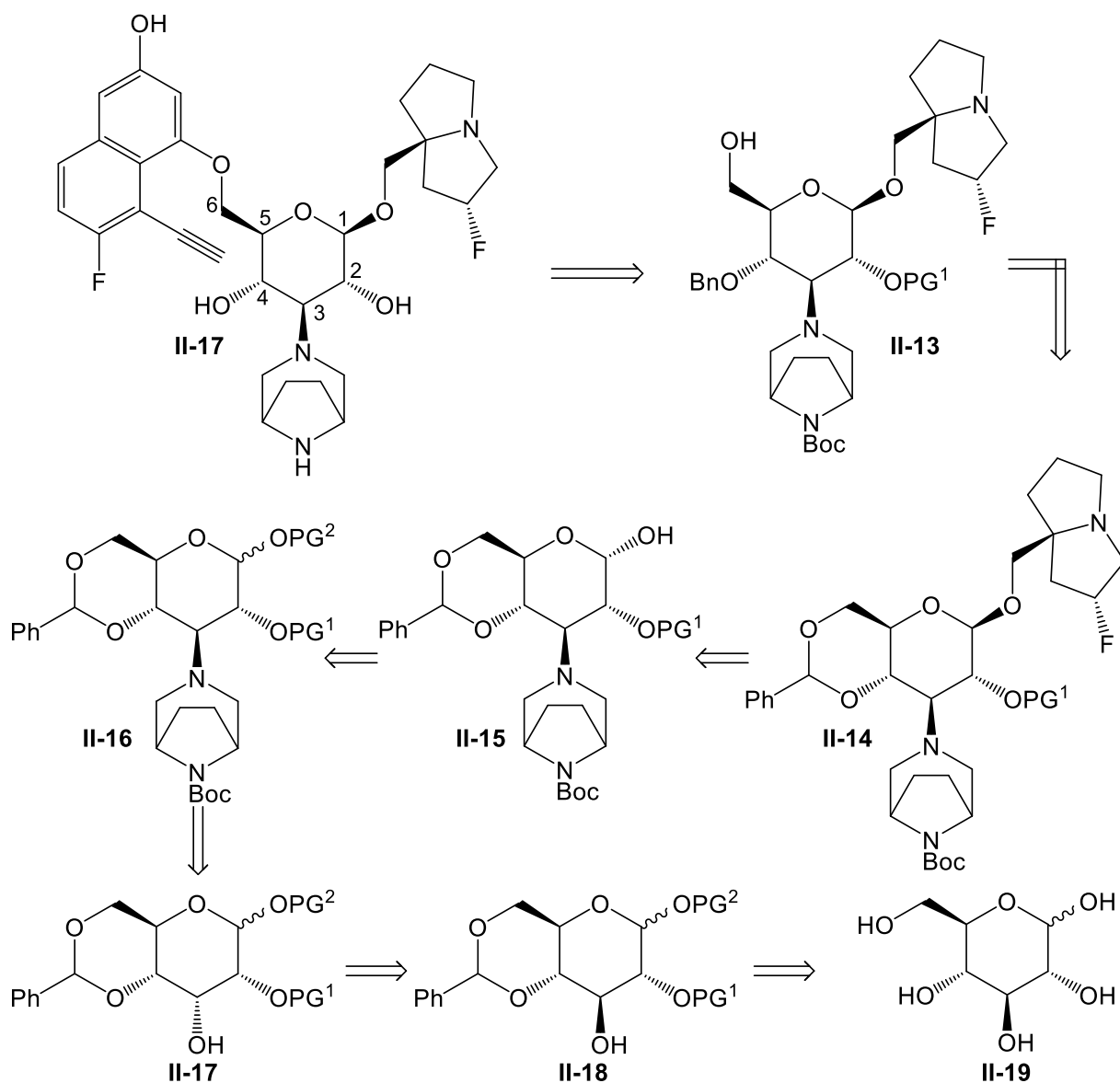
Abb. 69: Superposition von MRTX1133 (**I-19**, orange) mit dem  $\beta$ -D-Glucosehybrid **II-7** (oben) und **II-12** (unten)

## 7.2 Synthesen

### 7.2.1 Syntheseplanung

In Schema 24 ist die Retrosynthese für die Hybridsubstanz **II-7** aufgeführt. Das zweite Derivat **II-12** sollte unter Einsatz des entsprechenden Reagenzes bei der Einführung des Substituenten an der anomeren Position analog hergestellt werden. Die retrosynthetische Zerlegung der Verbindung **II-7** beginnt mit der Spaltung des Ethers der C6-Position. Daraus ergibt sich das freie Phenol **II-14**. Für die Schutzgruppenstrategie der C4- und C6-Position wird üblicherweise die Phenylacetalgruppe eingesetzt. Diese besitzt den Vorteil, dass sich durch Variation der Reaktionsbedingungen selektiv entweder die C4-

oder die C6-Position freilegen lässt, während die jeweils andere Position benzylgeschützt verbleibt.<sup>[223]</sup> Daraus ergibt sich die Verbindung **II-14**, die aus dem Alkohol **II-15** gewonnen wird.



**Schema 24:** Retrosynthetische Zerlegung der Hybrids substanz **II-7**.

Die Glycosylierungsreaktion ermöglicht die stereoselektive Einführung von Aglykonen. Da der Pyrrolizidinsubstituent in  $\beta$ -Stellung gebunden sein soll, kann eine Carboxylgruppe an der C2-Position über den Nachbargruppeneffekt den nukleophilen  $\alpha$ -Angriff unterdrücken. Infolgedessen sollte eine Acetyl- oder eine Benzoyl-Schutzgruppe an der C2-Position eingesetzt werden. Die Verbindung **II-16** verfügt über eine säurelabile Schutzgruppe in Form von dem Acetal an der C4- und C6-Position und über eine basenlabile Schutzgruppe in Form von der Carboxylgruppe an der C2-Position. Für die selektive anomere Entschützung ist somit eine orthogonale Gruppe notwendig, die durch einen Allylether bereitgestellt wird.<sup>[224,225]</sup>

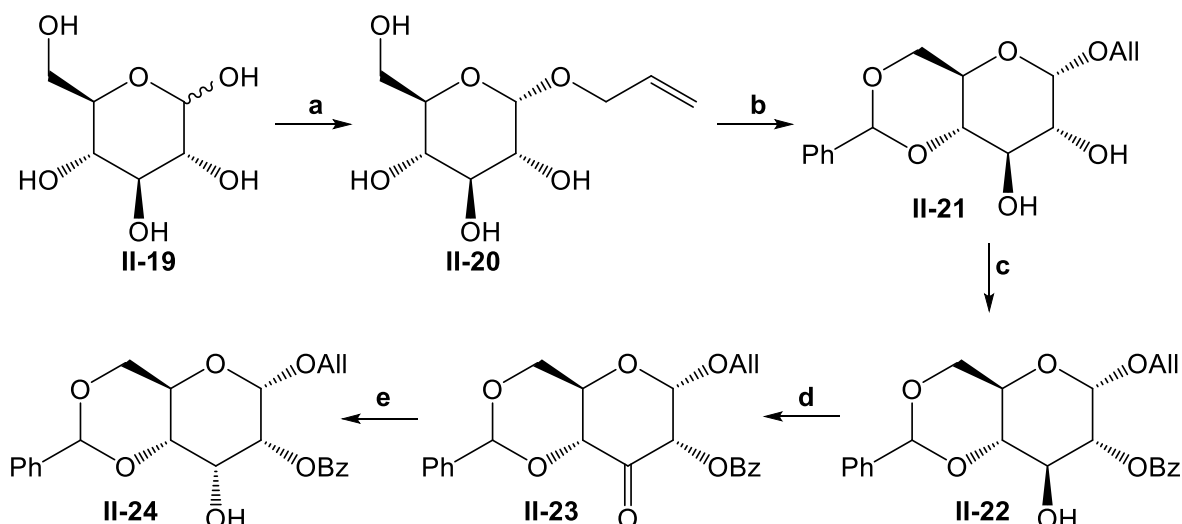
Substituenten an der C2-C4-Position werden mittels  $S_N2$ -Substitutionen eingeführt. Hierzu werden die entsprechenden Alkohole zunächst in Triflate oder Tosylate als gute Abgangsgruppen überführt. Die Reaktion erfolgt unter Inversion des Stereozentrums, sodass im Vorfeld von dem jeweiligen Epimer ausgegangen werden muss. Da die Substituenten der Hybrids substanz **II-7** in der  $\beta$ -D-*glyco*-Konfiguration vorliegen, muss der Piperazin-Substituent an dem D-*allo*-Scaffold eingeführt werden. Prinzipiell kann dafür von der D-Allose ausgegangen werden. Diese ist mit Preisen zwischen 200-500 €/g jedoch sehr kostspielig. Eine praktikable Alternative stellt die selektive C3-Epimerisierung dar, mit der Folge, dass die Verbindung **II-17** aus der orthogonal geschützten, deutlich kostengünstigeren D-Glucose gewonnen werden kann.

Bei der Einführung des C3-Substituenten bestehen zwei große Herausforderungen. Zum einen sind nur wenige Kohlenhydrate bekannt, die einen über den Stickstoff gebundenen Heterozyklus tragen. Morpholin oder Piperidinringe als C3-Substituenten sind lediglich für sterisch uneingeschränkte Zuckergerüste, wie das Desosamin, publiziert, für Glucose hingegen nicht.<sup>[226,227]</sup>

Zum anderen werden stickstoffhaltige Ringsysteme häufig ausgehend von den entsprechenden Aminen zyklisiert. Auf diesem Wege wurde bereits eine Reihe an Morpholin-Derivaten an der C2-Position aufgebaut.<sup>[228–230]</sup> Für das verbrückte Piperazin-Derivat ist dieser Ansatz jedoch wenig geeignet, da die benötigte Vorstufe für die Zyklisierung nur mit erheblichem synthetischem Aufwand zugänglich ist, während die für die Substitution benötigte, einfach geschützte Verbindung als Kaufsubstanz verfügbar ist. Daher sollte untersucht werden, ob eine Substitution des verbrückten Piperazins an C3-Position erfolgreich realisiert werden kann.

### 7.2.2 Synthese der Zucker-MRTX-Hybrids substanz

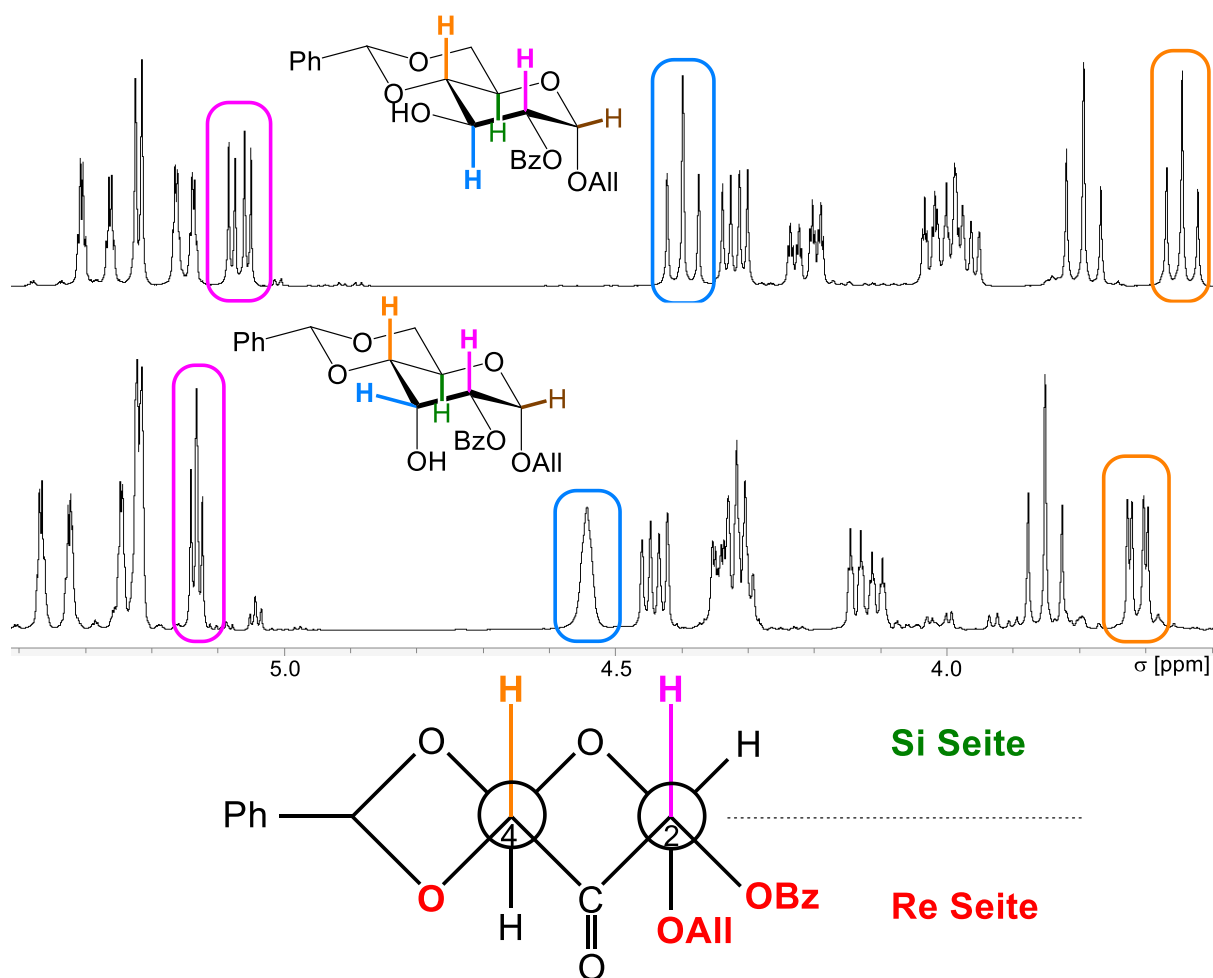
Für die Einführung des ersten Substituenten in Form des verbrückten Piperazins wurde aufgrund der Inversion des Stereozentrums bei der  $S_N2$ -Reaktion zunächst das D-Glucose-Scaffold in das C3-epimere D-Allose-Scaffold konvertiert (Schema 25).



**Schema 25:** Herstellung des dreifach orthogonal geschützten D-Allose-Scaffolds. a) AcCl, Allylalkohol, Reflux, 90 min; b) Benzaldehyddimethylacetal, CSA, DMF, 4 h, 20 °C, 39% über zwei Schritte; c) 1-(Benzoyloxy)benzotriazol, TEA, DCM, RT, 4 h, 74%; d) DMP, NaHCO<sub>3</sub>, DCM, RT, 17 h; e) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 → RT, 17 h, 76% über zwei Schritte.

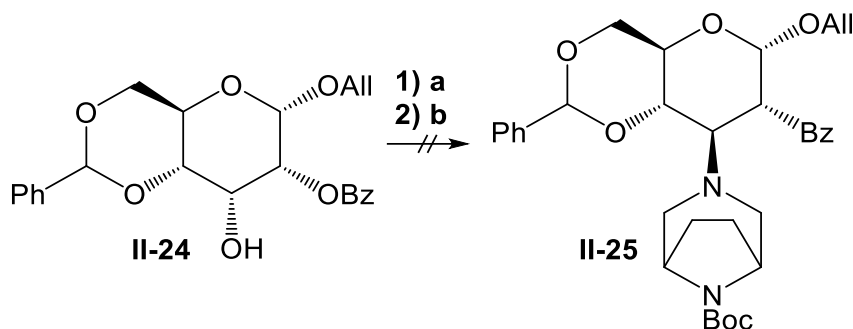
Im ersten Schritt wurde die anomere Position der D-Glucose (**II-19**) nach einem Standardverfahren zunächst säurekatalytisch mit Acetylchlorid und Allylalkohol in den Allylether **II-20** überführt, der ohne Aufreinigung mit Benzaldehyddimethylacetal zu dem Acetal **II-21** in 39% Ausbeute über zwei Schritte umgesetzt wurde.<sup>[231]</sup> Die Reaktion findet bei vermindertem Druck statt, um das entstehende Methanol aus dem Gleichgewicht zu entfernen und dieses auf die Seite des Produkts **II-21** zu verschieben. Die unterschiedlichen Reaktivitäten der verbleibenden Hydroxygruppen ermöglichten eine selektive Benzoylierung der C2-Position mit 74% Ausbeute.<sup>[231]</sup> Das für die Benzoylierung benötigte 1-(Benzoyloxy)benzotriazol wurde zuvor aus 1-Hydroxybenzotriazol und Benzylchlorid mit 82% Ausbeute synthetisiert. Für die C3-Epimerisierung wurde der Alkohol **II-22** in einer Vorschrift nach DEL VIGO *et al.* zu dem entsprechenden Keton **II-23** oxidiert, das im zweiten Schritt mit Natriumborhydrid bei 0 °C thermodynamisch kontrolliert in das Allose-Derivat **II-24** konvertiert wurde. Bei der Umsetzung des Alkohols **II-22** mit IBX, wie von den Autoren verwendet, wurde keine Umsetzung zu dem gewünschten Keton beobachtet.<sup>[232]</sup> Auch der Einsatz von DMP änderte diesen Umstand zunächst nicht. Erst unter Verwendung von NaHCO<sub>3</sub> als Puffer konnte das Keton **II-23** erfolgreich hergestellt werden. Dass die Zugabe von Wasser die Reaktionsgeschwindigkeit von Oxidationsreaktionen mit DMP drastisch erhöht, beobachteten MEYER *et al.* bereits 1994.<sup>[233]</sup> Als Grund gaben die Autoren die Bildung reaktiverer Intermediate an. Für die Oxidation von Naturstoffen führten HERAVI *et al.* auf, dass der Einsatz von gepufferten DMP-Bedingungen vor allem für pH-empfindliche Verbindungen geeignet ist, da die gebildete Essigsäure abgefangen wird.<sup>[234]</sup>

Die Stereo inversion der C3-Position wurde mittels NMR-Analytik nachgewiesen (Abb. 70 oben). In den  $^1\text{H}$ -Spektren der beiden C3-Epimere **II-22** und **II-24** sind die Wasserstoffatome der C2- (magenta), C3- (blau) und C4-Position (orange) hervorgehoben. In der *D*-*gluco*-Konfiguration weist das H-2 aufgrund des  $\beta$ -Wasserstoffes der anomeren Position (braun) und des axialen H-3 ein Doppeldublett auf. Die beiden axial benachbarten H-Atome resultieren in einem Triplet des H-3 (magenta und orange) und des H-4 (blau und grün). Aufgrund der äquatorialen Ausrichtung des H-3 in der *D*-*allo*-Konfiguration ändern sich lediglich die Signale für das H-2 (Triplet), H-3 (Singulett) und H-4 (Doppeldublett). Das Singulett des H-3 stellt ein Triplet dar, das aufgrund der zu kleinen Kopplungskonstanten der axialen Nachbarwasserstoffatome jedoch zu einem breiten Singulett verschmilzt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Beschreibungen von DEL VIGO *et al.* überein. Aufgrund der thermodynamischen Kontrolle postulierten die Autoren einen Mechanismus, der aufgrund der sterischen Hinderung der Re-Seite (rot) durch die C1-, C2- und C4-Substituenten über einen Hydridangriff an der Si-Seite (grün) verläuft (Abb. 70 unten).<sup>[232]</sup>



**Abb. 70:**  $^1\text{H}$ -Spektrum der beiden C3-Epimere (oben) und schematische Darstellung der sterisch gehinderten Re-Seite (unten). [Abbildung modifiziert nach DEL VIGO *et al.*]<sup>[232]</sup>

Im nächsten Schritt wurde der Alkohol mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid ( $\text{Tf}_2\text{O}$ ) in das entsprechende Triflat überführt, das danach durch das verbrückte Piperazin substituiert werden sollte (Schema 26).



**Schema 26:** Reaktionsbedingungen der Substitutionsreaktion. a) Pyridin,  $\text{Tf}_2\text{O}$ , DCM,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h; b) tert-Butyl-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-8-carboxylat, DMF, 17 h, RT.

Üblicherweise wird das Triflat in DMF gelöst und über 16 h bei Raumtemperatur mit dem Nukleophil, das bei Aminen ebenfalls als Base in zweifachen Äquivalenten eingesetzt wird, umgesetzt. Diese Bedingungen lieferten jedoch nicht das gewünschte Produkt **II-25**. Auch die Deprotonierung des Amins durch die sehr starken Basen Natriumhydrid, *n*-Butyllithium (BuLi) oder Lithiumdiisopropylamin (LDA) änderte diesen Umstand nicht. Infolgedessen wurde versucht, die Reaktion über die Bildung des Piperazin-Metallamids einzuleiten. Hierfür wurde die Lewis-Säure Trimethylaluminium ( $\text{AlMe}_3$ ) eingesetzt. Nach der Deprotonierung des Amins zeichnen sich die gebildeten Metallamide durch eine hohe Nukleophilie aus und ermöglichen eine Vielzahl an Reaktionen.<sup>[235]</sup> So führt die Verwendung von  $\text{AlMe}_3$  bspw. zu einer direkten Amidkupplung zwischen Carbonsäure und Amin.<sup>[236]</sup> Trotz dieser bekannten Reaktivität führte jedoch auch der Einsatz von  $\text{AlMe}_3$  nicht zur Bildung des gewünschten Produkts **II-25**. Allerdings wurde auch keine Zersetzung der Edukte beobachtet.

**Tab. 21:** Reaktionsbedingungen der in Abb. 28 aufgeführten Substitutionsreaktion.

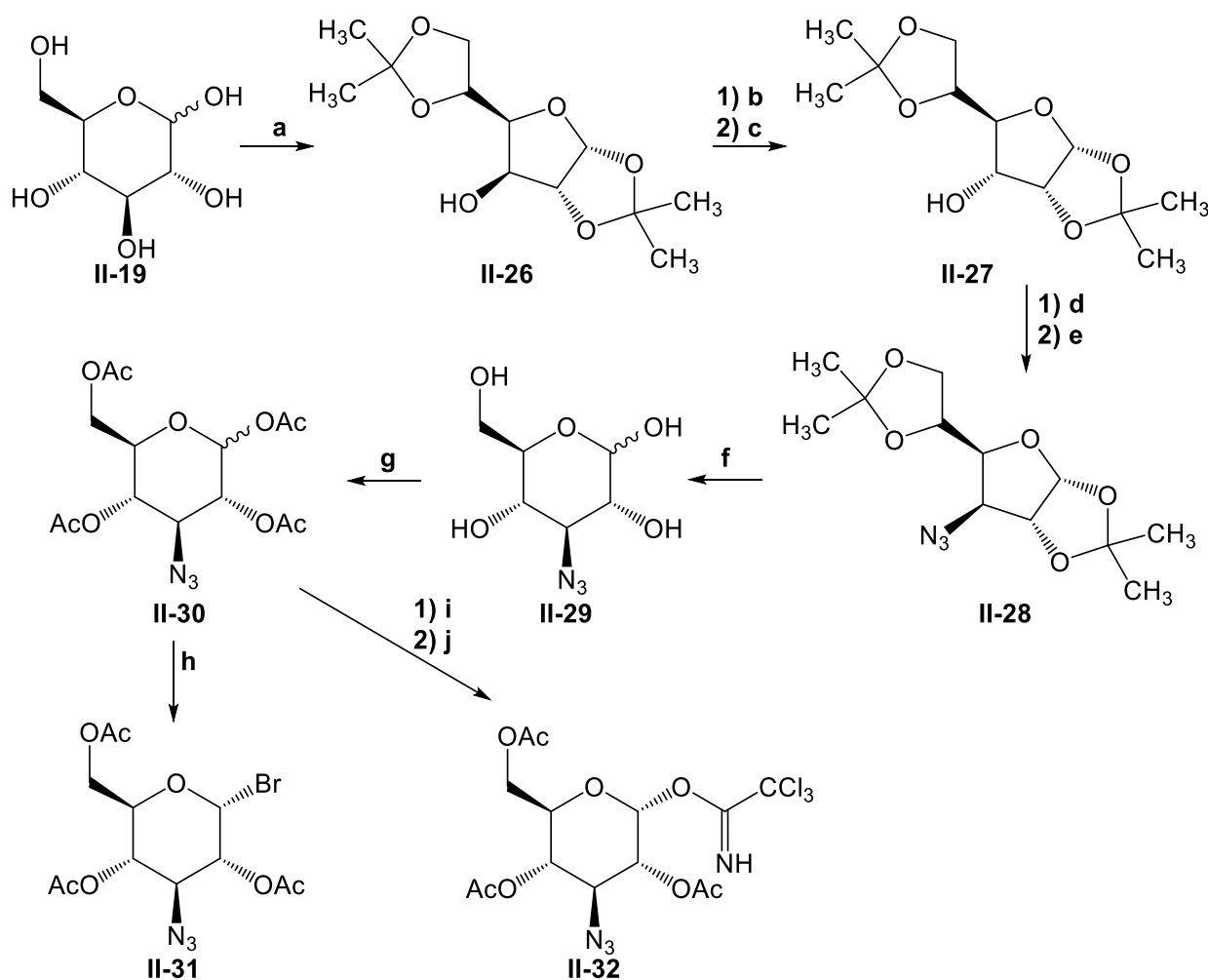
Base	Äquivalente	Lösungsmittel	Temperatur	Umsatz
/	/	Pyridin	RT $\rightarrow$ $80\text{ }^\circ\text{C}$	Kein Produkt
DBU	2	DMF	$80\text{ }^\circ\text{C}$	Kein Produkt
NaH	1.3	DMF	$80\text{ }^\circ\text{C}$	Kein Produkt
NaH	1.3	THF	$0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 65\text{ }^\circ\text{C}$	Kein Produkt
LDA	1.1	THF	$-70\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	Kein Produkt
BuLi	1.1	THF	$-70\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	Kein Produkt
$\text{AlMe}_3$	1.1	Tol	$-70\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	Kein Produkt

Bemerkenswerterweise erwies sich das Triflat in Lösung und bei höheren Temperaturen über 17 h als stabil. Während für das anomere Zentrum die elektronischen Effekte und die damit zusammenhängende Zugänglichkeit für Nukleophile in vielen Studien untersucht wurde, sind diese Einflüsse für die verbleibenden Ringpositionen wenig erforscht. Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts berichteten allerdings mehrere Autoren, dass die C3-Substitution von Sulfonylabgangsgruppen nur mit Ammoniak oder Aziden realisierbar ist.<sup>[237–239]</sup> An einem ähnlich geschützten Galactose-Scaffold, das sich mit einer Methoxygruppe lediglich in der Schutzgruppe des anomeren Zentrums unterscheidet, berichten CAMPO *et al.* jedoch auch bei der Substitution gegen ein Azid mit 33% von einer sehr geringen Ausbeute.<sup>[240]</sup> Folglich sollte das unverbrückte Piperazin anstelle des verbrückten Derivats aufgebaut werden, wie es bereits für Morpholine an der C2-Position bekannt ist.<sup>[228–230]</sup> Geplant war zunächst, das Triflat gegen ein Azid zu substituieren, dieses zur Aminogruppe zu reduzieren und anschließend zum Piperazin zu zyklisieren. In diesem Zuge wurde die Syntheseroute angepasst, da die Einführung des Azids an der C3-Position hinlänglich etabliert ist und somit mehrere Reaktionsschritte eingespart werden konnten (Schema 27).<sup>[241–243]</sup>

Im ersten Schritt wurden die C1-, C2-, C4 und C6-Positionen der D-Glucose (**II-19**) über die säurekatalytische Einführung von zwei Dioxalanringen mit Aceton in 73% Ausbeute geschützt. Auf diese Weise war es möglich die C3-Position in einem Syntheseschritt selektiv zu erschließen.<sup>[241]</sup> Isopropylidendiacetale stellen in der Kohlenhydratchemie wichtige Intermediate dar, die je nach Monosaccharid vielseitig funktionalisiert werden können. Über die Wahl der Abspaltungsbedingungen lässt sich eine Acetalgruppe selektiv entschützen, da die beiden Acetalgruppen unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen.<sup>[244]</sup> Die entsprechende D-Glycofuranose **II-26** wurde über die oben diskutierte selektive Oxidation-Reduktionsreaktion mit DMP und anschließend mit NaBH<sub>4</sub> in die D-Allofuranose **II-27** mit einer guten Ausbeute von 73% über zwei Stufen überführt. Anschließend wurde die Hydroxygruppe der Verbindung **II-27** trifliert und gegen ein Azid unter Inversion des Stereozentrums substituiert. Das Azid **II-28** wurde mit sehr guten 96% Ausbeute über zwei Schritte isoliert.

Darauffolgend wurde das Diacetal **II-28** mit Trifluoessigsäure (TFA) entschützt und die Pyranose **II-29** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin peracetyliert. Für die anstehende Glykosylierung wurden zwei Glykosyldonoren synthetisiert. Zum einen wurde über die Reaktion mit TiBr<sub>4</sub> in DCM/EE (100:1) das Bromid **II-31** mit guten 85% Ausbeute

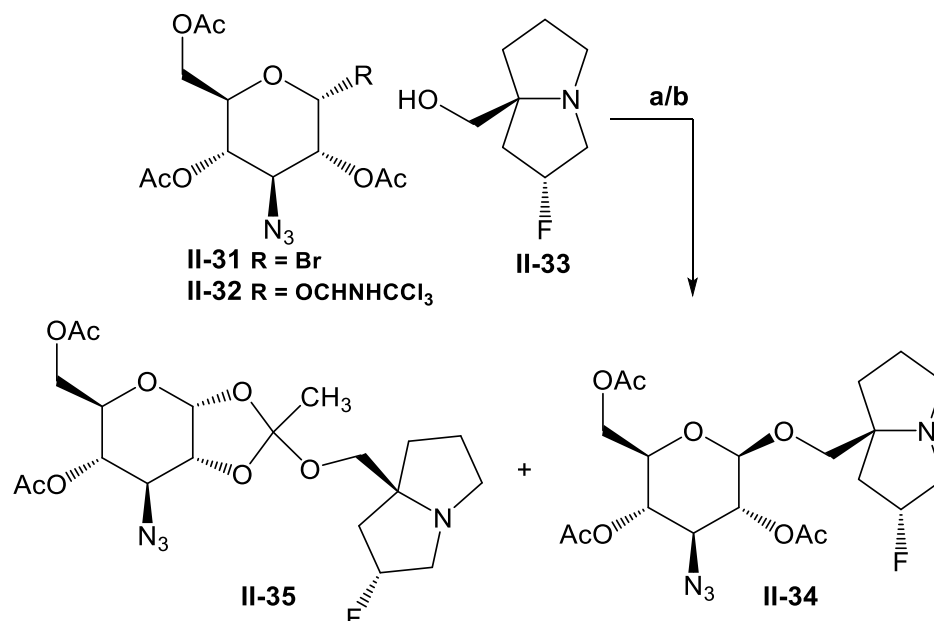
gewonnen. In der Regel werden Glykosylbromide über die Reaktion der acetylgeschützten Kohlenhydrate mit HBr in Essigsäure hergestellt. Enthalten die Saccharide jedoch ein Azid wird neben der anomeren Acetylgruppe auch dieses substituiert. Bei der Verwendung von  $\text{TiBr}_4$  kommt es nicht zu dieser unerwünschten Nebenreaktion und es wird nur das gewünschte Glykosylhalogenid in guten Ausbeuten erhalten.<sup>[245]</sup>



**Scheme 27:** Syntheseroute zu dem Bromid sowie Trichloracetimidat als Glykosyldonoren. a)  $\text{ZnCl}_2, \text{H}_3\text{PO}_4$ , Aceton, RT, 36 h, 73%; b) DMP,  $\text{NaHCO}_3$ , DCM, RT, 17 h; c)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, 0  $\rightarrow$  RT, 17 h, 73% über zwei Schritte; d) Pyridin,  $\text{TiF}_4$ , DCM,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h; e)  $\text{NaN}_3$ , DMF, RT, 17 h, 96%; f) TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 3 h; g)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, RT, 17 h, 93% über zwei Schritte; h)  $\text{TiBr}_4$ , DCM/EE (100:1), RT, 17 h, 85%; i)  $\text{COONH}_4$ , DMF, RT, 4 h; j)  $\text{C}_2\text{Cl}_3\text{N}$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , THF, RT, 17 h, 79% über zwei Schritte.

Des Weiteren wurde aus der peracetylierten Azidoglucose **II-30** das entsprechende Trichloracetimidat **II-32** hergestellt. Zunächst wurde dazu die anomere Acetylgruppe mit einer äquimolaren Mischung aus Ethylendiamin und Essigsäure in THF entfernt.<sup>[246]</sup> Der reduzierende Zucker wurde anschließend mit Trichloracetonitril und DBU zum Glykosyldonor **II-32** mit einer guten Ausbeute von 79% umgesetzt. Aufgrund der elektronenziehenden Eigenschaften sowohl des Bromid- als auch des Trichloracetimidatsubstituenten liegen beide Glykosyldonoren in der  $\alpha$ -Konfiguration vor,

da der anomere Effekt bei elektronenziehenden Substituenten die axiale Position gegenüber der äquatorialen Position thermodynamisch begünstigt.<sup>[247]</sup> Beide Donoren wurden anschließend in der Glykosylierungsreaktion mit dem Pyrrolizidin **II-33** eingesetzt (Schema 28).



**Schema 28:** Orthoester und O-Glykosid als Produkte der Glykosylierung. a) **II-31**, AgOTf, Molsieb, DCM, -20 °C → RT, 17 h, 65%; b) **II-32**, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, Molsieb, DCM, -20 °C → RT, 17 h, 50%.

Das Bromid **II-31** wurde mit Silbertriflat (AgOTf), Molsieb und dem Alkohol **II-33** unter Argonatmosphäre in trockenem DCM bei -20 °C zur Reaktion gebracht. Die gleichen Bedingungen wurden ebenfalls für den Glykosyldonor **II-32** gewählt – mit der Ausnahme, dass BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O statt AgOTf als Promotor eingesetzt wurde. Beide Reaktionskontrollen zeigten einen vollen Umsatz der Glykosyldonoren zu einem klar bevorzugten Produkt mit nur wenigen Nebenprodukten. Über die HPLC/MS-Analyse wurde zudem mit 473.2 g/mol die richtige molekulare Masse des einfach protonierten Hauptprodukts beobachtet. Aus der Auswertung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums ging jedoch hervor, dass nicht das gewünschte *trans*-O-Glykosid **II-34** sondern der Orthoester **II-35** als Hauptprodukt gebildet wurde.

In dem <sup>1</sup>H-Spektrum gibt es drei Charakteristika für die Produkte der acetylgeschützten Orthoester. Während die Methylgruppen der Acetylschutzgruppen eine chemische Verschiebung von ~2.2 ppm aufweisen, ist die Methylgruppe des Orthoesters ins Hochfeld (1.8 ppm) verschoben (Abb. 71). Des Weiteren ist auch das H-1-Signal im Gegensatz zu der α- und β-Stellung verschoben und besitzt eine spezifische Kopplungskonstante. Während die Wasserstoffatome in α-Stellung und der β-Stellung – abhängig von den Substituenten - üblicherweise eine chemische Verschiebung von δ(αH) = 5.5 - 7.0 ppm bzw. δ(βH) = 3.5 - 5.0 ppm besitzen und eine Kopplungskonstante

von  ${}^3J_{1,2} = \sim 3.6$  Hz bzw.  ${}^3J_{1,2} = \sim 9.0$  Hz zeigen, ist eine chemische Verschiebung von  $\delta = \sim 5.8$  ppm mit einer Kopplungskonstante von  ${}^3J_{1,2} = \sim 5.2$  Hz für die Orthoester der *D*-gluco-Reihe spezifisch.<sup>[248]</sup>

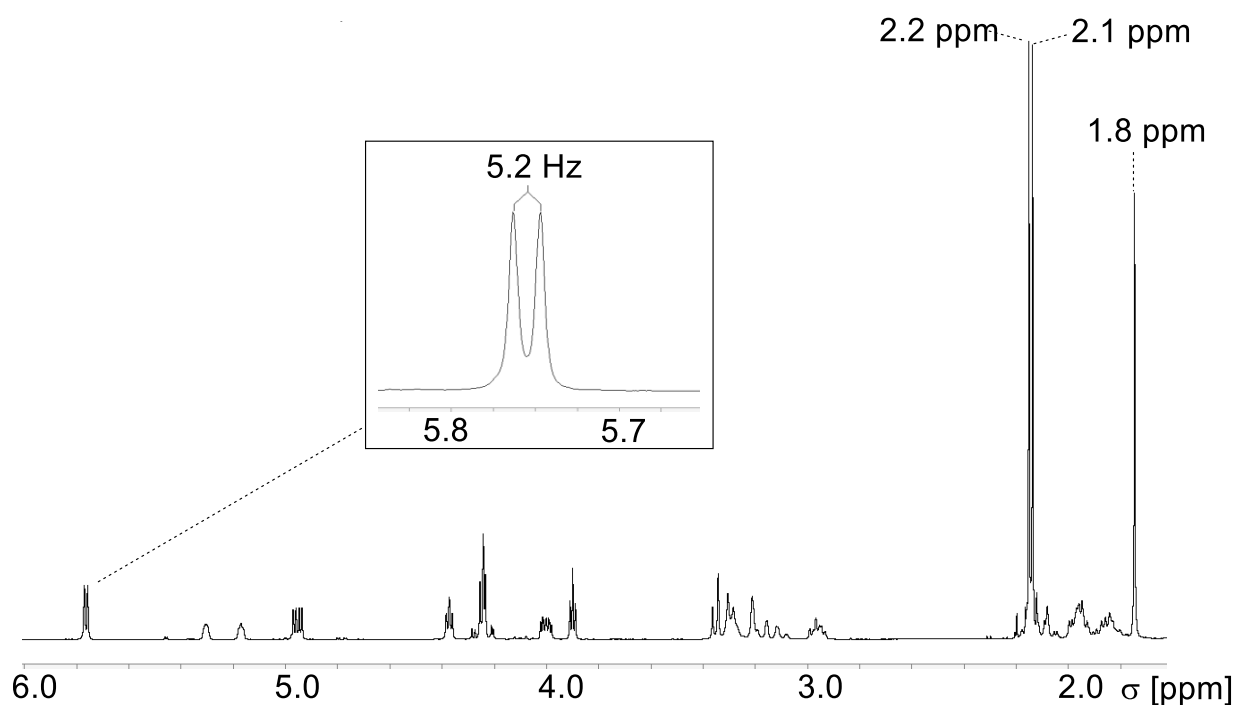
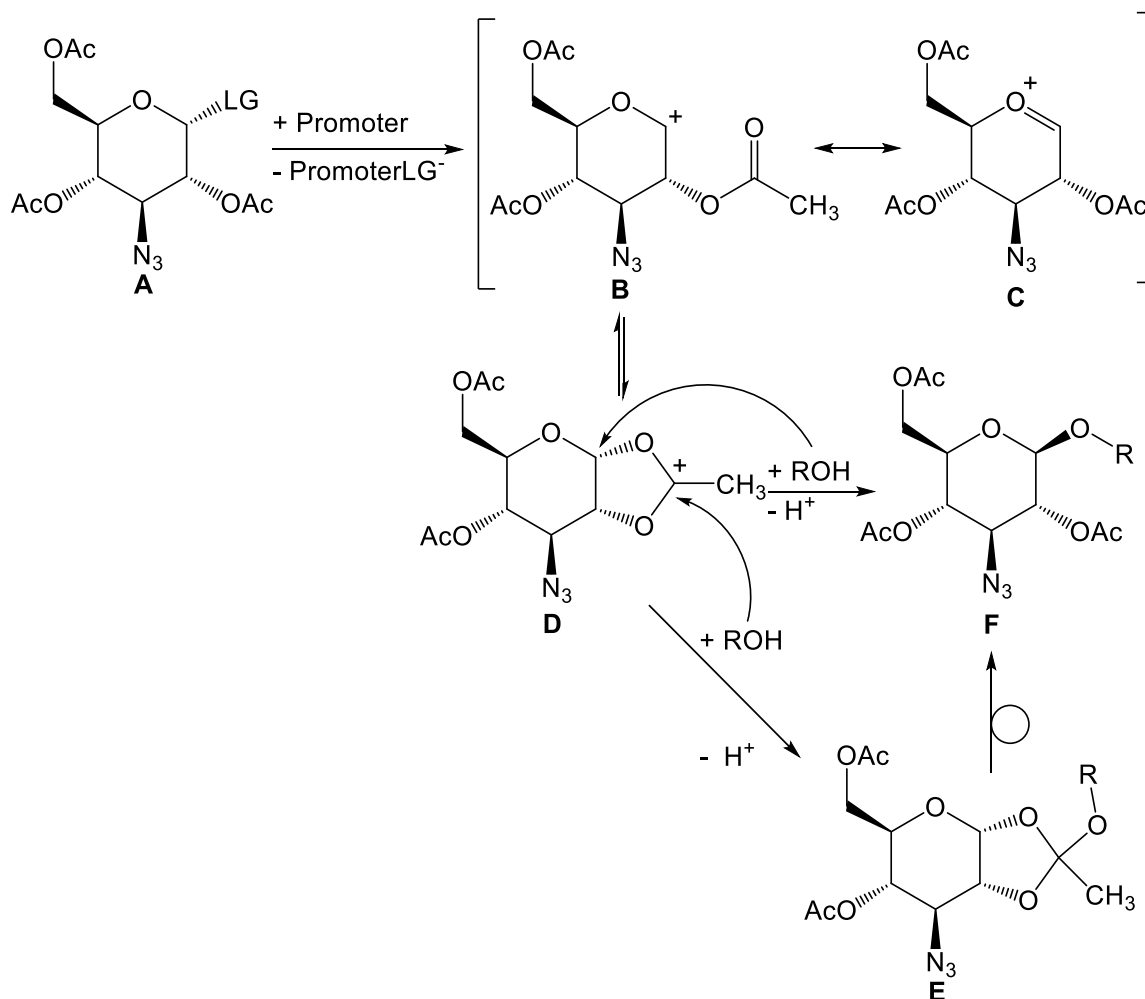


Abb. 71:  ${}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Orthoesters II-35.

Orthoester entstehen bei Glykosylierungsreaktionen nicht nur als unerwünschte Nebenprodukte, sondern nehmen eine zentrale Rolle für die Bildung der gewünschten *trans*-Glykoside ein. Für die Aufklärung der Orthoesterbildung lohnt es sich, den Mechanismus genauer zu betrachten (Schema 29). Zunächst initiiert der Promotor die Abspaltung der Abgangsgruppe (LG). Dies resultiert in einem Oxocarbeniumion **B**, **C**. Durch den anchimeren Effekt der Acetylgruppe an der C2-Position wird ein Dioxalanring ausgebildet. Wird das entstandene Acyloxoniumion **D** nukleophil von dem Alkohol (ROH) an dem Kohlenstoff des Dioxalanrings angegriffen, kommt es zur Ausbildung des Orthoesters **E**. Aus der Umlagerung der Alkoholgruppe folgt anschließend das *trans*-Glykosid **F**. Vor allem unter basischen Bedingungen oder bei dem Einsatz von schwachen Nucleophilen verläuft die Reaktion hauptsächlich über den Orthoester **E**, bei dem in manchen Fällen die Umlagerung gehindert ist.<sup>[249]</sup> In diesen Fällen sind in der Literatur verschiedene Lösungsansätze beschrieben, um Orthoester als Hauptprodukte zu vermeiden.



**Schema 29:** Reaktionsmechanismus der Glykosylierung mit dem Orthoester als Zwischenprodukt.

Häufig reicht bereits die Anpassung der Reaktionsbedingungen für die Bildung des *trans*-Glykosids aus.<sup>[250]</sup> Andere Ansatzpunkte sind die Zugabe von Additiven, die einen nukleophilen Angriff an dem anomeren Zentrum forcieren, oder die Verwendung von Lewis-Säuren, die die Umlagerung der Orthoesters einleiten. Daher wurde im Folgenden ein Screening von etablierten Glykosylierungsbedingungen für das Acetat **II-30**, das Bromid **II-31** und das Trichloracetimidat **II-32** als Abgangsgruppen durchgeführt (Tab. 22). Unter anderem wurde neben Dichlormethan auch Acetonitril als Lösungsmittel verwendet, mehrere Promotoren eingesetzt und die Zugabe zweier Additive untersucht. Die Ergebnisse im Hinblick auf die Bildung des *trans*-Glykosids erwiesen sich jedoch als wenig zufriedenstellend.

Lediglich bei vier der 14 getesteten Bedingungen wurde überhaupt ein Umsatz des Edukts beobachtet. Die Umsetzung des Bromids **II-31** mit AgOTf als Promoter lieferte eine gute Ausbeute von 65% des Orthoesters. In der Literatur ist bekannt, dass Triflate das Oxocarbeniumion stabilisieren (Schema 30).<sup>[251,252]</sup> Durchaus denkbar ist, dass der Alkohol **II-33** als schwaches Nukleophil lediglich das Intermediat **B** angreift und die

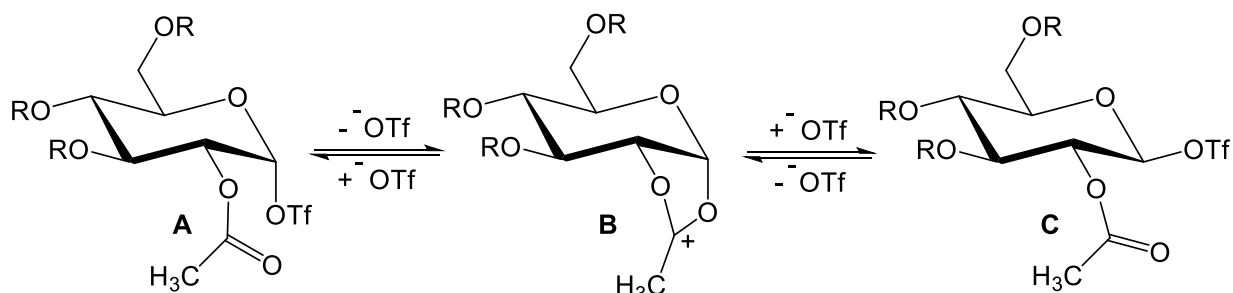
Reaktion auf der Stufe des Orthoesters **II-35** stoppt. Daher wurden mit  $\text{AgCO}_3$  und  $\text{SnCl}_4$  andere Promotoren eingesetzt, die jedoch keine Umsetzung des Bromids **II-31** einleiteten.

**Tab. 22:** Reaktionsbedingungen für die Glykosylierungsreaktion aus Schema 30.

Abgangsgruppe	LM	Promoter	Additiv	Ausbeute
<b>Br</b>	DCM	AgOTf	/	65% <b>II-35</b>
<b>Br</b>	ACN	AgOTf	/	Hydrolyse
<b>Br</b>	DCM	AgOTf	TMU	63% <b>II-35</b>
<b>Br</b>	ACN	AgOTf	TMU	54% <b>II-35</b>
<b>Br</b>	DCM	AgOTf	TFA	Hydrolyse
<b>Br</b>	DCM	$\text{AgCO}_3$	/	Kein Umsatz
<b>Br</b>	ACN	$\text{AgCO}_3$	/	Kein Umsatz
<b>Br</b>	DCM	$\text{SnCl}_4$	/	Kein Umsatz
<b>OCNHCCl<sub>3</sub></b>	DCM	TMSOTf	/	Kein Umsatz
<b>OCNHCCl<sub>3</sub></b>	ACN	TMSOTf	/	Kein Umsatz
<b>OCNHCCl<sub>3</sub></b>	DCM	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	/	50% <b>II-35</b>
<b>OCNHCCl<sub>3</sub></b>	ACN	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	/	Kein Umsatz
<b>OAc</b>	DCM	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	/	Kein Umsatz
<b>OAc</b>	DCM	TMSOTf	/	Kein Umsatz
<b>OAc</b>	DCM	$\text{SnCl}_4$	/	Kein Umsatz

Damit die Entstehung von Orthoestern vermieden wird, werden häufig Additive eingesetzt. So verhindert Tetramethylharnstoff (TMU) die Ausbildung des Nachbargruppeneffekts der Acetylgruppe über die Bindung an dem anomeren Zentrum in  $\alpha$ -Stellung. Folglich ist nur ein nukleophiler Angriff über die  $\beta$ -Stellung möglich.<sup>[253–255]</sup> Doch auch mit TMU als Additiv wurde sowohl in Acetonitril als auch in Dichlormethan der Orthoester **II-35** als Hauptprodukt mit 54% bzw. 63% Ausbeute isoliert. Bemerkenswerterweise verhindert der Einsatz von TMU die Hydrolyse des Bromids **II-31** in Acetonitril mit AgOTf als Promotor. Einen weiteren Ansatz stellt die Einleitung der Umlagerung des Orthoesters durch die nachträgliche Zugabe von Lewis-Säuren wie  $\text{SnCl}_4$ , TMSOTf oder  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  dar.<sup>[256]</sup> Doch auch die Zugabe von  $\text{SnCl}_4$  und TMSOTf nach der Bildung des Orthoesters **II-35** führte nicht zu dem gewünschten Produkt **II-34**. Auf die Verwendung von  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  wurde aufgrund der hohen Toxizität verzichtet. AUZANNEAU *et al.* berichten, dass trockene TFA in katalytischen Mengen (0.1 Äquivalente)

die Bildung des Orthoester als Hauptprodukt verhindert.<sup>[257]</sup> Unter diesen Bedingungen wurde jedoch lediglich die Hydrolyse des Bromids **II-31** beobachtet.

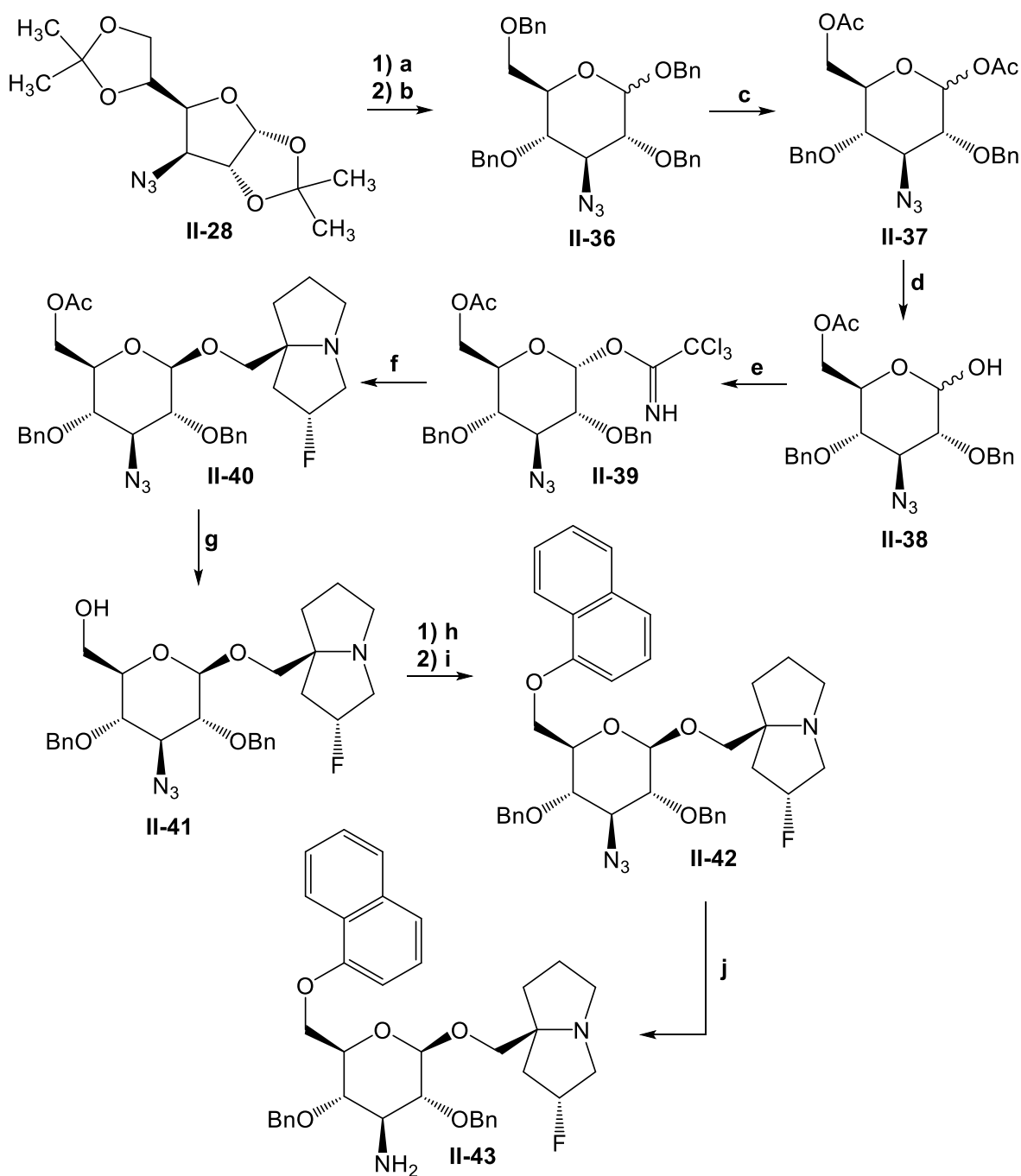


**Schema 30:** Blockierung der  $\beta$ -Stellung durch das Triflat.

Die Umsetzung des Trichloracetimidats **II-32** in Gegenwart von  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  in trockenem Dichlormethan lieferte den Orthoester **II-35** mit 50% Ausbeute. Die Glykosylierung mit den Promotoren  $\text{AgCO}_3$ ,  $\text{SnCl}_4$  oder  $\text{TMSOTf}$  zeigten sowohl bei dem Trichloracetimidat **II-32** als auch bei dem peracetylierten Zucker **II-30** in keinen eingesetzten Lösungsmitteln einen Umsatz. Auch die Erhöhung der Temperatur bis zum Siedepunkt leitete nicht die Umlagerung zum gewünschten *trans*-Produkt **II-34** ein.

In der Literatur wurde beschrieben, dass bei schwachen oder sperrigen Nucleophilen wie Neopentylalkoholen<sup>[258]</sup> oder Indolen<sup>[259]</sup> mit Acetylgruppen in der Nachbarschaft die Reaktion auf der Stufe der Orthoester stoppen und keine weitere Umlagerung erfolgen kann. Die sterisch anspruchsvollen Pivaloylschutzgruppen unterdrücken die Orthoesterbildung. Der Nachteil dieser Gruppen liegt jedoch in der hohen Stabilität und damit einhergehenden Widerstandsfähigkeit gegen etablierte Entschützungsprotokolle.<sup>[260]</sup> Daher wurde für ausgehend von der Azidofuranose **II-28** eine andere Schutzgruppenstrategie gewählt (Schema 31).

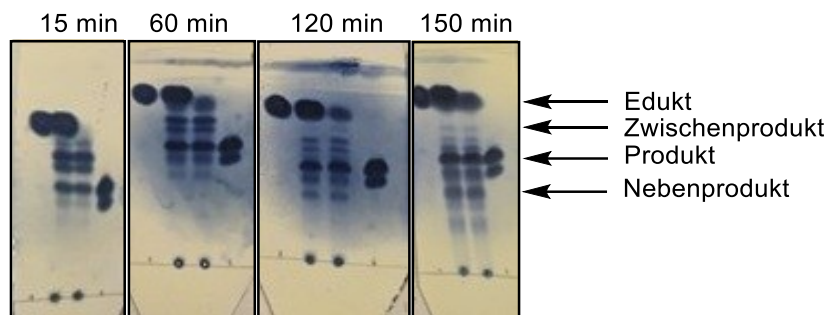
Die Hexose **II-28** wurde zunächst perbenzyliert und anschließend die C1- und C6-Position regioselektiv acetyliert. Über diese Schutzgruppenstrategie ist die Ausbildung des Nachbarschaftsgruppeneffektes nicht möglich. Die Stereoselektivität bei der Glykosylierung wird durch die thermodynamische Kontrolle der Reaktion erreicht.



**Scheme 31:** Synthese des Glykokonjugats **II-43**. a) TFA, H<sub>2</sub>O, RT, 3 h; b) BnBr, NaH, DMF, RT, 17 h, 93% über zwei Schritte; c) Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, -20 °C, 2 h, 59%; d) COONH<sub>4</sub>, DMF, RT, 4 h, 71%; e) C<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>N, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, RT, 17 h; f) **II-31**, AgOTf, Molsieb, DCM, -20 °C → RT, 17 h, 57% über zwei Schritte; g) Na, MeOH, RT, 2 h, 89%; h) Pyridin, Tf<sub>2</sub>O, DCM, -20 °C, 2 h; i) 1-Naphtol, NaH, DMF, RT, 17 h; j) Me<sub>3</sub>P, H<sub>2</sub>O, THF, 50 °C, 2 h, 31% über drei Schritte.

Die Syntheseroute bis zum Glykosyldonor **II-39** erfolgte nach ANJUM *et al.*<sup>[261]</sup> Dafür wurde die Azidofuranose **II-28** mit TFA in Wasser entschützt und anschließend mit Natriumhydrid und Benzylbromid zu der perbenzylierten Pyranose **II-36** in sehr guten 93% Ausbeute umgesetzt. Anschließend wurden die C1- und C6-Benzylgruppen regioselektiv gegen Acetylgruppen substituiert. ANJUM *et al.* gaben eine Lösung aus Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure (50:1) in einer Portion bei Raumtemperatur zu der in Essigsäureanhydrid gelösten Hexose **II-36** und brachen die Reaktion nach 5 min

ab. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch die Bildung vieler Nebenprodukte beobachtet. Daraufhin wurde der perbenzoylierte Zucker **II-36** in Essigsäureanhydrid gelöst und auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der konzentrierten Schwefelsäure gestartet. Unter diesen Bedingungen konnte der Reaktionsverlauf über die Dünnschichtchromatographie detailliert nachvollzogen werden (Abb. 72).



**Abb. 72:** Analyse des Reaktionsverlaufs der regioselektiven Acetylierung mittels Dünnschichtchromatographie.

Das Edukt **II-36** weist als unpolare Verbindung einen hohen  $R_f$  von 0.8 auf. Bereits nach 5 min wurde das Edukt **II-36** vollständig umgesetzt. Nach dieser Zeit macht das einfach acetylierte Zwischenprodukt, das einen  $R_f$  von 0.7 zeigt, den Hauptteil der Reaktionslösung aus. Nach 60 min ist der Anteil an gebildeten Zielprodukt **II-37**, das einen  $R_f$  von 0.5 und aufgrund des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomers zwei Spots auf der Dünnschichtplatte aufweist, deutlich höher. Allerdings zeigt die Kontrolle zu diesem Zeitpunkt nach wie vor einen nicht unwesentlichen Anteil an Zwischenprodukt. Dieser ist nach 120 min fast vollständig umgesetzt worden. Jedoch kam es nach dieser Zeitspanne zu der Bildung eines Nebenprodukts mit einem  $R_f = 0.4$ . Das Nebenprodukt stellt wahrscheinlich eine dreifach acetylierte Hexose dar. Nach 150 min ist der Anteil an Nebenprodukt deutlich erhöht. Es galt also diese thermodynamisch kontrollierte Reaktion bei dem bestmöglichen Verhältnis zwischen Zwischenprodukt/Zielprodukt/Nebenprodukt abubrechen. Die Analyse mittels der Dünnschichtchromatographie ergab, dass dieser Zeitpunkt bei einer Reaktionszeit von 120 min lag. Auf diese Weise wurde eine Ausbeute von 59% erreicht, die auch bei großen Ansätzen von  $\sim 7$  g reproduzierbar war.

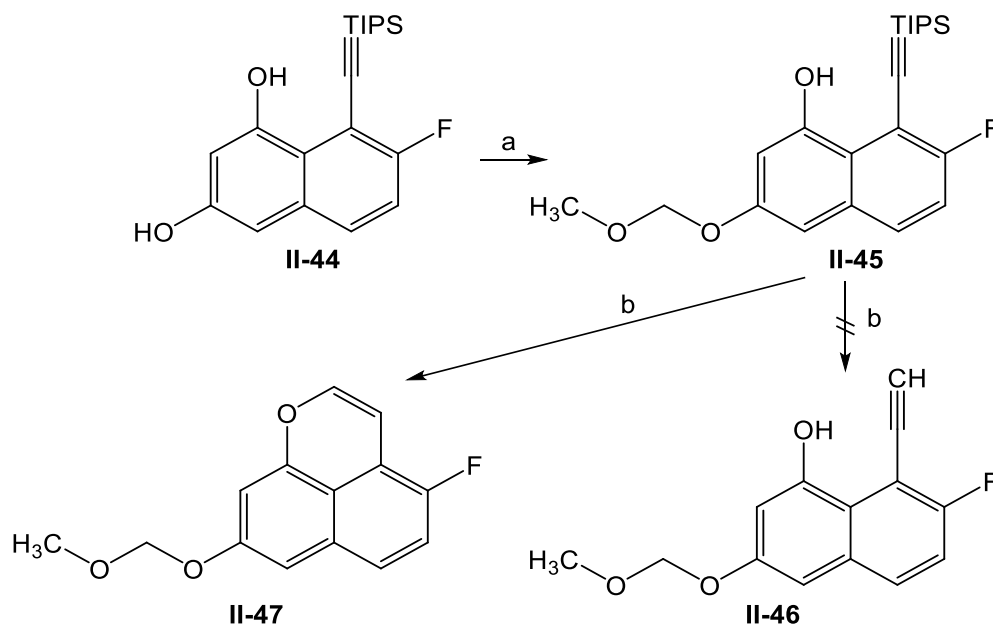
Im Gegensatz zu der anomeren Entschützung des peracetylierten Zuckers **II-30** wurde für die Verbindung **II-37** mit Ammoniumacetat in DMF kein vollständiger Umsatz des Startmaterials beobachtet.<sup>[261]</sup> Dennoch lieferte die Reaktion den reduzierenden Zucker **II-38** in einer Ausbeute von 71%. Die unvollständige Umsetzung kann mit dem sogenannten *armed-disarmed*-Modell erklärt werden.<sup>[262]</sup> Während Acetylgruppen über den -I-Effekt die Elektronendichte aus dem Pyranring herausziehen, erhöhen

Benzylgruppen diese in dem Ring. Daraus resultiert eine erhöhte Elektronendichte an der Carbonylgruppe der anomeren Acetylgruppe, die somit ein schwächeres elektrophil für die Entschützungsreagenzien darstellt.<sup>[263]</sup>

Der reduzierende Zucker **II-38** wurde in das Trichloracetimidat **II-39** überführt. Da Trichloracetimide mit Benzylgruppen in der C2-Position deutlich instabiler als die acetylierten Derivate sind, wurde der Glykosyldonor **II-39** ohne Aufreinigung in der Glykolysierung zum Glykokonjugat **II-40** eingesetzt. Das  $\beta$ -Anomer wurde aus dieser thermodynamisch kontrollierten Reaktion mit einer Ausbeute von 57% über zwei Stufen isoliert. Anschließend wurde die C6-Position über die Zemplen-Methode mit Natriummethanolat entschützt und der Alkohol **II-41** mit einer guten Ausbeute von 89% erhalten.<sup>[264]</sup> Gegenüber der klassischen Verseifung besitzt diese Methode den Vorteil, dass Natriummethanolat nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden muss.

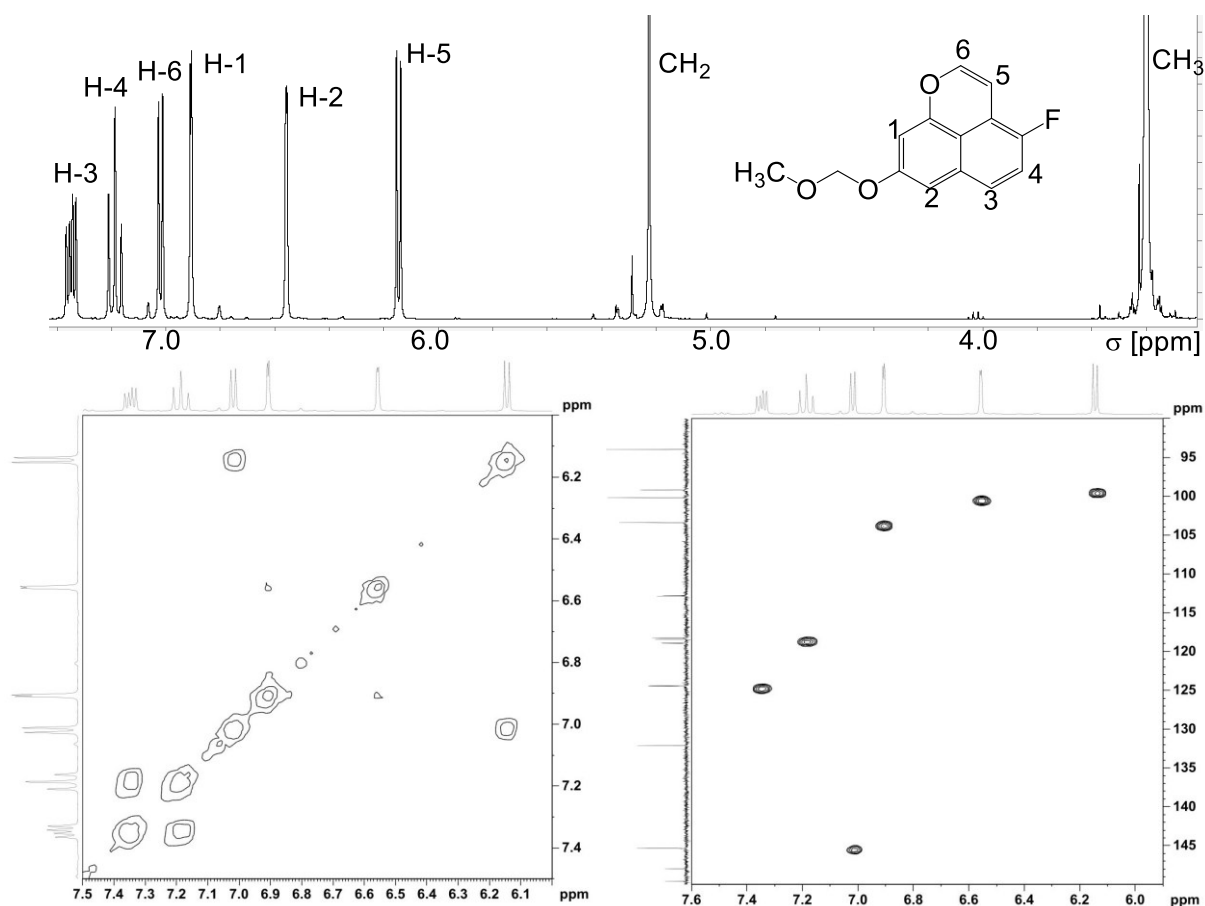
Der Alkohol **II-41** sollte anschließend mit dem Naphthol-Derivat **II-45** verethert werden. Die gängige Art und Weise, die C6-Position zu verethern, ist die Mitsunobu-Reaktion.<sup>[265]</sup> Aufgrund des Einsatzes von Triphenylphosphan ist diese Reaktion jedoch unverträglich mit dem Azid, da Triphenylphosphan Azide zu den entsprechenden Aminen reduziert. Daher wurde der Alkohol **II-41** im ersten Schritt trifliert und anschließend substituiert. Über die Substitution mit dem Alkohol **II-45** wurde keine Umsetzung zu dem gewünschten Produkt beobachtet. Es wurde vermutet, dass die Benzylschutzgruppe der C4-Position und die sperrige TIPS-Schutzgruppe der Dreifachbindung sterisch zu anspruchsvoll sind. Daher wurde der Alkohol **II-41** mit Naphthol zu der Verbindung **II-42** verethert. Das Azid wurde ohne Aufreinigung über die Staudinger-Reduktion mit Trimethylphosphan zu dem Amin **II-43** umgesetzt. Dieses wurde mit einer Ausbeute von 31% über drei Schritte isoliert. Aufgrund der ähnlichen  $R_f$ -Werte des Amins **II-43** und dem Triphenylphosphanoxid als Nebenprodukt wurde Trimethylphosphan eingesetzt. Bedauerlicherweise wurde zum Ende der Promotion die Substanz **II-43** nicht mehr in ausreichenden Mengen erhalten.

Das Naphthol-Derivat **II-45** wurde aus dem Diol **II-44** durch die Umsetzung mit (Chlormethyl)methylether (MOM-Cl) und DIPEA in 70% Ausbeute erhalten (Schema 32).<sup>[266]</sup> Anschließend wurde das geschützte Derivat **II-45** mit Kaliumfluorid umgesetzt.



**Schema 32:** Selektive Schützung des Diols **II-44**. a) MOM-Cl, DIPEA, DCM, RT, 10 min, 70%. b) KF, DMF, RT, 17 h, 72%.

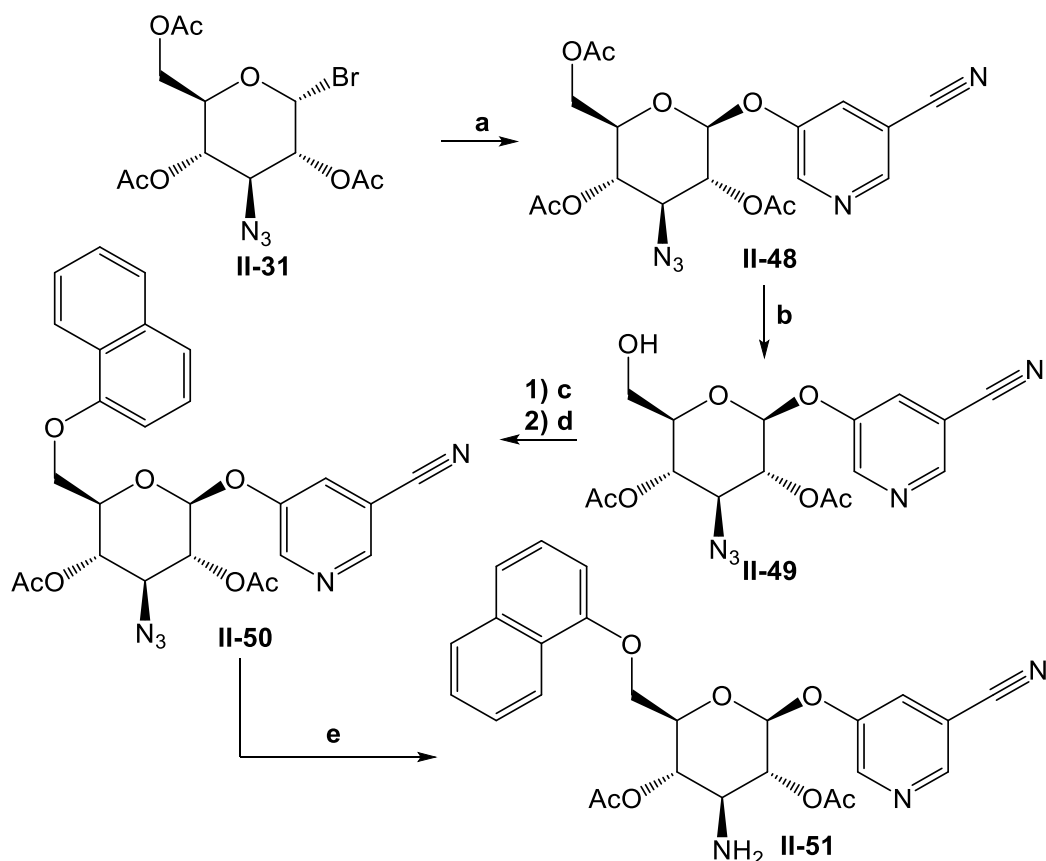
Die NMR-Analyse belegte jedoch die Bildung des Trizyklus **II-47** anstelle des gewünschten Alkins **II-46** (Abb. 73). Statt des erwarteten Singulett der Hydroxygruppe, das keine Kopplung in dem HSQC-Spektrum aufweist, zeigen alle Signale eine  $^1J$ -Kopplung innerhalb des HSQC-Spektrums. Ein weiterer Beleg für die Bildung von der Verbindung **II-47** ist die  $^3J_{5,6}$ -Kopplung zwischen dem H-5 und dem H-6 im COSY-Spektrum. Diese tritt im COSY-Spektrum der Alkohols **II-46** zwischen der CH- und OH-Gruppe nicht auf. Auch die Umsetzung des TIPS-geschützten Alkins **II-45** mit TBAF lieferte das trizyklische Produkt **II-47**. Die katalysierte Zyklisierung zwischen einer Hydroxygruppe und einem Alkin ist in der Literatur ausgiebig beschrieben. Allerdings läuft diese vorwiegend mit Metallkatalysatoren bei hohen Temperaturen ab.<sup>[267,268]</sup>



**Abb. 73:**  $^1\text{H}$ -, COSY- und HSQC-Spektrum der Verbindung **II-46**.

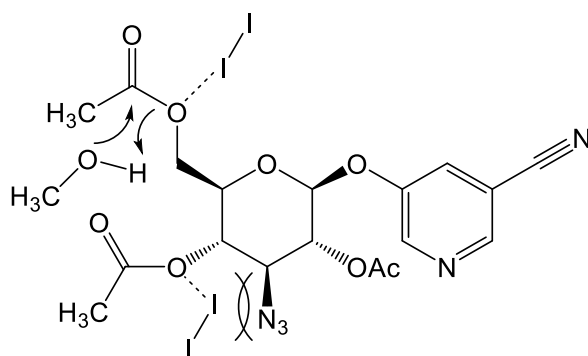
Der Glykosyldonor **II-31** wurde bei der Synthese der zweiten Hybrids substanz mit 5-Cyano-3-hydroxypyridine zum Glykosid **II-48** umgesetzt. Im Gegensatz zur Umsetzung mit dem Alkohol **II-33** blieb die Reaktion nicht auf der Stufe des Orthoesters stehen, sondern lieferte im weiteren Verlauf das 1,2-*trans*-Produkt **II-48** in 57% Ausbeute.

Für die Einführung des zweiten MRTX-Substituenten sollte die C6-Position entschützt werden. Die Zemplen-Methode hätte eine Entschützung aller Acetylgruppen zur Folge. Zwar ist die selektive C6-Adressierung bei ungeschützten Hexosen möglich,<sup>[269]</sup> die Möglichkeit für Nebenreaktion besteht allerdings dennoch. REN *et al.* berichten von einer iodbasierten C6-Entschützung bei einer Reihe von Nukleosiden und Hexosen.<sup>[270]</sup>



**Schema 33:** Synthese des Amins **II-51**. a) 5-Cyano-3-hydroxypyridine, AgOTf, Molsieb, DCM,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  RT, 17 h, 57%; b)  $\text{I}_2$ , MeOH,  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 17 h, 77%; c) Pyridin, TsCl, DCM,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 h; d) 1-Naphtol, NaH, DMF, RT, 17 h, 19% über zwei Schritte; e)  $\text{Me}_3\text{P}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , THF,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 h, 82%.

Diese basiert auf einer Iodspezies, die aufgrund des sterischen Anspruchs von Iod ausschließlich an der C6-Position ausgebildet werden kann (Abb. 74). Über diese Methode wurde der Alkohol **II-49** in einer Ausbeute von 77% isoliert.



**Abb. 74:** Schematische Darstellung der iodinduzierten C6-selektiven Deacetylierung.

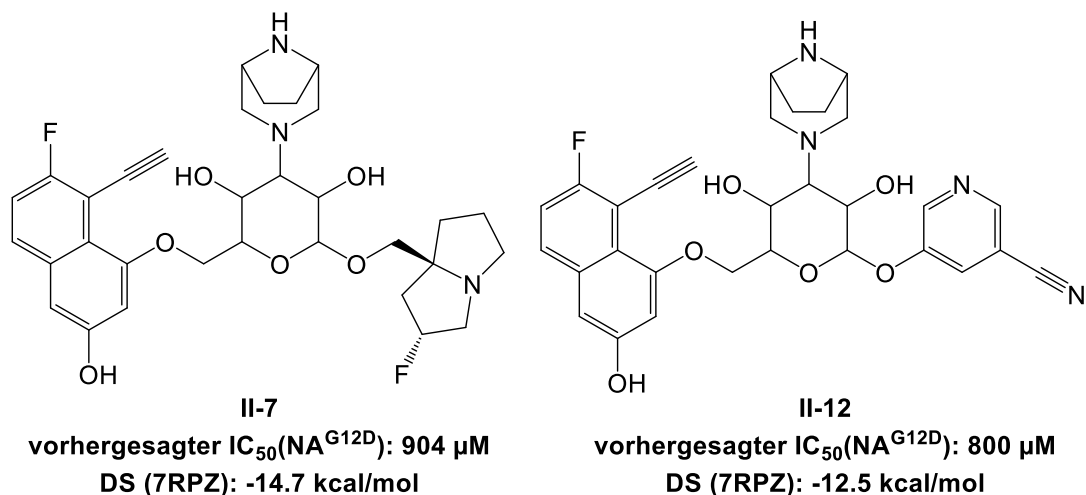
Im Folgenden wurde nach der Tosylierung auch bei dem Alkohol **II-49** keine Substitution gegen den Alkohol **II-45** beobachtet. Alternativ wurde auch bei dem zweiten Zuckerhybrid der Naphthol-Substituent an der C6-Position mit einer geringen Ausbeute von 19% über zwei Schritte eingeführt. Über die Staudinger-Reduktion wurde das Azid **II-50** anschließend mit Trimethylphosphan in das entsprechende Amin **II-51** in 82% Ausbeute überführt. Ebenso wie zuvor schon bei der Verbindung **II-43** mussten auch die Arbeiten

zu dem Amin **II-51** aus zeitlichen Gründen aufgrund des Endes der Promotion eingestellt werden.

### 8. Zusammenfassung und Ausblick

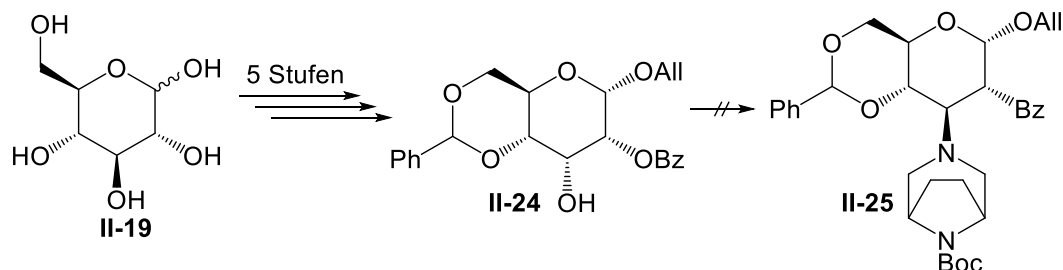
Im zweiten Projekt dieser Dissertation wurde mit Hilfe verschiedener *in silico*-Techniken nach äquivalenten Scaffolds für die Benchmark-Verbindung MRTX1133 (**I-19**) gesucht. Zunächst wurde aus dem Hexose-Scaffold und einer gefilterten Auswahl von 1485 Bromiden aus der ChEMBL-Datenbank eine *in silico*-Bibliothek von 2205225 einzigartigen trisubstituierten Kohlenhydraten konstruiert. Der Vergleich der klassischen ADME-Parameter (molekulare Masse, Anzahl der rotierbaren Bindungen, Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren und Akzeptoren, Anzahl der Ringsysteme, SLogP und PMI) der erstellten Bibliothek mit der hauseigenen LDC/ChEMBL-, der Drugbank-Datenbank sowie zwei kommerziellen K-Ras-Inhibitor-Bibliotheken zeigte, dass die Zuckerbibliothek wesentlich von den etablierten ADME-Parametern, insbesondere den RO5, abweicht. Dagegen erfüllt ein Großteil der Verbindungen (92%) die für Protein-Protein-Wechselwirkungsinhibitoren aufgestellten RO4. Unter dem Aspekt, dass es sich bei der Zucker-Bibliothek um grundlegend neue und modular variable Scaffolds handelt, wurde diese als geeigneter Ausgangspunkt für die Suche nach neuen K-Ras-Inhibitoren angesehen.

Daher wurden im weiteren Verlauf der Arbeiten die IC<sub>50</sub>-Werte des NA<sup>G12D</sup>-Assays mit dem QSAR-Modell von B. NAVA HÖER für die erstellte Bibliothek vorhergesagt. In der Analyse fielen die Verbindungen **II-7** und **II-12** mit IC<sub>50</sub>-Werten von 800 µM bzw 904 µM auf. Aufgrund der fehlenden Stereoisomerie des QSAR-Modells wurde die vielversprechendste Konfiguration des Scaffolds über den Ligand Docking Ansatz bestimmt. Die Analyse des MRTX-Hybrids **II-7** zeigte, dass die *gluco*-Konfiguration der Verbindung mit einem DS von -14.7 kcal/mol das günstigste Ergebnis der 32 möglichen Monosaccharide lieferte. Der DS des zweiten Derivats **II-12** lag mit -12.8 kcal/mol ebenfalls in einem sehr vielversprechenden Bereich, sodass die beide Verbindungen für die Synthese ausgewählt wurden.



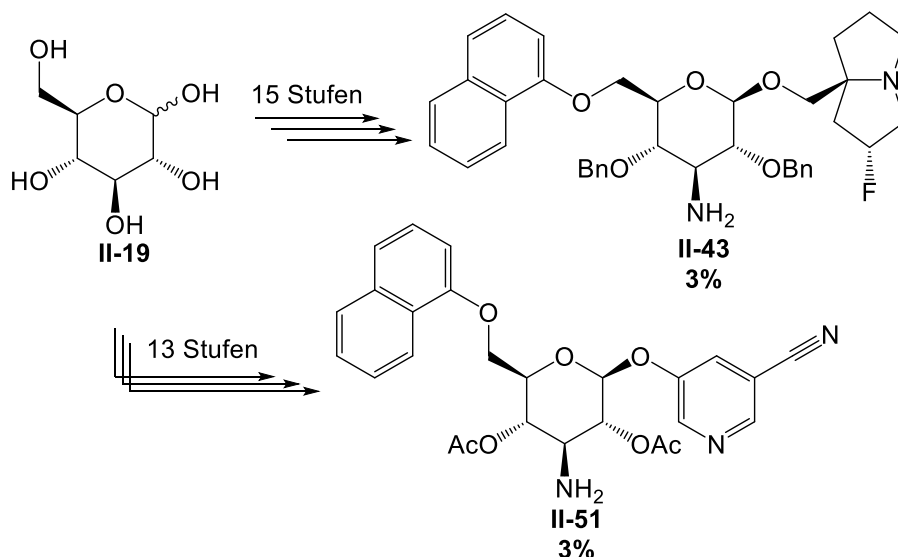
**Abb. 75:** *In silico*-Ergebnisse der  $IC_{50}(NA^{G12D})$  Vorhersage und der Docking Analyse

In der ersten Syntheseroute wurde ausgehend von D-Glucose das orthogonal geschützte Allosederivat **II-24** über fünf Stufen mit einer Ausbeute von 22% gewonnen. Allerdings konnte auch über die Aktivierung des sekundären Amins der verbrückte Piperazinring an der C3-Position nicht eingeführt werden (Schema 34).



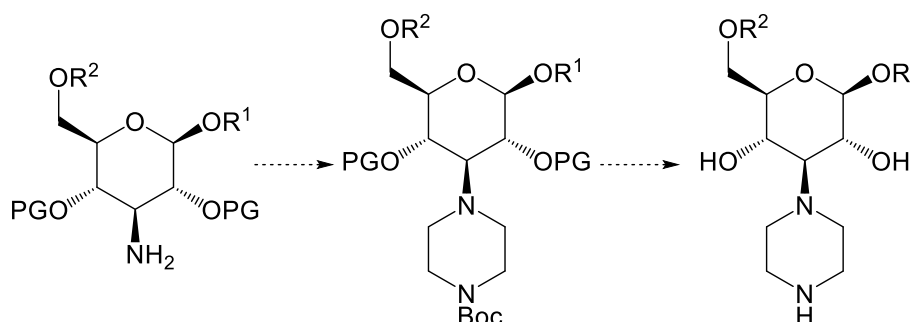
**Schema 34:** Syntheseroute zu dem orthogonal geschützten Glycosederivat **II-24**.

In der zweiten Syntheseroute wurde ausgehend von D-Glucose zunächst eine Azidgruppe an der C3-Position eingeführt. Über eine Glykosylierungsreaktion sollten wurden im weiteren Verlauf der Pyrrolizidin- und der Pyridin-Substituent an der anomeren Position stereoselektiv eingeführt. Bei der Einführung des Neopentylalkohols war die Schutzgruppenstrategie von entscheidender Bedeutung. Während eine Acetylschutzgruppe an der C2-Position ausschließlich den Orthoester lieferte, wurde mit der Benzylschutzgruppe das O-Glykosid erhalten. Durch die selektive C6-Entschützung und die darauffolgende Veretherung wurden die beiden zweifach substituierten Glucosederivate **II-43** und **II-51** mit je 3% über 15 bzw. 13 Stufen erhalten (Schema 35).



**Schema 35:** Syntheseroute zu den trifunktionalisierten Glucosederivaten **II-43** und **II-51**.

Auf diese Weise wurde ein grundlegender Syntheseweg für die Einführung von zwei der drei Substituenten an dem Glucosescaffold. Abhängig von den jeweils einzuführenden Substituenten kann die Schutzgruppenstrategie (Benzyl- oder Acetylschutzgruppen) des modular aufgebauten Scaffolds angepasst werden. Im weiteren Verlauf kann das zyklische Amin über eine Zyklisierungsreaktionen an der Aminogruppe aufgebaut werden. Piperazine werden im Allgemeinen aus Stickstofflöstern gewonnen. Des Weiteren ist die Zyklisierung zu anderen Heterozyklen wie Pyrrolidin, Morpholin oder Thiazin möglich. Im letzten Schritt müssen dann die noch vorhandenen Schutzgruppen entfernt werden (Schema 36).



**Schema 36:** Die restlichen Synthesestufen zu den Zielverbindungen.

## 9. Experimenteller Teil

### 9.1 Allgemeiner Angaben zu Materialien und Methoden

Sofern nicht anders erwähnt wurden die Reaktionen unter atmosphärischen Bedingungen durchgeführt. Feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindliche Reaktionen wurden unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Glasgeräte wurden davor im Trockenschrank getrocknet und nach dem Aufbau unter Vakuum ausgeheizt.

#### Lösungsmittel und Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Alfa Aesar, BLD, Chempur, Enamine, Fisher Scientific, Fluorochem, Merck, Sigma-Aldrich, TCI, Thermo Scientific oder VWR bezogen und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Für die Synthesen, Extraktionen und säulenchromatographischen Aufreinigungen wurden die trockenen Lösungsmittel direkt erworben, oder die technischen Lösungsmittel wurden nach üblichen Methoden gereinigt und getrocknet. Für metallkatalysierte Kupplungen wurden die Lösungsmittel mind. 5 min mit Helium entgast. Wässrige Lösungen wurden mit einer Lyophille der Marke Zirbus (GOT 2000) gefriergetrocknet. Mikrowellenreaktionen wurden mit einem Mikrowellenreaktor der Marke CEM Discover System durchgeführt.

#### Dünnschichtchromatographie

Reaktionsfortschritte und Fraktionen der Säulenchromatographie wurden per Dünnschichtchromatographie überprüft. Dazu wurden Aluminium basierte Platten der Firma ALUGRAM (SIL G/UV254) verwendet. Die Substanzen wurden entweder über Fluoreszenz ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) oder durch Anfärbung detektiert. Die Platten wurden dazu in die Farblösung getaucht und anschließend erhitzt ( $\sim 300 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Kaliumpermanganat-Lösung (3.0 g  $\text{K}_2\text{MnO}_4$ , 20 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 5 mL 5%ige NaOH, 300 mL Wasser)

Cer-Molybdatphosphorsäure-Lösung (5.0 g Molybdatphosphorsäure, 200 mL Wasser, 16 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2.0 g  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ )

Ninhydrin-Lösung (1.5 g Ninhydrin, 100 mL *n*-BuOH, 3.0 mL AcOH)

#### Säulenchromatographische Aufreinigungen

Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte an Kieselgel der Firma Macherey-Nagel (0.04 - 0.063 mm) oder mit einem puriFlash® XS 420 der Marke Interchim unter Verwendung von vorgepackten Kieselgelkartuschen (PF-15SIHP) jeweils mit destillierten

Lösungsmitteln. Für reverse Phase Chromatographie wurde das Gerät puriFlash® 4250 von Interchim mit deren Kartuschen des Typs PF-15C18AQ oder eine präperative HPLC-Säule von Macherey-Nagel des Typs SP 250/21 NUCLEODUR 100-5 C 18 ec verwendet. Die verwendeten Lösungsmittel besaßen HPLC-Qualität.

### HPLC/MS-Messungen

Für die Aufnahme der HPLC/MS-Spektren kamen ein Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus gekoppelt mit einer Shimadzu LCMS-2020 (Methode 1) sowie ein Agilent 1100 Serie gekoppelt einem Bruker micrOTOF-Spektrometer (Methode 2) zum Einsatz. Durch interne Standards wurde die Retentionszeit eingestellt. Für die Methode 1 kamen folgende Säulen zum Einsatz: Restek Raptor ARC-18(1.8 µm, 90 Å, 50x2.1 mm); Macherey-Nagel EC NUCLEODUR C18 Gravity-SB (1.8 µm, 110 Å, 50x2 mm). Methode 2 beinhaltet die Säule: MZ Analysetechnik PerfectSil Target ODS-3 HD (5 µm, 100 Å, 100x4.6 mm). Die Reinheit der Produkte wurde aus den HPLC-Spektren abgeleitet und beträgt, sofern nicht anders vermerkt, ≥99%.

**Methode 1:** Temp.: 40°C, Flow: 0.4 mL/min, Inj. Vol.: 10 µL, Solvent A: H<sub>2</sub>O+FA = 1000/1, Solvent B: MeCN+FA, Program: 95/5 to 5/95 over 13 min, 5/95 to 95/5 over 1 min, 95/5 over 2 min.

**Methode 2:** Temp.: RT, Flow: 1.5 mL/min, Inj. Vol.: 5 µL, Solvent A: Aq. NH<sub>4</sub>OAc (5.0 mM), Solvent B: MeCN, Program: 90/10 to 5/95 over 14 min, 5/95 over 10 min, 5/95 to 90/10 over 2 min, 90/10 over 4 min.

### NMR-Spektroskopie

Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C Spektren der Substanzen wurden bei 298 K mit folgenden Geräten aufgenommen:

Bruker Avance - 400	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz)	<sup>13</sup> C NMR (100 MHz)
Bruker Avance III - 600	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz)	<sup>13</sup> C NMR (150 MHz)

Chemische Verschiebungen wurden auf das Proton oder den Kohlenstoff des verwendeten Lösungsmittels referenziert:

CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H 7.26 ppm (s)	<sup>13</sup> C 77.2 ppm (t)
MeOD-d <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H 3.31 ppm (quint)	<sup>13</sup> C 49.0 ppm (sept)
DMSO-d <sub>6</sub>	<sup>1</sup> H 2.51 ppm (quint)	<sup>13</sup> C 39.5 ppm (sept)
Aceton-d <sub>6</sub>	<sup>1</sup> H 2.05 ppm (s)	<sup>13</sup> C 29.8 ppm (s)
MeCN-d <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H 1.94 ppm (s)	<sup>13</sup> C 1.32 ppm (s)

Die Daten entsprechen dem folgenden Format: chem. Versch. ( $\delta$ ) (Multiplizität: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppel Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, sept = Septett, m = Multipllett; Kopplungskonstante in Hertz (Hz), Integral, Zuordnung). Die Zählweise der Kohlenstoffe ist dabei nicht nach IUPAC, sondern willkürlich gewählt worden.

### Massenspektrometrie

Für die Ermittlung der massenspektroskopischen Daten wurde ein Gerät der Firma Bruker (microTOF) verwendet und über ESI oder APCI ionisiert.

### Infrarot (IR) Spektroskopie

IR-Spektren wurden mit einem Gerät der Marke Bruker Alpha FT-IR-Spektrometer aufgenommen. Dabei wurden Öle als dünner Film vermessen, während Feststoffe mit einem Diamantstempel gepresst wurden.

### *In silico*-Berechnungen

Die computerchemischen Berechnungen wurden mit folgender Hardware durchgeführt:

a) Intel® Core™ i9-7960X CPU @2.80 GHz, 64.0 GB RAM, NVIDIA GeForce GT 1030, Windows 10 or

b) Intel® Core™ i9-7960X CPU @2.80 GHz, 62.5 GB RAM, NVIDIA GeForce GTX 1080, Ubuntu 16.04.5 LTS.

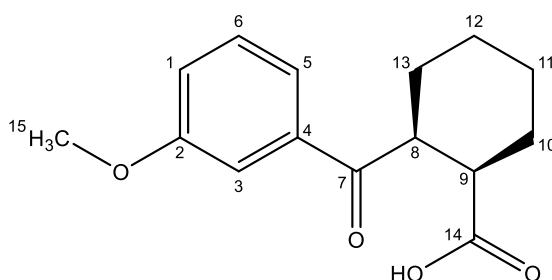
Als Software wurden KNIME (Version 5.3.2) sowie Schrödinger Maestro suite version 11.5.022, release 2018-1 verwendet.

## 9.2 Synthesevorschriften

### 9.2.1 Projekt A: Synthese (hetero-)zyklen-basierter Inhibitoren

#### 9.2.1.1 Aliphatische Pyridazinontetrazole

#### *cis*-2-(3-Methoxybenzoyl)cyclohexan-1-carbonsäure (I-40, KKS-013)<sup>[125]</sup>



3-Bromanisol (3.40 mL, 26.7 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem THF (70.0 mL) gelöst und bei -90 °C mit 1.9 M Butyllithium in Cyclohexan (17.0 mL, 32.2 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 2 h bei -90 °C gerührt, danach unter Ar-Atmosphäre langsam zu einer Lösung von 1,2-Cyclohexandicarbonsäureanhydrid (5.05 g, 32.8 mmol) in trockenem THF (70 mL) getropft und 2 h bei gleicher Temperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam auf RT erwärmt und mit Ethylacetat verdünnt. Die org. Phase wurde nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 30 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C18 (Wasser/Acetonitril, 9:1 → 1:9) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (3.55 g, 13.5 mmol, 51 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 10.30 (s, 1H, COOH), 7.46-7.31 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 7.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,6</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-1), 5.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>2,1</sub> = 1.6 Hz, 1H, H-2), 3.93-3.78 (m, 4H, H-8, H-15), 2.78-2.65 (m, 1H, H-9), 1.86-1.71 (m, 8H, H-11, H-11, H-12, H-13) ppm;

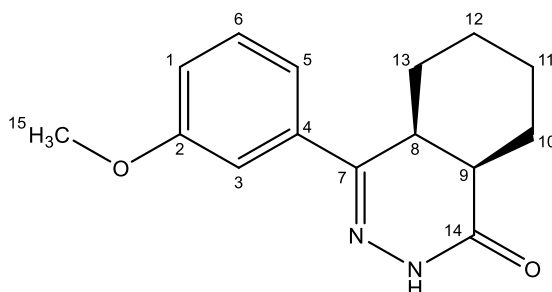
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 202.1 (C-7), 180.4 (C-14), 160.1 (C-2), 137.8 (C-4) (C-14), 119.3 (C-1), 129.5 (C-3), 120.7 (C-5), 114.6 (C-1), 112.7 (C-6), 55.6 (C-8), 56.0 (C-16), 44.2 (C-15), 42.6 (C-9), 27.7, 25.1, 24.4, 22.5 (C-11, C-11, C-12, C-13) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 7.334 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 263.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** m/z = 285.1095 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. m/z = 285.1097 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):** ν̄ = 2931, 2856, 1698, 1258, 1169, 739 cm<sup>-1</sup>.

**cis-4-(3-Methoxyphenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-(2H)-on (I-39, KKS-014)**<sup>[125]</sup>



**KKS-013 (I-40,** 2.32 g, 8.87 mmol) wurde in Ethanol (50.0 mL) gelöst und mit Hydrazin Monohydrat (1.43 mL, 29.3 mmol) versetzt. Nach 12 h bei Reflux wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an

Kieselgel (Cyclohexan/Aceton, 8:2) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (2.11 g, 8.18 mmol, 92 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.18 (s, 1H, NH), 7.39-7.25 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 7.00-6.94 (m, 1H, H-1), 3.85 (s, 3H, H-15), 3.15-3.09 (m, 1H, H-8), 2.87-2.51 (m, 2H, H-9, H-10'), 1.86-1.71 (m, 7H, H-10, H-11, H-12, H-13) ppm;

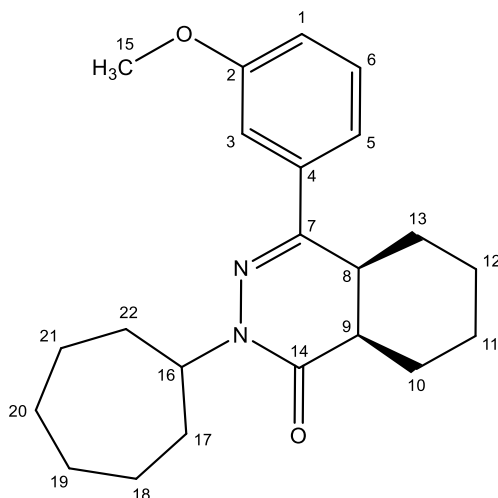
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.8 (C-14), 159.9 (C-2), 154.3 (C-7), 135.8 (C-4), 129.7 (C-3), 118.1 (C-5), 115.8 (C-1), 111.2 (C-6), 55.3 (C-15), 36.3 (C-9), 36.0 (C-8), 25.4, 24.3, 23.3, 21.9 (C-11, C-11, C-12, C-13) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 7.351 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 259.17 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** m/z = 281.1255 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. m/z = 281.1260 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3197, 2928, 2851, 1668, 1610, 777 cm<sup>-1</sup>.

**cis-2-Cycloheptyl-4-(3-methoxyphenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-(2H)-on (I-48, KKS-015)**<sup>[125]</sup>



**KKS-014 (I-39, 232 mg, 898 μmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1.50 mL) gelöst und bei RT mit Natriumhydrid (105 mg, 262 μmol) versetzt. Nach 2 h wurde Cycloheptylbromid (248 μL, 179 μmol) zugegeben und weitere 17 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1 → 1:1) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (163 mg, 460 μmol, 51 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.43-7.40 (m, 1H, *H*-6), 7.40-7.31 (m, 2H, *H*-3, *H*-5), 6.98-6.91 (m, 1H, *H*-1), 4.93-4.77 (m, 1H, *H*-16), 3.88 (s, 3H, *H*-15), 3.17-2.95 (m, 1H, *H*-8.), 2.71-2.51 (m, 2H, *H*-9, *H*-10'), 2.10-1.77 (m, 19H, *H*-10, *H*-11, *H*-12, *H*-13, *H*<sub>heptyl</sub>) ppm;

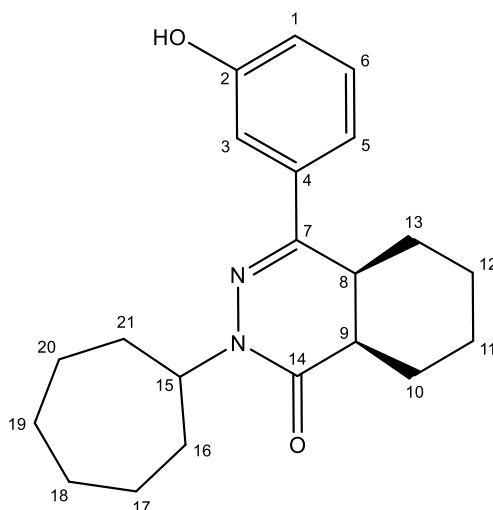
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.0 (C-14), 159.8 (C-2), 152.4 (C-7), 136.7 (C-4), 129.5 (C-3), 118.3 (C-5), 114.6 (C-1), 111.4 (C-6), 56.0 (C-16), 55.3 (C-15), 36.8 (C-9), 35.7 (C-8), 33.2, 33.0, 28.5, 28.4, 25.7, 25.0, 24.9, 24.3, 24.0, 22.0 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 11.699 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 355.15 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 377.2201 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 377.2199 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2924, 2853, 1286, 1041, 694 cm<sup>-1</sup>.

***cis*-2-Cycloheptyl-4-(3-methoxyphenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-(2*H*)-on (I-35, KKS-018)<sup>[125]</sup>**



**KKS-015 (I-48,** 98.7 mg, 281 μmol) wurde in DCM (2 mL) gelöst und bei RT mit 1 M Bromtribromid in DCM (500 μl, 500 μmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 17 h bei RT gerührt und danach mit Ethylacetat verdünnt. Die org. Phase wurde nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1 → 1:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (85.2 mg, 251 μmol, 90 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.38-7.32 (m, 3H, *H*-1, *H*-5, *H*-6), 7.30-7.26 (m, 1H, *H*-3), 6.98-6.91 (m, 1H, *H*-1), 4.89-4.78 (m, 1H, *H*-16), 3.09-3.00 (m, 1H, *H*-8), 2.73-2.53 (m, 2H, *H*-9, *H*-10'), 2.08-1.26 (m, 19H, *H*-10, *H*-11, *H*-12, *H*-13, *H*<sub>heptyl</sub>) ppm;

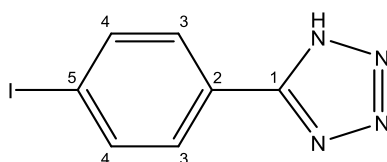
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.4 (C-14), 156.1 (C-2), 152.8 (C-7), 136.8 (C-4), 129.7 (C-3), 118.1 (C-5), 116.6 (C-1), 112.8 (C-6), 56.3 (C-15), 36.7 (C-9), 35.6 (C-8), 33.2, 32.9, 28.3, 28.2, 25.6, 25.0, 24.9, 24.3, 24.0, 22.0 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 10.024 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 341.10 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 363.2040 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 363.2043 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3312, 2924, 2851, 1635, 1327, 614 cm<sup>-1</sup>.

#### ***p*-Iodphenyl-1*H*-tetrazol (I-37, KKS-019)**



*p*-Iodbenzonitril (214 mg, 942 μmol), Natriumazid (69.6 mg, 1.07 mmol) und Ammoniumchlorid (55.0 mg, 1.03 mmol) wurden unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1.50 mL) gelöst und 12 h bei 130 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und das Produkt mit Wasser ausgefällt, sodass ein bräunlich-kristalliner Feststoff (212 mg, 779 μmol, 83 %) erhalten wurde.

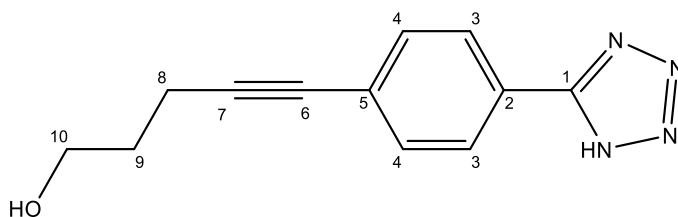
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO): δ = 7.99 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 7.8 Hz, 2H, *H*-3), 7.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.1 Hz, 2H, *H*-4) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO): δ = 155.7 (C-1), 138.1 (C-3), 128.6 (C-4), 124.2 (C-2), 98.2 (C-5) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 6.100 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 272.85 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 270.9485 [M-H]<sup>-</sup> (ber. *m/z* = 270.9486 für [M-H]<sup>-</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1600, 1475, 1275, 1260, 764, 749 cm<sup>-1</sup>.

**5-(4-(1H-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-ol (I-36, KKS-023)**

*p*-Iodphenyl-1*H*-tetrazol (I-37, 404 mg, 1.48 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-Pentin-1-ol (200  $\mu$ L, 2.14 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (23.4 mg, 33.4  $\mu$ mol), Kupfer(I)iodid (5.65 mg, 29.7  $\mu$ mol) und Piperidin (300  $\mu$ L, 3.03 mmol) in entgaster DMF/H<sub>2</sub>O-Lsg. (99:1, 10 mL) gelöst und für 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (3x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt, sodass ein farbloser-kristalliner Feststoff (286 mg, 1.25 mmol, 84 %) erhalten wurde.

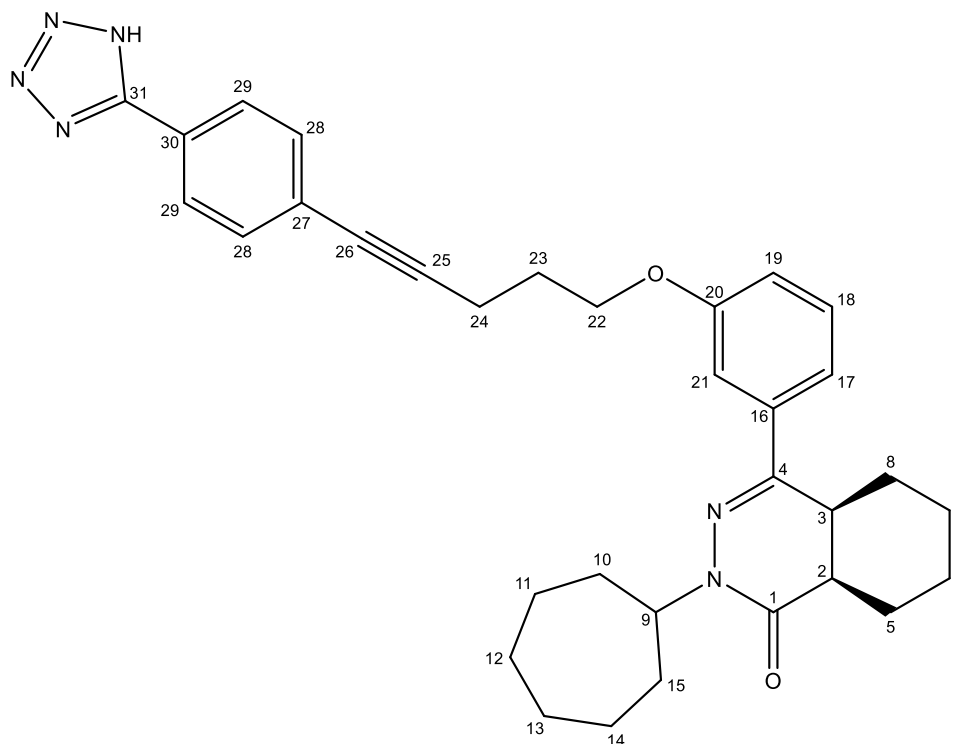
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.2 Hz, 2H, *H*-3), 6.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.1 Hz, 2H, *H*-4), 3.55-3.52 (m, 2H, *H*-10), 2.53-2.51 (m, 2H, *H*-8), 1.74-1.70 (m, 2H, *H*-10) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 162.1 (*C*-1), 132.1 (*C*-4), 127.0 (*C*-3), 126.0 (*C*-5), 123.4 (*C*-2), 93.3 (*C*-7), 79.8 (*C*-6), 59.4 (*C*-10), 31.4 (*C*-9), 15.4 (*C*-8) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 5.177 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 229.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:** *m/z* = 229.1086 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 229.1084 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3248, 2987, 2945, 2871, 1441, 1059, 848, 542 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)phenyl)-2-cycloheptyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-22, KKS-029)**

**KKS-023 (I-36, 68.2 mg, 298  $\mu\text{mol}$ )** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (74.2 mg, 389  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (34.1 mg, 279  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (0.06 mL) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-018 (I-35, 83.6 mg, 245  $\mu\text{mol}$ )** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (13.3 mg, 334  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (78.8 mg, 143  $\mu\text{mol}$ , 48 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.15 (d,  $^3J_{28,29}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-29), 7.54 (d,  $^3J_{28,29}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-28), 7.46-7.31 (m, 3H, *H*-18, *H*-19, *H*-21), 7.05-6.96 (m, 1H, *H*-17),

4.92-4.82 (m, 1H, *H*-9), 4.25-4.17 (m, 2H, *H*-22), 3.14-3.04 (m, 1H, *H*-3), 2.77-2.68 (m, 3H, *H*-2, *H*-24), 2.61-2.50 (m, 1H, *H*-5'), 2.21-2.10 (m, 2H, *H*-23), 2.08-1.11 (m, 19H, *H*-5, *H*-6, *H*-7, *H*-8, *H*<sub>heptyl</sub>) ppm;

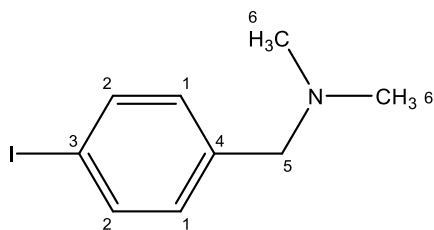
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.9 (C-1), 159.2 (C-20), 156.6 (C-31), 153.9 (C-4), 136.8 (C-16), 132.4 (C-28), 129.7 (C-18), 127.3 (C-29), 127.0 (C-30), 123.0 (C-27), 118.6 (C-21), 115.8 (C-17), 112.4 (C-19), 92.3 (C-25), 81.0 (C-26), 66.7 (C-22), 56.4 (C-9), 36.7 (C-2), 35.5 (C-3), 28.2 (C-23), 33.2, 32.9, 28.5, 28.2, 25.6, 25.0, 24.7, 24.3, 24.0, 22.2 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 16.4 (C-24) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 12.118 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 515.15 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 573.2952 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 573.2948 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2926, 2852, 1605, 1570, 1196, 850, 836, 699 cm<sup>-1</sup>.

#### ***N,N*-Dimethyl-*p*-iodbenzylamin (I-46, KKS-017)**



*p*-Iodphenylethanal (1.10 g, 4.75 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (20 mL) gelöst, bei RT mit Dimethylamin Hydrochlorid (580 mg, 7.12 mmol) und Natriumtrisacetoxyborhydrid (3.00 g, 14.2 mmol) versetzt und 17 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (3x 50 mL), ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. (3x 50 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 50 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C18 (Wasser/Acetonitril, 9:1 → 1:9) aufgereinigt und ein farbloses Öl (1.16 g, 4.45 mmol, 94 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 8.2 Hz, 2H, *H*-2), 7.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 8.2 Hz, 2H, *H*-1), 4.71 (s, 2H, *H*-5), 2.82 (s, 6H, *H*-6) ppm;

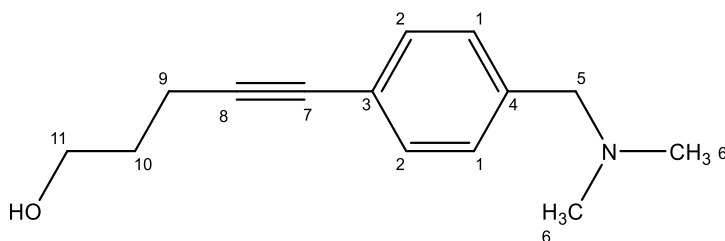
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 138.6 (C-2), 132.3 (C-1), 128.0 (C-4), 96.7 (C-3), 61.1 (C-5), 42.6 (C-6) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 3.568 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 261.85 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 262.0092 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 262.0087 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 1670, 1167, 1122, 828, 791, 718, 507 \text{ cm}^{-1}$ .

**5-(4-((-N,N-Dimethylamino)benzyl)pentin-1-ol (I-47, KKS-020)**



*N,N*-Dimethyl-*p*-Iodobenzylamin (**I-46**, 154 mg, 590  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-Pentin-1-ol (64.3  $\mu\text{L}$ , 694  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (9.50 mg, 13.5  $\mu\text{mol}$ ) und Kupfer(I)iodid (4.50 mg, 23.6  $\mu\text{mol}$ ) in entgastem TEA (3.00 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 17 h bei 60 °C gerührt, danach mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (3x 5 mL), ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (3x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt, sodass ein oranges Öl (102 mg, 470  $\mu\text{mol}$ , 80 %) erhalten wurde.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.41$  (d,  $^3J_{1,2} = 8.1 \text{ Hz}$ , 2H, *H*-2), 7.35 (d,  $^3J_{1,2} = 8.1 \text{ Hz}$ , 2H, *H*-1), 4.13 (s, 2H, *H*-5), 3.77 (t,  $^3J_{10,11} = 6.2 \text{ Hz}$ , 2H, *H*-11), 2.73 (s, 6H, *H*-6), 2.52 (t,  $^3J_{9,10} = 7.0 \text{ Hz}$ , 2H, *H*-13), 1.84 (quint,  $^3J_{9,10} = ^3J_{10,11} = 6.6 \text{ Hz}$ , 2H, *H*-10) ppm;

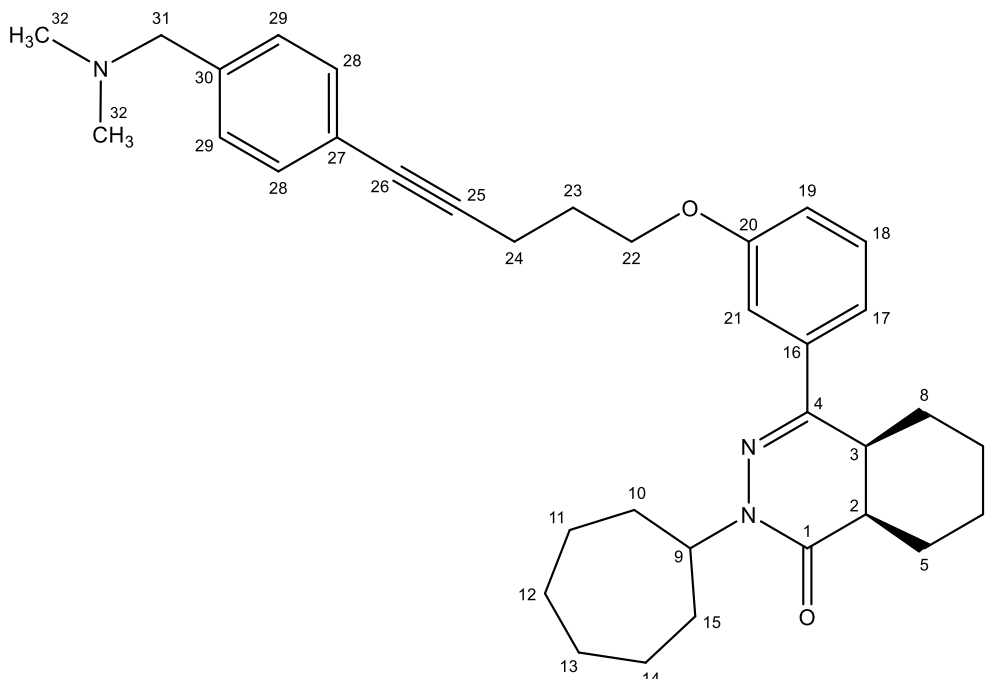
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 132.4$  (C-2), 130.7 (C-1), 127.9 (C-3), 126.3 (C-4), 91.9 (C-8), 80.0 (C-7), 61.4 (C-11), 60.7 (C-5), 42.1 (C-6), 31.3 (C-10), 16.1 (C-9) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}} = 3.321 \text{ min}$  (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 218.15  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 218.1538$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z = 218.1539$  für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3334, 2942, 2863, 2817, 2775, 1508, 838, 806, 539 \text{ cm}^{-1}$ .

**(4a*S*,8a*R*)-2-Cycloheptyl-4-(3-((5-(4-((dimethylamino)methyl)phenyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)phenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-31, KKS-022)**



**KKS-020 (I-47, 124 mg, 574  $\mu\text{mol}$ )** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (115 mg, 605  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (76.6 mg, 627  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (61.0  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (5x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-018 (I-35, 122 mg, 360  $\mu\text{mol}$ )** wurde in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (10.8 mg, 451  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Die Lösung wurde 17 h bei RT gerührt und danach mit Ethylacetat verdünnt. Nacheinander wurde die org. Phase mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt, wodurch ein orangener Schaum (122 mg, 226  $\mu\text{mol}$ , 63 %) erhalten wurde.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.43-7.21 (m, 7H, *H*-17, *H*-18, *H*-21, *H*-28, *H*-29), 7.02-6.93 (m, 1H, *H*-19), 4.87-4.79 (m, 1H, *H*-9), 4.25-4.11 (m, 2H, *H*-22), 3.44 (s, 2H, *H*-31), 3.10-3.02 (m, 1H, *H*-3), 2.71-2.62 (m, 3H, *H*-2, *H*-24), 2.61-2.53 (m, 1H, *H*-5'), 2.62

(s, 6H, *H*-32), 2.18-2.09 (m, 2H, *H*-23), 2.07-1.30 (m, 19H, *H*-5, *H*-6, *H*-7, *H*-8, *H*<sub>heptyl</sub>) ppm;

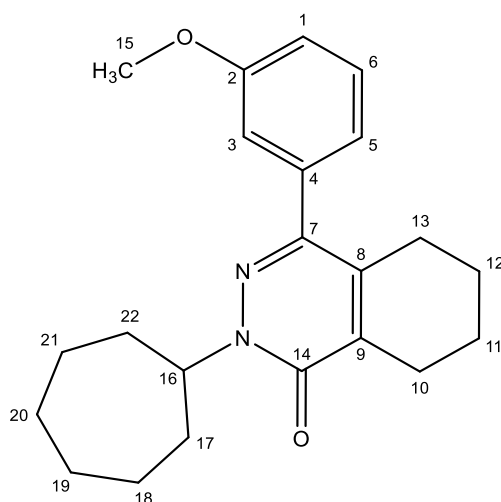
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.2 (C-1), 159.2 (C-20), 152.5 (C-4), 138.2 (C-30), 136.7 (C-16), 131.4 (C-28), 129.5 (C-21), 129.0 (C-29), 122.5 (C-27), 118.3 (C-17), 115.2 (C-19), 112.2 (C-18), 88.7 (C-25), 81.1 (C-26), 66.5 (C-22), 63.9 (C-31), 55.9 (C-9), 45.2 (C-32), 36.7 (C-2), 35.6 (C-3), 28.5 (C-23), 33.0, 32.8, 28.3, 28.0, 25.5, 25.0, 24.7, 24.3, 24.0, 21.9 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 16.2 (C-24) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 9.733 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 540.20 [M+H]<sup>+</sup> (100)

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 540.3587 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 540.3585 für [M+H]<sup>+</sup>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2926, 2854, 2815, 1658, 1265, 728, 694 cm<sup>-1</sup>.

**2-Cycloheptyl-4-(3-methoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydrophthalazin-1(2H)-on (I-55, KKS-032)**<sup>[137]</sup>



**KKS-015 (I-48,** 0.393 g, 1.10 mmol) und Kupfer(II)chlorid (0.332 g, 2.47 mmol) wurden für 17 h bei Reflux in MeCN (7.00 mL) gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (0.339 g, 0.963 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>6,1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 7.9 Hz, 1H, *H*-6), 7.03-6.98 (m, 2H, *H*-1, *H*-5), 6.96 (s, 1H, *H*-3), 5.23-5.12 (m, 1H, *H*-16), 3.88 (s, 3H, *H*-15), 2.70 (t, <sup>3</sup>J<sub>10,11</sub> = 6.12 Hz, 2H, *H*-10), 2.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>12,13</sub> = 5.09 Hz, 2H, *H*-13), 2.04-1.94 (m, 4H, *H*-11,

$H_{\text{heptyl}}$ ), 1.87-1.75 (m, 4H,  $H_{12}$ ,  $H_{\text{heptyl}}$ ), 1.73-1.63 (m, 4H,  $H_{\text{heptyl}}$ ), 1.63-1.54 (m, 4H,  $H_{\text{heptyl}}$ ) ppm;

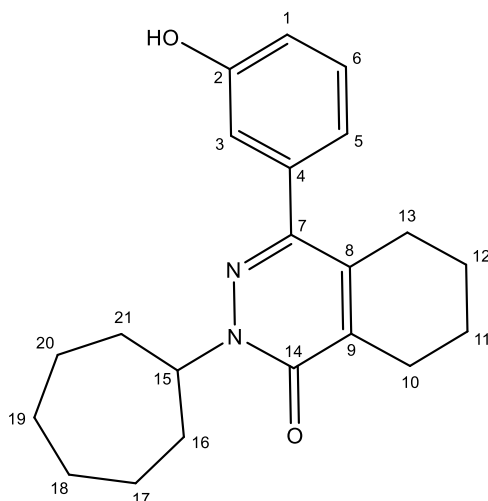
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 159.9 (C-14), 159.4 (C-2), 148.2 (C-7), 139.2, 137.1 (C-8, C-9), 137.3 (C-4), 129.4 (C-6), 121.2 (C-1), 115.1 (C-3), 113.9 (C-5), 59.8 (C-16), 55.2 (C-15), 27.5 (C-13), 23.9 (C-10), 33.6, 27.8, 24.8, 23.9, 21.5, 21.1 (C-11, C-12, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 10.984 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 353.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 375.2046  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 375.2043 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2926, 2858, 1634, 1592, 1579, 1158, 729, 729  $\text{cm}^{-1}$ .

***cis*-2-Cycloheptyl-4-(3-methoxyphenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-(2H)-on (I-56, KKS-034)<sup>[137]</sup>**



**Methode 1:** **KKS-032 (I-55, 0.115 g, 0.326 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (3.00 mL) gelöst und bei 0 °C mit 1 M Bortribromid (700  $\mu\text{L}$ , 700  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (85.3 mg, 0.252 mmol, 77 %) erhalten.

**Methode 2:** **KKS-018 (I-35, 0.227 g, 0.667 mmol)** und Kupfer(II)chlorid (0.109 g, 0.818 mmol) wurden für 17 h bei Reflux in MeCN (7.00 mL) gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen

## 9. Experimenteller Teil

wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (0.153 g, 0.452 mmol, 68 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.34-7.28 (m, 1H, *H*-6), 7.02-6.99 (m, 1H, *H*-1), 6.95-6.90 (m, 1H, *H*-5), 6.89-6.85 (m, 1H, *H*-3), 5.19-5.1208 (m, 1H, *H*-15), 4.46 (s, H, *OH*), 2.67 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>10,11</sub> = 6.2 Hz, 2H, *H*-10), 2,45 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>12,13</sub> = 5.9 Hz, 2H, *H*-13), 2.04-1.86 (m, 4H, *H*-11, *H*<sub>heptyl</sub>), 1.85-1.70 (m, 4H, *H*-12, *H*<sub>heptyl</sub>), 1.70-1.40 (m, 8H, *H*<sub>heptyl</sub>) ppm;

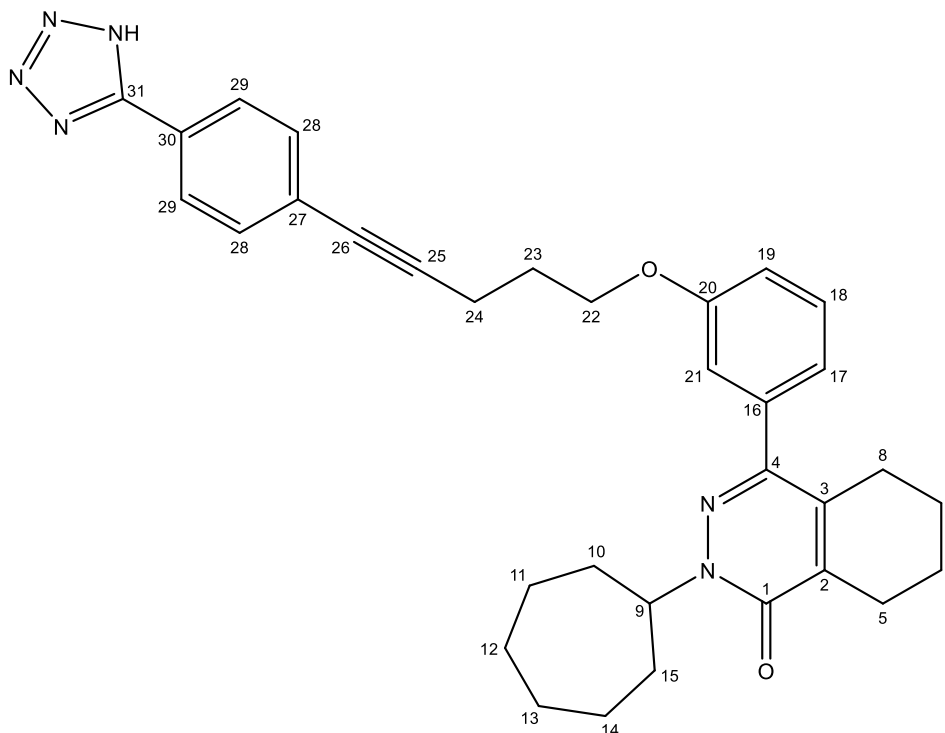
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 159.8 (*C*-14), 156.5 (*C*-2), 147.7 (*C*-7), 138.8, 136.9 (*C*-8, *C*-9), 137.6 (*C*-4), 129.4 (*C*-6), 120.8 (*C*-1), 116.0 (*C*-3), 115.9 (*C*-5), 59.3 (*C*-15), 27.5 (*C*-13), 24.0 (*C*-10), 33.6, 28.0, 24.9, 23.8, 21.7, 21.3 (*C*-11, *C*-12, *C*-16, *C*-17, *C*-18, *C*-19, *C*-20, *C*-21) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 10.994 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 339.10 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 361.1886 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 361.1886 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3155, 2927, 2857, 1625, 1572, 712, 680 cm<sup>-1</sup>.

### 4-(3-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)phenyl)-2-cycloheptyl-5,6,7,8-tetrahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-57, KKS-035)



**KKS-023 (I-36, 151 mg, 664  $\mu\text{mol}$ )** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (130 mg, 686  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (75.8 mg, 620  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (0.05 mL) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-034 (I-56, 150 mg, 444  $\mu\text{mol}$ )** wurde in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (21.3 mg, 531  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Die Lösung wurde 17 h bei RT gerührt, danach mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C-18 (Acetonitril/Wasser, 95:5  $\rightarrow$  5:95) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (0.173 g, 0.316 mmol, 71 %) erhalten.

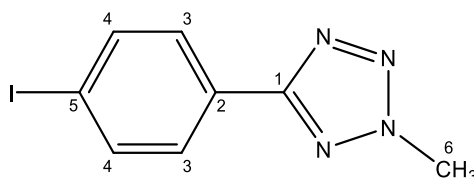
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.08 (d,  $^3J_{28,29}$  = 8.0 Hz, 2H, *H*-29), 7.49 (d,  $^3J_{28,29}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-28), 7.39 (t,  $^3J_{18,19}$  = 7.8 Hz, 1H, *H*-18), 7.05-6.96 (m, 3H, *H*-17, *H*-19, *H*-21), 5.21-5.13 (m, 1H, *H*-9), 4.24 (t,  $^3J_{22,23}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-22), 2.70 (t,  $^3J_{23,24}$  = 6.7 Hz, 2H, *H*-24), 2.69-2.65 (m, 2H, *H*-5), 2.49-2.44 (m, 2H, *H*-8), 1.96 (p,  $^3J_{22,23}$  =  $^3J_{23,24}$  = 6.3 Hz, 1H, *H*-23), 2.05-1.92 (m, 4H, *H*<sub>heptyl</sub>), 1.83-1.73 (m, 4H, *H*-6, *H*<sub>heptyl</sub>), 1.70-1.65 (m, 4H, *H*-7, *H*<sub>heptyl</sub>), 1.60-1.48 (m, 4H, *H*<sub>heptyl</sub>) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 160.2 (C-1), 158.7 (C-20), 156.1 (C-31), 149.0 (C-4), 139.6 (C-3), 137.1 (C-2), 136.9 (C-16), 132.3 (C-28), 129.6 (C-18), 127.4 (C-29), 126.7 (C-30), 123.4 (C-27), 118.6 (C-21), 115.8 (C-17), 112.4 (C-19), 92.2 (C-25), 80.6 (C-26), 66.4 (C-22), 59.9 (C-9), 28.2 (C-23), 27.8 (C-8), 24.1 (C-5), 33.7, 27.8, 24.8 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 21.3 (C-7), 21.1 (C-6), 16.2 (C-24) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 11.527 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 549.10 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 547.2827 [ $\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup> (ber.  $m/z$  = 547.2827 für [ $\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2926, 2858, 1660, 1632, 1579, 1440, 846  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-Iodophenyl)-2-methyl-2H-tetrazol (KKS-096)**

**KKS-019 (I-37, 500 mg, 1.84 mmol)** wurde in trockenem DCM (10 mL) gelöst, mit Methyljodid (126  $\mu$ L, 2.02 mmol) und DIPEA (483  $\mu$ L) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat/Ethanol, 95:5:2  $\rightarrow$  5:90:5) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (408 mg, 1.42 mmol, 78 %) erhalten.

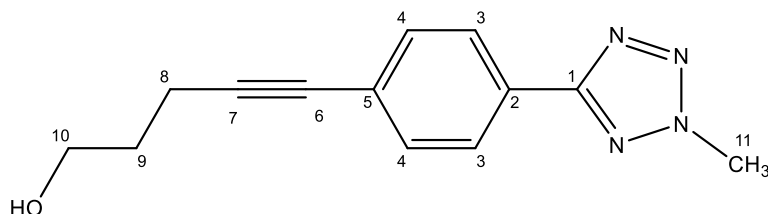
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.94 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-3), 7.84 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-4), 4.43 (s, 3H, *H*-6) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 163.4 (*C*-1), 138.1 (*C*-4), 128.1 (*C*-3), 126.4 (*C*-2), 97.3 (*C*-5), 39.7 (*C*-6) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 8.048 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 286.90 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 286.9789 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 286.9788 für [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1365, 1216, 830, 682, 507  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(2-Methyltetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-ol (I-44, KKS-110)**

**KKS-096 (I-43, 398 mg, 1.39 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-Pentin-1-ol (160  $\mu$ L, 1.71 mmol),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (36.4 mg, 51.9  $\mu$ mol), Kupfer(I)iodid (15.3 mg, 80.7  $\mu$ mol) und Piperidin (300 mL, 3.07 mmol) in entgastem DMF/ $\text{H}_2\text{O}$ -Lsg. (99:1, 10 mL) gelöst und für 17 h bei 85  $^{\circ}\text{C}$  gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (3x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die

vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0 → 4:1) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (287 mg, 1.19 mmol, 85 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.03-7.99 (m, 2H, *H*-3), 7.57-7.53 (m, 2H, *H*-4), 4.57 (t,  $^3J_{9,10}$  = 5.1 Hz, 2H, *H*-10), 4.43 (s, 3H, *H*-11), 3.59-3.48 (m, 2H, *H*-8), 1.77-1.64 (m, 2H, *H*-10) ppm;

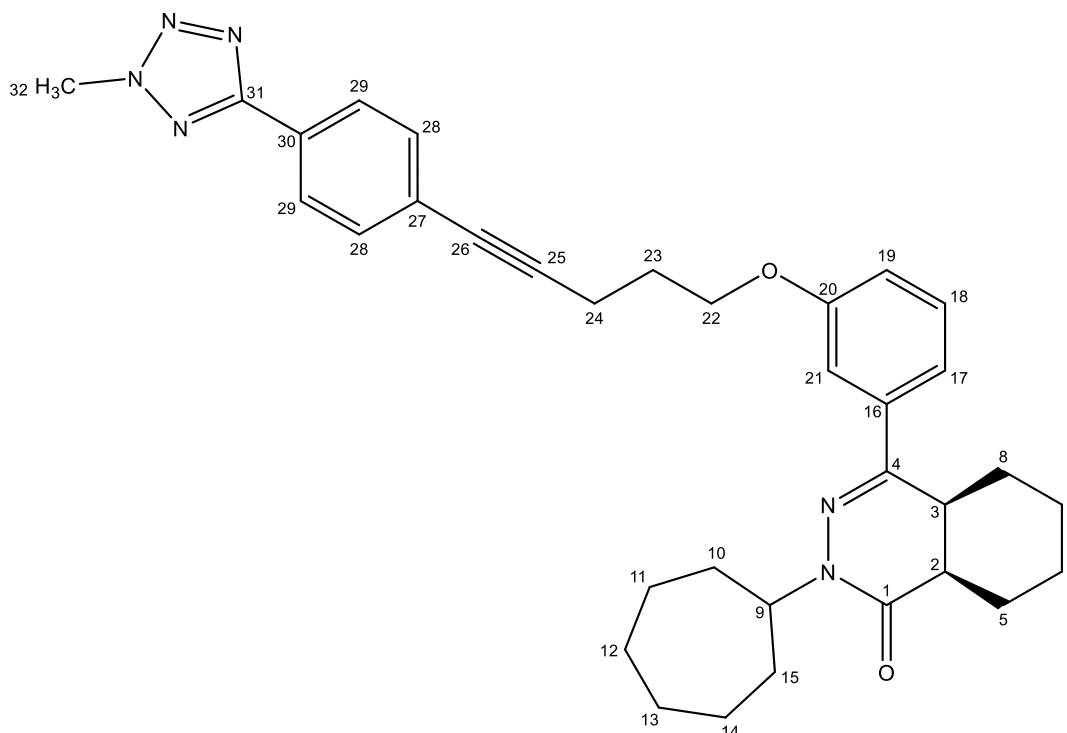
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 163.6 (C-1), 132.1 (C-4), 126.4 (C-3), 126.1 (C-5), 125.3 (C-2), 92.7 (C-7), 79.9 (C-6), 59.4 (C-10), 39.7 (C-11), 31.5 (C-9), 15.4 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 6.504 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 243.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 265.1059 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 265.1060 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3343, 2980, 1608, 1457, 1045, 848, 759, 539 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-2-Cycloheptyl-4-(3-((5-(4-(2-methyl-2*H*-tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)phenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-30, KKS-112)**



**KKS-110 (I-44, 80.0 mg, 0.330 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (69.2 mg, 0.364  $\mu$ mol), DMAP (44.3 mg, 0.363 mmol) und DIPEA (0.05 mL) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x

10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-018 (I-35)**, 123 mg, 0.362 mmol) wurde in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (15.9 mg, 0.397 mmol) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Die Lösung wurde 17 h bei RT gerührt, danach mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat/Ethanol, 100:0:0 → 60:37:3) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (119 mg, 0.211 mmol, 64 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.03-7.96 (m, 2H, *H*-29), 7.57-7.51 (m, 2H, *H*-28), 7.43-7.33 (m, 3H, *H*-17, *H*-18, *H*-21), 7.08-7.02 (m, 1H, *H*-19), 4.78-4.64 (m, 1H, *H*-9), 4.42 (s, 1H, *H*-32), 4.16 (t,  $^3J_{22,23}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-22), 3.27-3.16 (m, 1H, *H*-3), 2.72-2.61 (m, 3H, *H*-2, *H*-24), 2.33-2.22 (m, 1H, *H*-5'), 2.10-1.96 (m, 2H, *H*-23), 1.93-1.10 (m, 19H, *H*-5, *H*-6, *H*-7, *H*-8, *H*-10, *H*-11, *H*-12, *H*-13, *H*-14, *H*-15) ppm;

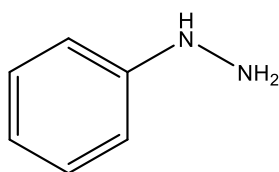
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 165.7 (C-1), 163.6 (C-31), 158.8 (C-20), 152.5 (C-4), 136.3 (C-16), 132.1 (C-28), 129.9 (C-18), 126.4 (C-29), 126.2 (C-30), 125.1 (C-27), 118.3 (C-21), 115.3 (C-17), 111.8 (C-19), 91.9 (C-25), 80.5 (C-26), 66.2 (C-22), 54.8 (C-9), 40.1 (C-32), 28.1 (C-23), 35.8, 34.3, 32.9, 32.6, 27.8, 24.8, 24.5, 23.9, 23.3, 21.7 (C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 15.6 (C-24) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 13.791 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 563.10 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 587.3107 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 587.3105 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 2925, 2853, 1658, 1264, 695 cm<sup>-1</sup>.

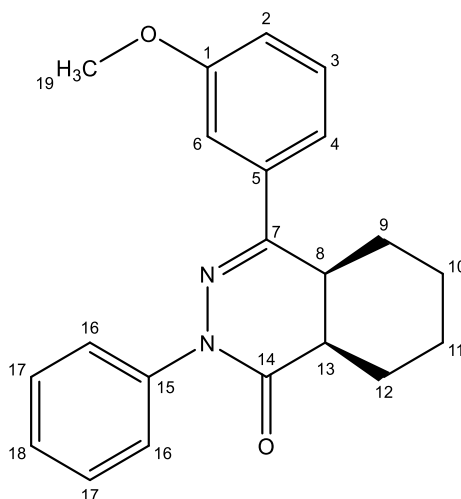
**Hydrazinbenzol (I-52, KKS-144)**<sup>[135]</sup>



Zu einer Lösung aus Anilin (1 mL, 11.0 mmol) in konzentrierter HCl (3.20 mL) wurde eine Lösung aus Natriumnitrit (755 mg, 10.9 mmol) in Wasser (3.00 mL) gegeben. Nach 30 min bei 0 °C wurde eine Lösung aus Natriumsulfit (5.52 g, 44.0 mmol) in Wasser

(20.0 mL) bei gleicher Temperatur langsam zugegeben. Die Suspension wurde auf 70 °C erwärmt und nach 1 h wurden konzentrierte HCl (2.20 mL) zugegeben. Nach 17 h bei gleicher Temperatur wurde erneut HCl (10 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Der Niederschlag wurde filtriert, mit kaltem Wasser (2x 5 mL) und EE (2x 5 mL) gewaschen und anschließend in EE suspendiert. Mit 5 M NaOH wurde ein pH-Wert von 13 eingestellt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EE (4x 25 mL) extrahiert. Die ver. org. Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das LM i. Vak. entfernt. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt verwendet.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-Methoxyphenyl)-2-phenyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-53, KKS-148)**



**KKS-013 (I-40, 310 mg, 1.18 mmol)** und **KKS-144 (I-52, 153 mg, 1.42 mmol)** wurden in EtOH (12.0 mL) gelöst und 12 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 100:0 → 75:25) aufgereinigt und ein weiß-kristalliner Feststoff (263 mg, 788 µmol, 68 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO): δ = 7.55-7.49 (m, 2H, *H*-16), 7.47-7.36 (m, 5H, *H*-3, *H*-4, *H*-6, *H*-17), 7.33-7.27 (m, 1H, *H*-18), 7.09-6.99 (m, 1H, *H*-2), 3.79 (s, 3H, *H*-19), 3.46-3.35 (m, 1H, *H*-8), 3.12-2.95 (m, 1H, *H*-13), 2.44-2.31 (m, 1H, *H*-12'), 1.82-1.26 (m, 7H, *H*-9, *H*-10, *H*-11, *H*-12) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO): δ = 167.3 (C-14), 159.5 (C-1), 154.2 (C-7), 141.5 (C-15), 135.7 (C-5), 129.8 (C-6), 128.3 (C-17), 126.2 (C-18), 125.0 (C-16), 118.6 (C-4), 115.3

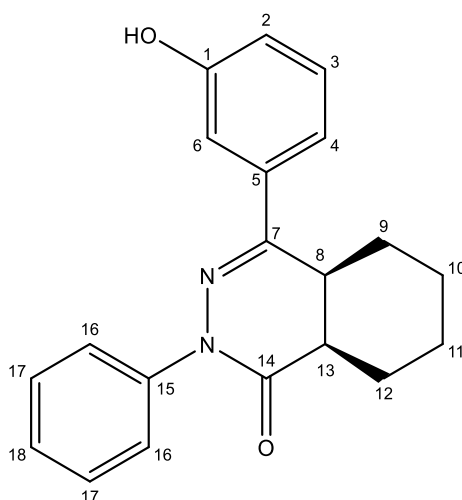
(C-2), 111.4 (C-3), 55.2 (C-19), 36.4 (C-13), 35.0 (C-8), 24.9, 24.5, 23.3, 21.6 (C-9, C-10, C-11, C-12) ppm;

**LCMS:**  $t_R = 10.089$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 335.10  $[M+H]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z = 335.1754$   $[M+H]^+$  (ber.  $m/z = 335.1754$  für  $[M+H]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2980, 1678, 1488, 1286, 1166, 690$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-hydroxyphenyl)-2-phenyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-54, KKS-152)**



**KKS-148 (I-53, 523 g, 1.59 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (3.00 mL) gelöst und bei 0 °C mit Aluminiumtrichlorid (2.12 mg, 15.9 mmol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat, 100:0 → 3:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (496 mg, 1.55 mmol, 97 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta = 9.60$  (s, 1H, OH), 7.55-7.48 (m, 2H, H-16), 7.47-7.39 (m, 2H, H-17), 7.35-7.21 (m, 4H, H-3, H-4, H-6, H-18), 6.90-6.82 (m, 1H, H-2), 3.36-3.26 (m, 1H, H-8), 3.07-3.00 (m, 1H, H-13), 2.40-2.30 (m, 1H, H-12'), 1.80-1.25 (m, 7H, H-9, H-10, H-11, H-12) ppm;

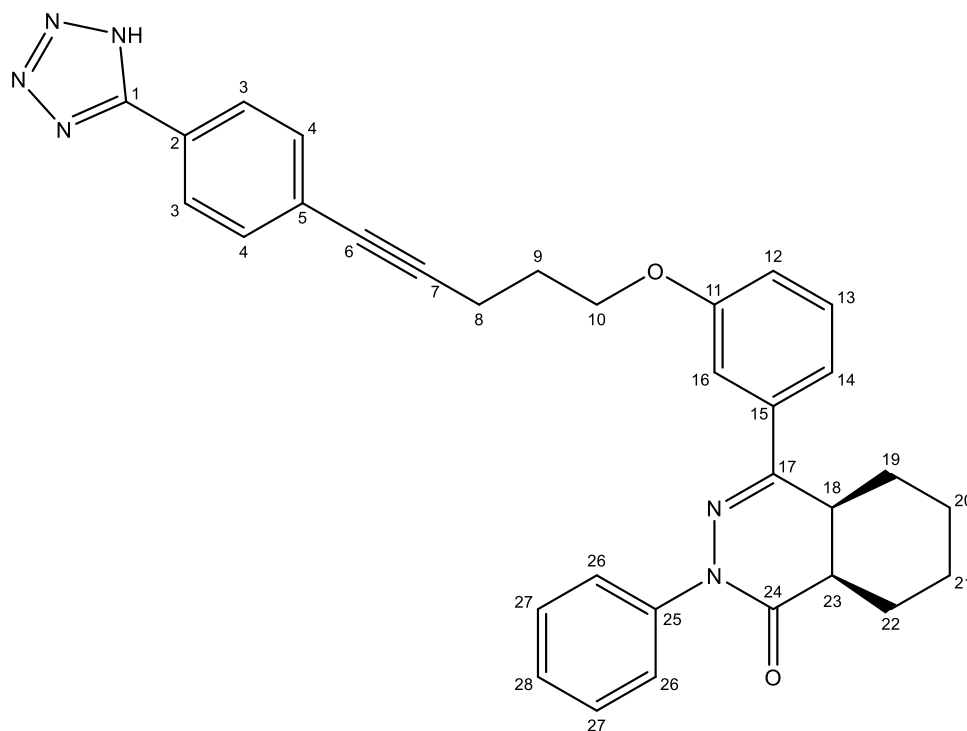
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta = 167.3$  (C-14), 157.6 (C-1), 154.3 (C-7), 141.6 (C-15), 135.6 (C-5), 129.8 (C-6), 128.4 (C-17), 126.3 (C-18), 125.2 (C-16), 118.6 (C-4), 117.1 (C-2), 112.4 (C-3), 36.4 (C-13), 35.1 (C-8), 25.0, 24.6, 23.3, 21.6 (C-9, C-10, C-11, C-12) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 8.333 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 319.05  $[M-H]^-$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 319.1451  $[M-H]^-$  (ber.  $m/z$  = 319.1452 für  $[M-H]^-$ ),

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3326, 2980, 1651, 1393, 1132, 693  $\text{cm}^{-1}$ .

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)phenyl)-2-phenyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-29, KKS-173)**



**KKS-023 (I-36, 70.0 mg, 306  $\mu\text{mol}$ )** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (64.3 mg, 337  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (41.2 mg, 337  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (0.05 mL) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-152 (I-54, 117 mg, 365  $\mu\text{mol}$ )** wurde in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (29.4 mg, 736  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Die Lösung wurde 17 h bei RT gerührt, danach mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an

Kieselgel (DCM/Methanol, 100:0 → 97:3) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (104 mg, 196  $\mu\text{mol}$ , 64 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.03-7.97 (m, 2H, *H*-3), 7.62-7.56 (m, 2H, *H*-4), 7.55-7.49 (m, 2H, *H*-26), 7.48-7.34 (m, 5H, *H*-13, *H*-14, *H*-16, *H*-27), 7.32-7.23 (m, 1H, *H*-28), 7.11-7.03 (m, 1H, *H*-12), 4.15 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.0 Hz, 2H, *H*-10), 3.43-3.33 (m, 1H, *H*-18), 3.05-2.98 (m, 1H, *H*-23), 2.66 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.40-2.28 (m, 1H, *H*-22'), 2.07-1.96 (m, 2H, *H*-9), 1.80-1.24 (m, 7H, *H*-19, *H*-20, *H*-21, *H*-22) ppm;

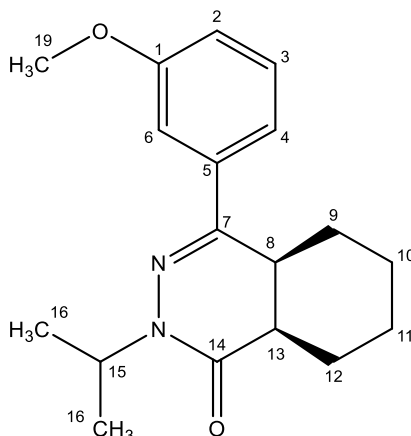
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 167.3 (C-24), 158.8 (C-11), 155.1 (C-1), 154.2 (C-17), 141.5 (C-25), 135.7 (C-15), 132.2 (C-4), 129.9 (C-13), 128.3 (C-27), 127.1 (C-3), 126.2 (C-28), 125.8 (C-5), 125.1 (C-26), 123.5 (C-2), 118.7 (C-16), 115.7 (C-12), 112.2 (C-14), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.2 (C-10), 36.4 (C-18), 35.0 (C-23), 27.8 (C-9), 24.8, 24.5, 23.3, 21.6 (C-19, C-20, C-21, C-22), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.841 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 531.15  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 531.2503  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 531.2503 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3444, 3063, 3015, 2969, 1738, 1677, 1023, 692  $\text{cm}^{-1}$ .

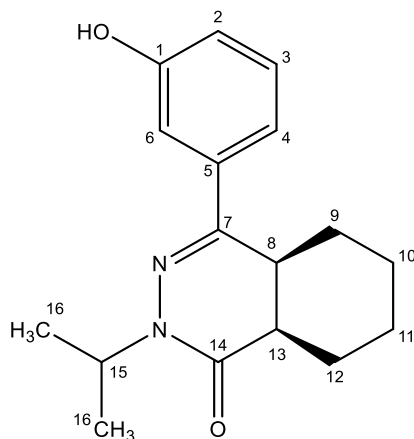
**(4a*S*,8a*R*)-2-isopropyl-4-(3-methoxyphenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-49, KKS-193)**



**KKS-014 (I-39, 404 mg, 1.56 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1.50 mL) gelöst und bei RT mit Natriumhydrid (52.5 mg, 2.19 mmol) versetzt. Nach 2 h wurde Isopropylbromid (437  $\mu\text{L}$ , 4.69 mmol) zugegeben und weitere 17 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das

Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 100:0 → 4:1) aufgereinigt. Der erhaltene farblos-kristalline Feststoff (320 mg, 1.06 mmol, 68 %) wurde direkt weiter umgesetzt.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-hydroxyphenyl)-2-isopropyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-50, KKS-195)**



**KKS-193 (I-49, 266 mg, 719  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (3.00 mL) gelöst und bei 0 °C mit Aluminiumtrichlorid (287 mg, 2.16 mmol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat, 100:0 → 75:25) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (178 mg, 623  $\mu$ mol, 59 % über zwei Schritte) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.53 (s, 1H, OH), 7.34-7.15 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 6.87-6.74 (m, 1H, H-2), 4.93 (sept,  $^3J_{15,16}$  = 6.6 Hz, H-15), 3.21-3.11 (m, 1H, H-8), 2.75-2.67 (m, 1H, H-13), 2.39-2.26 (m, 1H, H-12'), 1.73-1.11 (m, 13H, H-9, H-10, H-11, H-12, H-16) ppm;

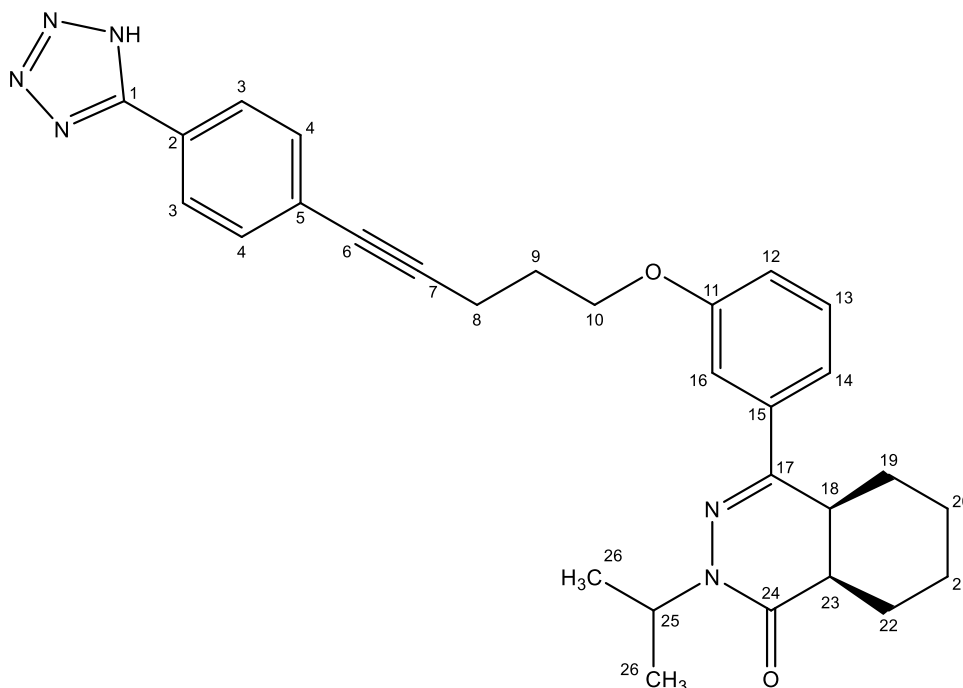
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (125 MHz, DMSO):  $\delta$  = 166.1 (C-14), 157.5 (C-1), 152.6 (C-7), 136.1 (C-5), 129.6 (C-6), 116.6 (C-2), 112.2 (C-3), 45.4 (C-15), 35.9 (C-13), 34.5 (C-8), 24.9, 24.0, 23.3, 21.4 (C-9, C-10, C-11, C-12), 20.4, 20.0 (C-16), ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 8.058 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 287.10 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 287.1755 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 287.1754 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3182, 2970, 1738, 1656, 1362, 1023, 612  $\text{cm}^{-1}$ .

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)phenyl)-2-isopropyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-28, KKS-207)**



**KKS-023 (I-36, 86.1 mg, 377  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (71.9 mg, 377  $\mu$ mol), DMAP (46.1 mg, 377  $\mu$ mol) und DIPEA (0.05 mL) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-195 (I-50, 90.0 mg, 314  $\mu$ mol)** wurde in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (29.4 mg, 736  $\mu$ mol) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Die Lösung wurde 17 h bei RT gerührt, danach mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Methanol, 100:0  $\rightarrow$  97:3) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (101 mg, 245  $\mu$ mol, 65 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.01 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-3), 7.61 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-4), 7.46-7.31 (m, 3H, *H*-13, *H*-14, *H*-16), 7.09-7.01 (m, 1H, *H*-12), 4.92 (hept,  $^3J_{25,26}$  = 6.6 Hz, 1H, *H*-5), 4.18 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-10), 3.30-3.17 (m, 1H, *H*-18),

2.80-2.65 (m, 3H, *H*-8, *H*-23), 2.37-2.23 (m, 1H, *H*-22'), 2.14-1.97 (m, 2H, *H*-9), 1.72-1.09 (m, 12H, *H*-19, *H*-20, *H*-21, *H*-22, *H*-26) ppm;

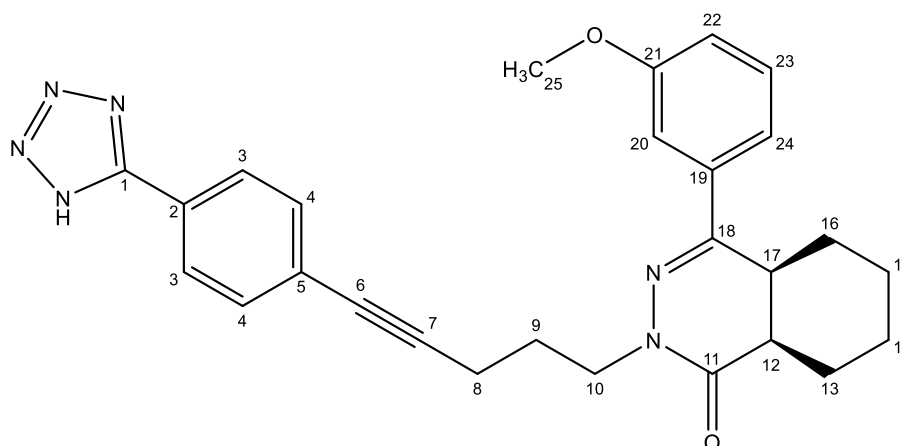
<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 166.1 (C-24), 158.7 (C-11), 154.3 (C-1), 152.4 (C-17), 136.3 (C-16), 132.1 (C-4), 129.8 (C-13), 127.0 (C-3), 126.1 (C-5), 123.4 (C-2), 118.3 (C-16), 115.3 (C-12), 111.8 (C-14), 92.4 (C-7), 80.3 (C-6), 66.2 (C-10), 45.5 (C-25), 35.9 (C-23), 34.3 (C-18), 27.7 (C-9), 24.8, 23.9, 23.3, 21.6 (C-19, C-20, C-21, C-22), 20.0, 20.4 (C-26), 15.6 (C-8) ppm;

LCMS:  $t_R$  = 10.789 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 497.20 [M+H]<sup>+</sup> (100);

HR-ESI-MS:  $m/z$  = 519.2478 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 519.2479 für [M+Na]<sup>+</sup>);

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1365, 1216, 527 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-2-(5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-yn-1-yl)-4-(3-methoxyphenyl)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-59, KKS-172)**



**KKS-023 (I-36, 86.0 mg, 376  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (86.2 mg, 452  $\mu$ mol), DMAP (50.6 mg, 414  $\mu$ mol) und DIPEA (0.07 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 17 h bei RT gerührt. Es wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, es wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-015 (I-48, 107 mg, 414  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (2 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (18.1 mg, 452  $\mu$ mol) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x

10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, es wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Methanol, 100:0 → 97:3) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (104 mg, 221  $\mu$ mol, 59 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.02 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-3), 7.62 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-4), 7.45-7.32 (m, 3H, *H*-20, *H*-23, *H*-24), 7.05-6.95 (m, 1H, *H*-22), 4.07-3.85 (m, 2H, *H*-10), 3.78 (s, 3H, *H*-25), 3.32-3.24 (m, 1H, *H*-17), 2.83-2.74 (m, 1H, *H*-12), 2.55-2.51 (m, 2H, *H*-8), 2.36-2.28 (m, 1H, *H*-16'), 2.01-1.92 (m, 2H, *H*-9), 1.72-1.19 (m, 7H, *H*-13, *H*-14, *H*-15, *H*-16) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 167.1 (C-11), 159.5 (C-21), 155.2 (C-1), 152.6 (C-18), 135.9 (C-19), 132.1 (C-4), 129.7 (C-23), 127.0 (C-3), 126.0 (C-5), 123.5 (C-2), 118.3 (C-20), 115.1 (C-22), 111.2 (C-24), 92.7 (C-7), 80.2 (C-6), 55.1 (C-25), 46.8 (C-10), 35.7 (C-12), 34.8 (C-17), 27.0 (C-9), 24.8, 24.2, 23.2, 21.7 (C-13, C-14, C-15, C-16), 16.4 (C-8) ppm;

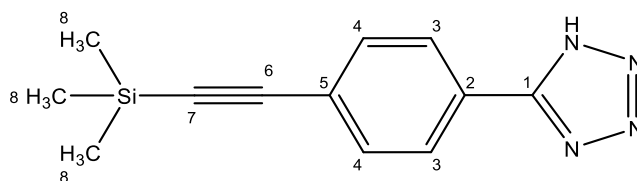
**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 9.755 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 467.20 [ $\text{M-H}$ ]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 469.2347 [ $\text{M+H}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 469.2347 für [ $\text{M+H}$ ]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2929, 1738, 1608, 1365, 1216, 693  $\text{cm}^{-1}$ .

### 9.2.1.2 Aromatische Pyridazinontetrazole

#### 5-(4-((Trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)-1*H*-tetrazol () (I-62, KKS-117)



*p*-Iodphenyl-1*H*-tetrazol (**I-37**, 2.51 g, 9.24 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit Trimethylsilylacetylen (1.50 mL, 11.0 mmol),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (241 mg, 344  $\mu$ mol), Kupfer(I)iodid (101 mg, 535  $\mu$ mol) und Piperidin (2.00 mL, 2.03 mmol) in entgastem Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$ -Lsg. (99:1, 25 mL) gelöst und für 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (3x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 95:5 → 80:20)

aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (1.64 g, 6.78 mmol, 73 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.05 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, H-3), 7.68 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, H-4), 0.25 (s, 9H, H-8) ppm;

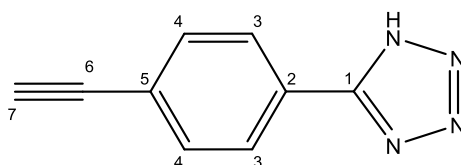
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 155.3 (C-1), 132.5 (C-4), 127.0 (C-3), 124.7 (C-2), 124.5 (C-5), 104.2 (C-6), 96.7 (C-7), -0.33 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 8.675 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 243.05 [M+H]<sup>+</sup> (55);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 243.1061 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 243.1060 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1609, 1493, 1249, 842, 672 cm<sup>-1</sup>.

### 5-(4-Ethynylphenyl)-1H-tetrazol () (I-63, KKS-164)



**KKS-117 (I-62,** 380 mg, 1.57 mmol) wurde mit 1 M TBAF in THF (1.90 mL, 1.90 mmol) in trockenem DCM (5 mL) gelöst und 2 h bei 40 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 10 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/DCM/EtOH 1:0:0 → 60:37:3) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (221 mg, 1.30 mmol, 83 %) erhalten wurde.

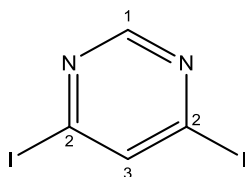
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.05 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, H-3), 7.70 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, H-4), 4.41 (s, 1H, H-7) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 155.1 (C-1), 132.7 (C-4), 127.2 (C-3), 124.5 (C-2), 124.4 (C-5), 83.1 (C-6), 82.7 (C-7) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 4.961 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 169.00 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 171.0664 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 171.0665 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1365, 1216, 527 cm<sup>-1</sup>.

**2,6-Diiodopyrimidin (I-61, KKS-160)<sup>[145]</sup>**

4,6-Dichlopyrimidin (1.00 g, 6.71 mmol) wurde mit Natriumiodid (1.35 g, 9.00 mmol) in Iodwasserstoffsäure (57 % w/w, 10 mL) gelöst und 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 10 M NaOH (4.5 mL) auf pH 10 eingestellt, der entstandene Niederschlag filtriert und mit Wasser gewaschen. Der Filterkuchen wurde i. Vak. getrocknet und ein gelb-kristalliner Feststoff (1.53 g, 4.62 mmol, 69 %) erhalten.

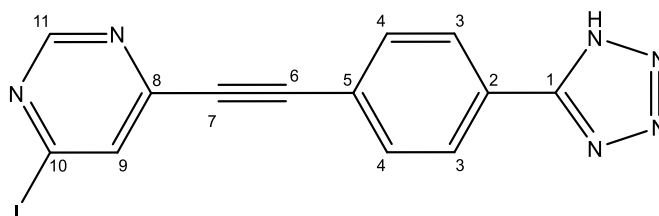
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.62-8.54 (m, 2H, *H*-1, *H*-3) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.4 (C-1), 142.1 (C-3), 130.7 (C-2) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 5.883 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 332.70 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 332.8379 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 332.8380 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1493, 1387, 1261, 719 cm<sup>-1</sup>.

**4-((4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)ethynyl)-6-iodopyrimidin (I-64, KKS-165)**

**KKS-160 (I-61)**, 429 mg, 1.29 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit **KKS-164** (200 mg, 1.18 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (32.5 mg, 46.3  $\mu$ mol), Kupfer(I)iodid (11.8 mg, 62.2  $\mu$ mol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (487 mg, 3.53 mmol) in entgaster Dioxan/H<sub>2</sub>O-Lsg. (99:1, 10 mL) gelöst und für 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (3x 15 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0  $\rightarrow$  4:1) aufgereinigt, wodurch ein farbloser-kristalliner Feststoff (370 mg, 1.00 mmol, 84 %) erhalten wurde.

## 9. Experimenteller Teil

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.93 (s, 1H, *H*-11), 8.35 (s, 1H, *H*-9), 8.21-8.11 (m, 2H, *H*-3), 7.96-7.89 (m, 2H, *H*-4) ppm;

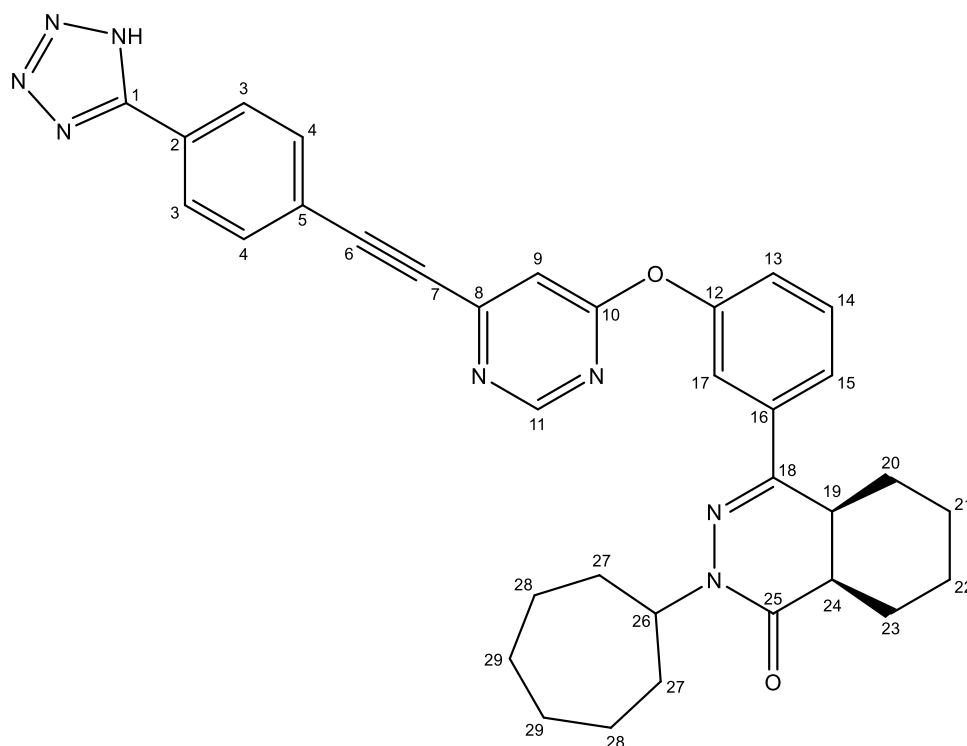
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.5 (C-11), 149.1 (C-10), 134.4 (C-9), 133.2 (C-4), 131.2 (C-8), 127.4 (C-3), 125.1 (C-2), 121.7 (C-5), 94.3 (C-6), 84.9 (C-7) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 6.933 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 374.85 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 374.9850 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 374.9850 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1549, 1492, 723 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((6-((4-(1*H*-tetrazol-5-yl)phenyl)ethynyl)pyrimidin-4-yl)oxy)-phenyl)-2-cycloheptyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-34, KKS-166)**



**KKS-018 (I-35, 101 mg, 294  $\mu$ mol)** wurde mit **KKS-165 (I-64, 100 mg, 267  $\mu$ mol)** und Kaliumcarbonat (85.0 mg, 801  $\mu$ mol) in DMSO (5 mL) gelöst und 2 h bei 80 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 100:0  $\rightarrow$  97:3) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (115 mg, 197  $\mu$ mol, 74 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.86-8.77 (m, 1H, *H*-11), 8.20 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>3,4</sub> = 8.4 Hz, 2H, *H*-3), 7.78-7.69 (m, 3H, *H*-4, *H*-15), 7.68-7.64 (m, 1H, *H*-17), 7.60-7.48 (m, 1H, *H*-14), 7.26-7.19 (m, 1H, *H*-13), 7.19-7.13 (m, 1H, *H*-9), 4.91-4.79 (m, 1H, *H*-26), 3.14-3.02 (m, 1H, *H*-19), 2.75-2.68 (m, 1H, *H*-24), 2.64-2.53 (m, 1H, *H*-20), 2.10-1.19 (m, 19H, *H*-20, *H*-21, *H*-22, *H*-23, *H*-27, *H*-28, *H*-29) ppm;

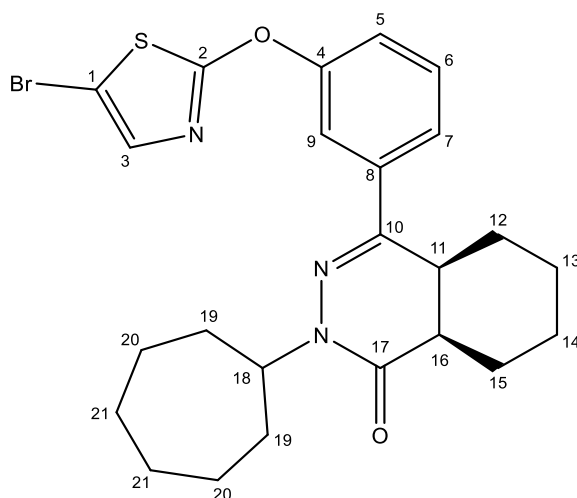
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.6 (C-10), 166.5 (C-25), 158.9 (C-11), 157.0 (C-1), 152.3 (C-12), 151.9 (C-18), 151.5 (C-8), 137.4 (C-16), 133.0 (C-4), 130.0 (C-14), 127.4 (C-3), 126.3 (C-2), 123.5 (C-15), 123.4 (C-5), 122.6 (C-13), 118.7 (C-17), 110.8 (C-9), 92.9 (C-6), 88.0 (C-7), 56.3 (C-26), 36.7 (C-24), 35.6 (C-19), 24.0 (C-23), 33.2, 33.0, 28.3, 28.2, 25.6, 25.0, 24.9, 24.2, 22.0 (C-20, C-21, C-22, C-27, C-28, C-29) ppm;

**LCMS:** *t*<sub>R</sub> = 11.522 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 587.20 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 609.2698 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 609.2967 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1628, 1566, 1392, 1249, 962, 692 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((5-Bromothiazol-2-yl)oxy)phenyl)-2-cycloheptyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-65, KKS-178)**



**KKS-018 (I-35, 462 mg, 1.36 mmol)** wurde mit 2,5-Dibromthiazol (312 mg, 1.27 mmol) und Kaliumcarbonat (256 mg, 1.85 mmol) in DMSO (5 mL) gelöst und 3 h bei 100 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 10 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol

100:0 → 97:3) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (585 mg, 1.16 mmol, 86 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.73 (s, 1H, *H*-9), 7.73 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>6,7</sub> = 7.9 Hz, 1H, *H*-7), 7.48 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>5,6</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>6,7</sub> = 8.0 Hz, 1H, *H*-6), 7.34-7.26 (m, 1H, *H*-5), 7.21 (s, 1H, *H*-3), 4.88-4.79 (m, 1H, *H*-18), 3.11-3.00 (m, 1H, *H*-11), 2.70-2.64 (m, 1H, *H*-16), 2.62-2.54 (m, 1H, *H*-12'), 2.04-1.22 (m, 19H, *H*-12, *H*-13, *H*-14, *H*-15, *H*-19, *H*-20, *H*-21) ppm;

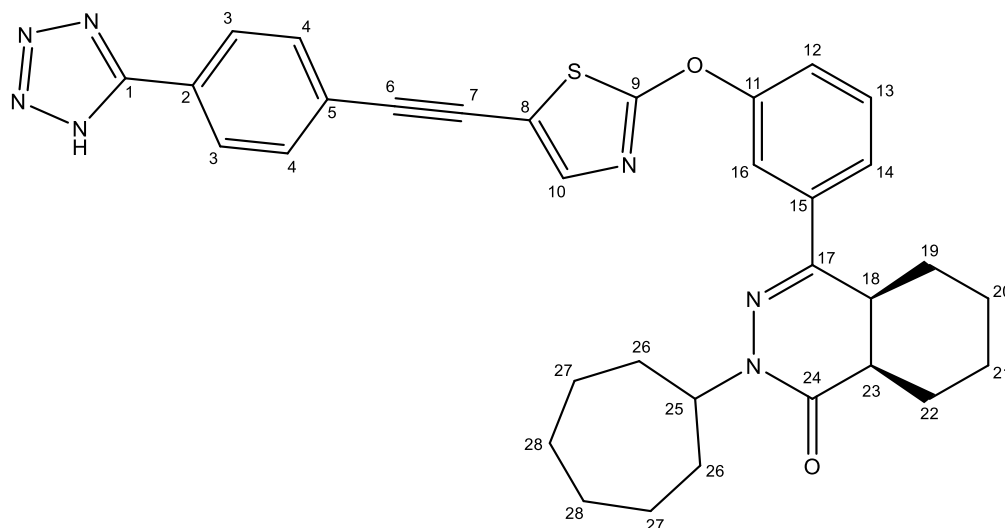
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.7 (C-2), 166.1 (C-17), 155.2 (C-8), 151.1 (C-10), 138.4 (C-3), 137.6 (C-4), 130.1 (C-6), 123.3 (C-7), 120.8 (C-5), 117.2 (C-9), 101.3 (C-1), 56.1 (C-18), 36.7 (C-11), 35.6 (C-16), 33.3, 33.0, 28.4, 28.3, 25.7, 25.0, 24.9, 24.3, 24.0, 22.0 (C-12, C-13, C-14, C-15, C-19, C-20, C-21), ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 13.394 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 504.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 524.0979 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 524.0978 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2923, 2852, 1738, 1514, 1225, 1148, 692 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((5-((4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)ethynyl)thiazol-2-yl)oxy)phenyl)-2-cycloheptyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-33, KKS-189)**



**KKS-178 (I-65**, 50.0 mg, 99.6 μmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit dem **KKS-164 (I-63**, 33.9 mg, 199 μmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2.75 mg, 3.92 μmol), der Kaliumcarbonat (41.3 mg, 300 μmol) und Kupfer(I)iodid (1.00 mg, 5.26 μmol) in entgastem 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O (99:1) gelöst und 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 100:0 → 97:3) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (49.4 mg, 83.5 µmol, 84 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO): δ = 8.13-8.05 (m, 1H, *H*-3), 7.88-7.80 (m, 2H, *H*-14, *H*-16), 7.79-7.72 (m, 3H, *H*-4, *H*-10), 7.64-7.56 (m, 1H, *H*-13), 7.52-7.47 (m, 1H, *H*-12), 4.77-4.69 (m, 1H, *H*-25), 3.34-3.24 (m, 1H, *H*-18), 2.79-2.72 (m, 1H, *H*-23), 2.35-2.27 (m, 1H, *H*-19'), 1.95-1.15 (m, 19H, *H*-19, *H*-20, *H*-21, *H*-22, *H*-26, *H*-27, *H*-28) ppm;

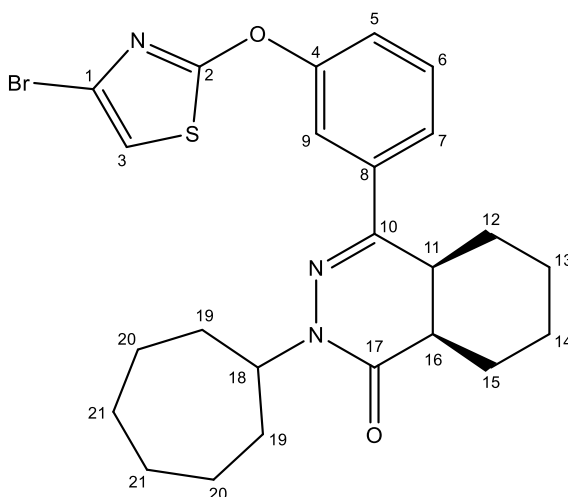
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, DMSO): δ = 172.3 (C-9), 165.8 (C-24), 155.1 (C-1), 155.1 (C-15), 151.3 (C-17), 143.4 (C-10), 137.4 (C-11), 132.1 (C-4), 130.6 (C-13), 127.2 (C-3), 125.0 (C-2), 124.0 (C-5), 123.7 (C-14), 121.1 (C-12), 117.0 (C-16), 111.5 (C-8), 93.8 (C-6), 81.1 (C-7), 54.9 (C-25), 35.7 (C-18), 34.1 (C-23), 32.9, 32.6, 28.1, 28.3, 24.7, 24.4, 24.3, 23.8, 23.3, 21.6 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-26, C-27, C-28), ppm;

**LCMS:** *t<sub>R</sub>* = 12.442 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 590.25 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:** *m/z* = 592.2487 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 592.2489 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1365, 1216, 692, 539 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((4-Bromothiazol-2-yl)oxy)phenyl)-2-cycloheptyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-66, KKS-180)**



**KKS-018 (I-35,** 363 mg, 1.50 mmol) wurde mit 2,4-Dibromthiazol (510 mg, 1.50 mmol) und Kaliumcarbonat (310 mg, 2.25 mmol) in DMSO (5 mL) gelöst und 3 h bei 100 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 10 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 15 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das

## 9. Experimenteller Teil

Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 100:0 → 97:3) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (636 mg, 1.27 mmol, 85 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.78 (s, 1H, *H*-9), 7.70 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>6,7</sub> = 7.8 Hz, 1H, *H*-7), 7.48 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>5,6</sub> = <sup>3</sup>*J*<sub>6,7</sub> = 8.0 Hz, 1H, *H*-6), 7.32 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>5,6</sub> = 8.1 Hz, 1H, *H*-5), 6.79 (s, 1H, *H*-3), 4.91-4.78 (m, 1H, *H*-18), 3.12-3.00 (m, 1H, *H*-11), 2.71-2.65 (m, 1H, *H*-16), 2.61-2.54 (m, 1H, *H*-12'), 2.04-1.31 (m, 19H, *H*-12, *H*-13, *H*-14, *H*-15, *H*-19, *H*-20, *H*-21) ppm;

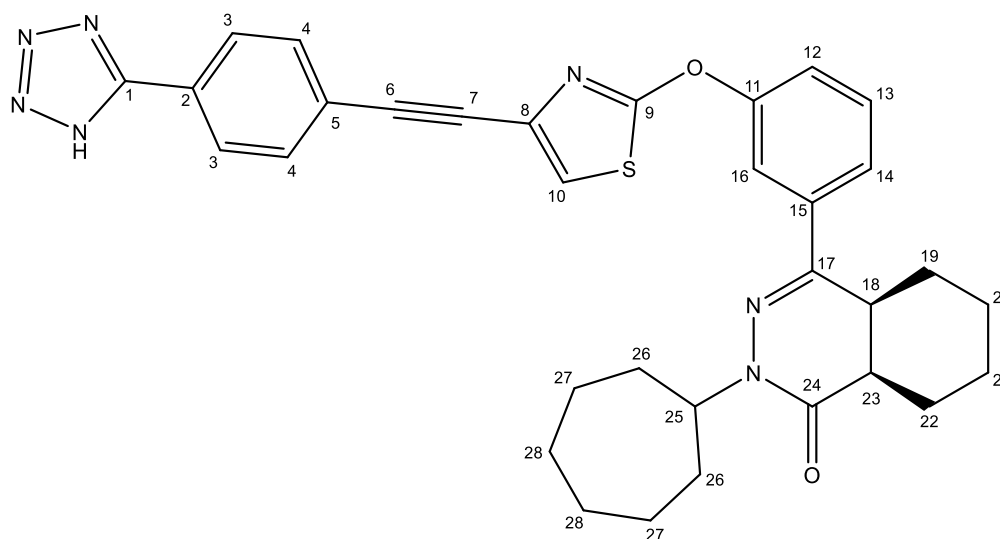
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.7 (C-2), 166.1 (C-17), 155.2 (C-8), 151.1 (C-10), 137.6 (C-4), 130.1 (C-6), 123.3 (C-7), 120.7 (C-5), 119.7 (C-1), 117.2 (C-9), 101.3 (C-3), 56.1 (C-18), 36.7 (C-11), 35.6 (C-16), 33.3, 33.0, 28.3, 28.3, 25.6, 25.0, 25.0, 24.3, 24.0, 21.9 (C-12, C-13, C-14, C-15, C-19, C-20, C-21), ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 12.931 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 504.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 524.0977 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 524.0978 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2927, 1738, 1643, 1466, 1365, 1217, 1079, 692, 619 cm<sup>-1</sup>.

**(4a*S*,8a*R*)-4-(3-((4-((1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)ethynyl)thiazol-2-yl)oxy)phenyl)-2-cycloheptyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydrophthalazin-1(2*H*)-on (I-32, KKS-191)**



**KKS-180 (I-66,** 50.0 mg, 99.6 μmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit dem **KKS-164 (I-63,** 33.9 mg, 199 μmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2.75 mg, 3.92 μmol), der Kaliumcarbonat (41.3 mg, 300 μmol) und Kupfer(I)iodid (1.00 mg, 5.26 μmol) in entgastem 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O (99:1) (1.50 mL) gelöst und 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über

Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 100:0 → 97:3) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (46.1 mg, 77.9  $\mu\text{mol}$ , 78 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.09 (d,  $^3J_{3,4} = ^3J_{13,14} = 8.2$  Hz, 1H, *H*-3), 7.88 (s, 1H, *H*-16), 7.81 (d,  $^3J_{13,14} = 7.9$  Hz, 1H, *H*-14), 7.64 (d,  $^3J_{3,4} = 8.2$  Hz, 2H, *H*-4), 7.72 (m, 1H, *H*-10), 7.64 (t,  $^3J_{12,13} = ^3J_{13,14} = 8.0$  Hz, 1H, *H*-13), 7.48-7.45 (m, 1H, *H*-12), 4.78-4.67 (m, 1H, *H*-25), 3.36-3.28 (m, 1H, *H*-18), 2.80-2.72 (m, 1H, *H*-23), 2.39-2.30 (m, 1H, *H*-19), 1.99-1.09 (m, 19H, *H*-19, *H*-20, *H*-21, *H*-22, *H*-26, *H*-27, *H*-28) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 172.1 (C-9), 165.7 (C-24), 155.1 (C-15), 151.4 (C-17), 137.0 (C-11), 132.3 (C-4), 130.6 (C-13), 130.0 (C-8), 127.2 (C-3), 124.4 (C-2), 123.5 (C-5), 123.5 (C-14), 121.1 (C-12), 120.6 (C-10), 117.0 (C-16), 87.2 (C-6), 86.0 (C-7), 54.9 (C-25), 35.7 (C-18), 34.1 (C-23), 32.9, 32.6, 28.0, 26.3, 24.7, 24.4, 24.3, 23.8, 23.2, 21.6 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-26, C-27, C-28), ppm;

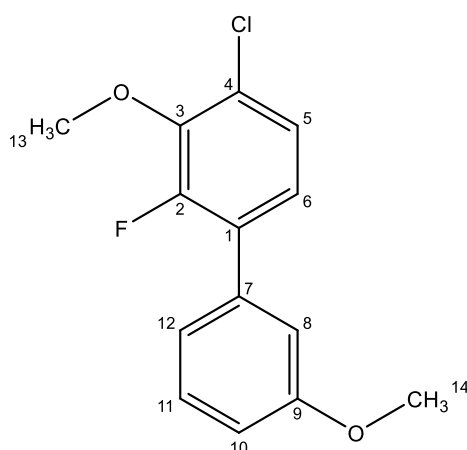
**LCMS:**  $t_{\text{R}} = 12.176$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 590.25  $[\text{M-H}]^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z = 592.2489$   $[\text{M+H}]^+$  (ber.  $m/z = 592.2489$  für  $[\text{M+H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2922, 2853, 1651, 1500, 1481, 1233, 983, 696$   $\text{cm}^{-1}$ .

### 9.2.1.3 Rabbits-Hybride

#### 4-Chloro-2-fluoro-3,3'-dimethoxy-1,1'-biphenyl (I-86, KKS-042)<sup>[103]</sup>



3-Bromanisol (500  $\mu\text{L}$ , 4.01 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-Chloro-2-fluoro-3-methoxyphenylboronsäure (952 mg, 4.66 mmol), PdDPPF (168 mg, 231  $\mu\text{mol}$ ) und Kaliumcarbonat (1.86 g, 13.4 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (4:1, 10 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit

ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0 → 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein oranges Öl (974 mg, 3.65 mmol, 91 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.40 (m, 1H, *H*-11), 7.24 (m, 1H, *H*-5), 7.15-7.10 (m, 2H, *H*-6, *H*-12), 7.08 (s, 1H, *H*-8), 6.97 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>10,11</sub> = 8.3 Hz, 1H, *H*-10), 4.03 (s, 3H, *H*-13), 3.89 (s, 3H, *H*-14) ppm;

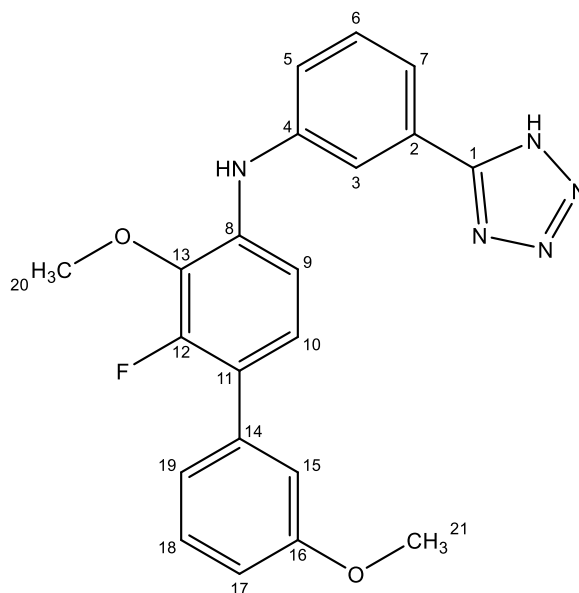
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 159.6 (C-9), 154.3 (C-2), 152.6 (C-4), 144.9 (C-3), 136.0 (C-7), 129.5 (C-11), 127.4 (C-1), 125.1 (C-5), 124.6 (C-6), 121.3 (C-12), 114.6 (C-8), 113.5 (C-10), 61.6 (C-13), 55.3 (C-14) ppm;

**LCMS:** *t*<sub>R</sub> = 10.395 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 251.00 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 267.0583 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 267.0583 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3001, 2939, 1582, 1468, 1407, 1238, 1006, 778, 697 cm<sup>-1</sup>.

***N*-(3-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)-2-fluoro-3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-amin (I-88, KKS-045)**



**KKS-042 (I-86,** 160 mg, 600 μmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit *m*-Tetrazolanilin (126 mg, 780 μmol), Palladiumacetat (4.8 mg, 30.0 μmol), XPhos (28.6 mg, 60 μmol) und Caesiumcarbonat (586 mg, 1.80 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x

20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0 → 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos, kristalliner Feststoff (205 mg, 523  $\mu\text{mol}$ , 87 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 7.83 (s, 1H, *H*-3), 7.54 (m, 1H, *H*-7), 7.47 (t,  $^3J_{5,6} = ^3J_{6,7} = 7.9$  Hz, 1H, *H*-6), 7.39-7.30 (m, 2H, *H*-5, *H*-18), 7.22-7.16 (m, 1H, *H*-10), 7.15-7.04 (m, 3H, *H*-9, *H*-15, *H*-19), 6.91 (d,  $^3J_{17,18} = 8.2$  Hz, 1H, *H*-17), 3.94 (s, 3H, *H*-20), 3.84 (s, 3H, *H*-21) ppm;

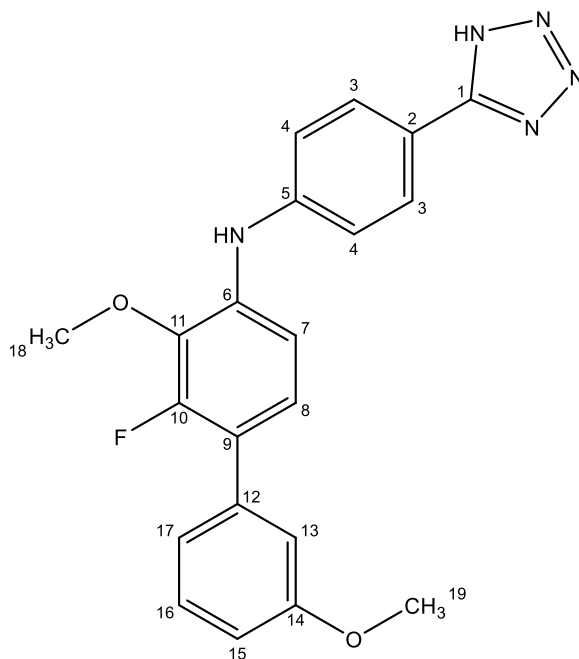
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 161.1 (C-16), 157.5 (C-1), 154.9 (C-12), 145.5 (C-14), 139.4 (C-4), 138.4 (C-13) 138.1 (C-8), 131.3 (C-6), 130.4 (C-18), 126.1 (C-2), 125.7 (C-19), 123.6 (C-11), 122.2 (C-10), 122.1(C-5), 120.3 (C-7), 117.1(C-3), 115.5 (C-9), 115.4 (C-15) 113.6 (C-17), 61.5 (C-20), 55.8 (C-21) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}} = 9.254$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 392.00  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z = 390.1371$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  (ber.  $m/z = 390.1372$  für  $[\text{M}-\text{H}]^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2930, 1586, 1456, 1230, 1041, 993, 740, 682$   $\text{cm}^{-1}$ .

***N*-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)-2-fluoro-3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-amin (I-84, KKS-050)**



**KKS-042 (I-86,** 98.7 mg, 370  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter Ar-Atmosphäre mit *p*-Tetrazolanilin (82.4 mg, 511  $\mu\text{mol}$ ), Palladiumacetat (18.6 mg, 27.6  $\mu\text{mol}$ ), XPhos (26.3 mg, 55.2  $\mu\text{mol}$ ) und Caesiumcarbonat (375 mg, 1.15 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und

für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0 → 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos, kristalliner Feststoff (48.4 mg, 123  $\mu$ mol, 33 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/DMSO 10:1):  $\delta$  = 8.06-8.01 (m, 2H, H-3), 7.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>15,16</sub> = <sup>3</sup>J<sub>16,17</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-16), 7.30-7.24 (m, 2H, H-4), 7.22-7.17 (m, 1H, H-7), 7.13-7.03 (m, 3H, H-8, H-13, H-17), 6.92-6.86 (m, 1H, H-15), 4.00-3.96 (m, 3H, H-18), 3.85 (s, 3H, H-19) ppm;

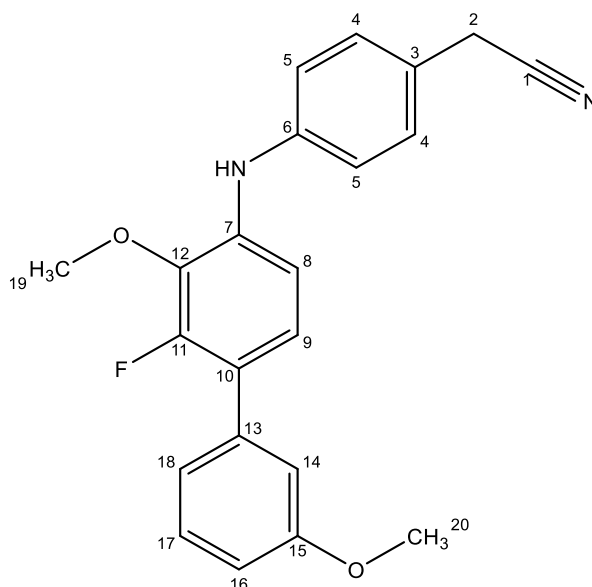
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>/DMSO 10:1):  $\delta$  = 159.5 (C-14), 155.7 (C-1), 153.14 (C-10), 144.7 (C-5), 137.2 (C-11), 136.8 (C-12), 135.5 (C-6), 129.3 (C-16), 128.5 (C-3), 124.3 (C-17), 122.6 (C-9), 121.0 (C-7), 117.7 (C-4), 116.8 (C-2), 114.4 (C-13), 112.7 (C-15), 111.7 (C-8), 61.5 (C-18), 55.3 (C-19) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 9.093 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 392.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** m/z = 414.1342 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. m/z = 414.1337 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2930, 1586, 1456, 1230, 1041, 993, 740, 682 cm<sup>-1</sup>.

**2-(4-((2-Fluoro-3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenyl)acetonitril (I-89, KKS-046)**



**KKS-042 (I-86,** 210 mg, 750  $\mu$ mol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-Aminophenylacetonitril (136 mg, 1.02 mmol), Palladiumacetat (19.6 mg, 55.3  $\mu$ mol),

## 9. Experimenteller Teil

XPhos (42.8 mg, 76.6  $\mu\text{mol}$ ) und Caesiumcarbonat (861 mg, 2.64 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos, kristalliner Feststoff (205 mg, 566  $\mu\text{mol}$ , 75 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.37 (t,  $^3J_{16,17} = ^3J_{17,18} = 8.0$  Hz, 1H, *H*-17), 7.32-7.26 (m, 2H, *H*-4), 7.24-7.19 (m, 2H, *H*-5), 7.16-7.04 (m, 4H, *H*-8, *H*-9, *H*-14, *H*-18), 6.94-6.89 (m, 1H, *H*-16), 4.04-3.98 (m, 3H, *H*-19), 3.88 (s, 3H, *H*-20), 3.74 (s, 2H, *H*-2) ppm;

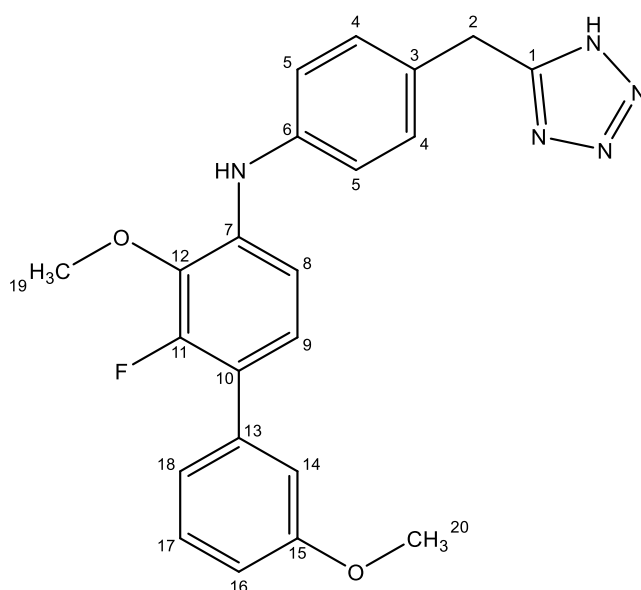
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 159.5 (C-15), 154.3 (C-13), 152.8 (C-11), 141.8 (C-6) 137.4 (C-10), 136.9 (C-12) 136.4 (C-7), 129.4 (C-17), 128.9 (C-4), 124.4 (C-18), 123.0 (C-1), 121.7 (C-9), 121.1 (C-3), 119.6 (C-5), 114.6 (C-8) 112.7 (C-16), 110.4 (C-14), 61.5 (C-19), 55.3 (C-20), 23.2 (C-2) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}} = 10.254$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 363.00  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (95);

**HR-APCI-MS:**  $m/z = 363.1507$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z = 363.1503$  für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3357, 1604, 1515, 1231, 1046, 765, 696$   $\text{cm}^{-1}$ .

***N*-(4-((1*H*-Tetrazol-5-yl)methyl)phenyl)-2-fluoro-3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-amin (I-90, KKS-047)**



**KKS-046 (I-89,** 60.0 mg, 166  $\mu\text{mol}$ ), Natriumazid (53.8 mg, 827  $\mu\text{mol}$ ) und Ammoniumchlorid (43.8 mg, 827  $\mu\text{mol}$ ) wurden unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1.50 mL) gelöst und 12 h bei 130 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 99:1  $\rightarrow$  9:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (49.3 mg, 122  $\mu\text{mol}$ , 73 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 7.36-7.28 (m, 1H, *H*-17), 7.24-7.14 (m, 4H, *H*-4, *H*-5), 7.09-7.00 (m, 4H, *H*-8, *H*-9, *H*-14, *H*-18), 6.91-6.87 (m, 1H, *H*-16), 4.27 (s, 2H, *H*-2), 3.96-3.89 (m, 3H, *H*-19), 3.88-3.76 (m, 3H, *H*-20) ppm;

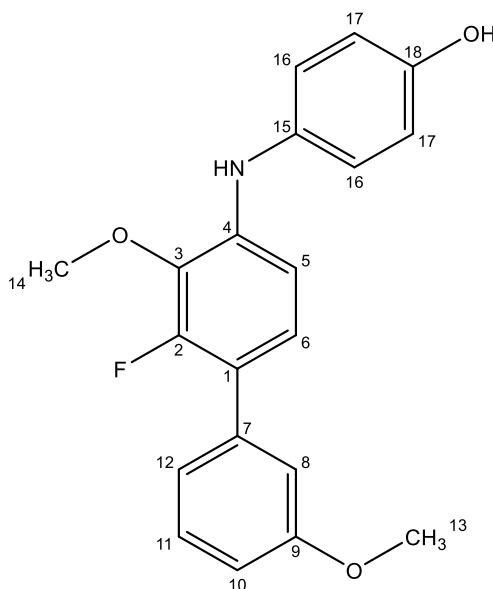
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 161.2 (*C*-15), 157.9 (*C*-1), 156.2 (*C*-13), 153.7 (*C*-11), 143.4 (*C*-6), 139.3 (*C*-10), 138.5 (*C*-12), 138.4 (*C*-7), 130.6 (*C*-5), 130.4 (*C*-17), 129.5 (*C*-3), 125.5 (*C*-18), 122.2 (*C*-9), 120.6 (*C*-4), 115.4 (*C*-8), 113.4 (*C*-16), 112.1 (*C*-14), 61.5 (*C*-19), 55.3 (*C*-20), 23.2 (*C*-2) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 9.047 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 406.00 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 428.1492 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 428.1493 für [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3352, 2988, 1586, 1456, 1229, 1042, 993, 766, 682  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4-((2-Fluoro-3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)amino)phenol (I-87, KKS-056)



**KKS-042 (I-86, 200 mg, 750  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre mit *p*-Aminophenol (106 mg, 975  $\mu$ mol), Palladiumacetat (25.2 mg, 37.5  $\mu$ mol), XPhos (35.7 mg, 75.0  $\mu$ mol) und Caesiumcarbonat (733 mg, 2.25 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos, kristalliner Feststoff (223 mg, 657  $\mu$ mol, 88 %) erhalten.

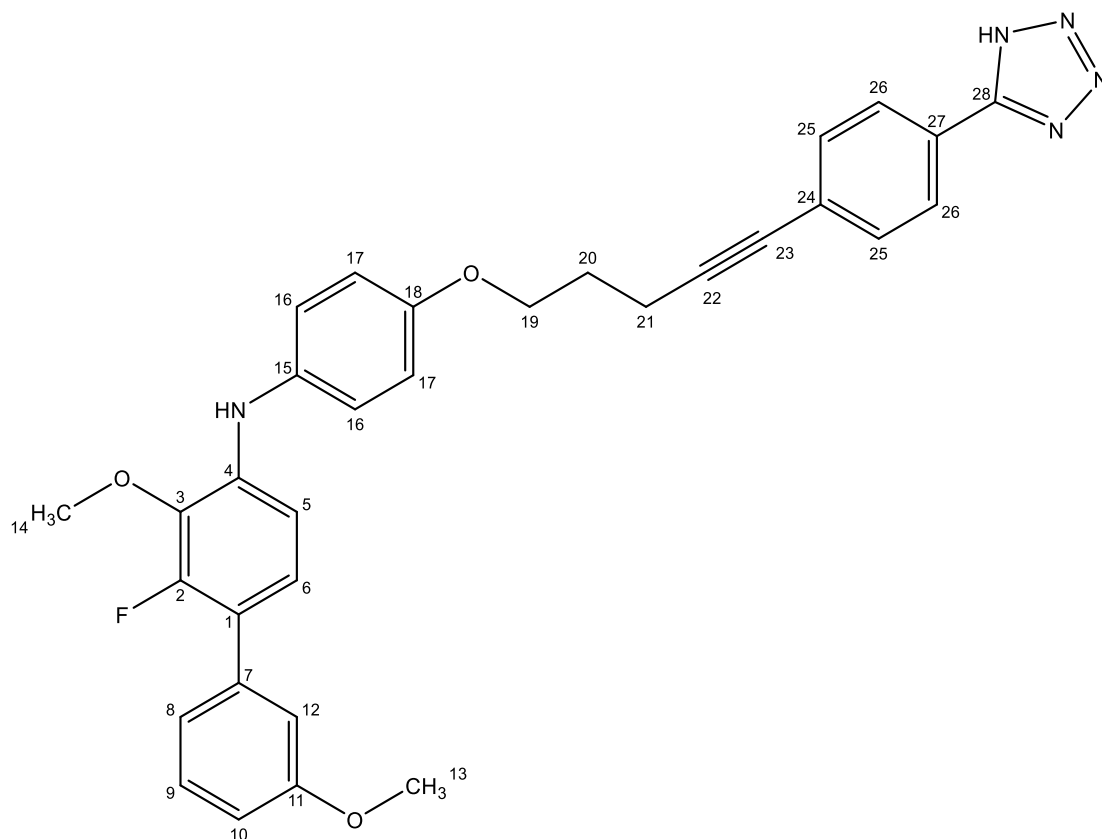
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.33 (t,  $^3J_{10,11} = ^3J_{11,12} = 7.9$  Hz, 1H, *H*-11), 7.13-7.05 (m, 4H, *H*-8, *H*-12, *H*-16), 7.01-6.95 (m, 1H, *H*-6), 6.90-6.80 (m, 4H, *H*-5, *H*-10, *H*-17), 6.10 (s, 1H, *OH*), 4.00 (m, 3H, *H*-14), 3.88 (s, 3H, *H*-13) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 159.5 (*C*-9), 153.2 (*C*-2), 152.0 (*C*-18), 139.5 (*C*-4), 137.4 (*C*-7), 135.2 (*C*-3), 134.3 (*C*-15), 129.4 (*C*-11), 124.5 (*C*-6), 123.9 (*C*-16), 121.2 (*C*-12), 119.9 (*C*-1), 116.2 (*C*-17), 114.4 (*C*-8), 112.5 (*C*-10), 108.2 (*C*-5), 61.2 (*C*-14), 55.3 (*C*-13) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 9.413 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 340.00 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 362.1164 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 362.1163 für [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3360, 2937, 1604, 1509, 1212, 1021, 992, 777, 696  $\text{cm}^{-1}$ .

***N*-4-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)phenyl)-2-fluoro-3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-amin (I-82, KKS-062)**

**KKS-023** (I-36, 97.2 mg, 425  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (104 mg, 468  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (65.7 mg, 537  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (0.10 mL) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF (3 mL) gelöst und unter Ar-Atmosphäre nach 2 h bei RT zu einer Lösung von **KKS-056** (I-87, 97.4 mg, 287  $\mu\text{mol}$ ) und Natriumhydrid (40.0 mg, 1.00 mmol) in trockenem DMF (5.00 mL) gegeben. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C-18 (Acetonitril/Wasser, 95:5  $\rightarrow$  5:95) aufgereinigt. Es wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (62.1 mg, 113  $\mu\text{mol}$ , 39 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/DMSO 10:1):  $\delta$  = 7.99-7.89 (m, 2H, H-26), 7.60-7.49 (m, 2H, H-25), 7.35-7.21 (m, 1H, H-9), 7.19-7.12 (m, 2H, H-16), 7.09-6.81 (m, 7H, H-5, H-6, H-8, H-10, H-12, H-17), 4.16-4.05 (m, 2H, H-19), 4.00 (s, 3H, H-14), 3.88 (s, 3H, H-13) 2.72-2.52 (m, 2H, H-21), 2.13-1.97 (m, 2H, H-20) ppm;

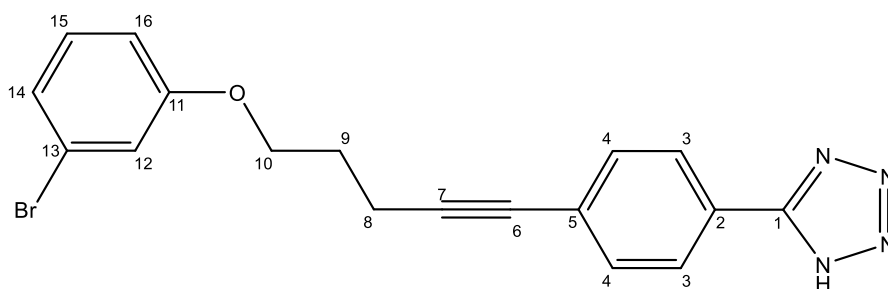
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD/DMSO 10:1):  $\delta$  = 159.4 (C-11), 155.5 (C-28), 154.3 (C-18), 152.8 (C-2), 139.2 (C-4), 136.7 (C-7), 135.0 (C-3), 134.4 (C-15), 131.4 (C-25), 128.4 (C-9), 126.2 (C-24), 126.1 (C-26), 123.6 (C-6), 122.7 (C-27), 122.4 (C-16), 120.1 (C-8), 118.7 (C-1), 114.4 (C-17), 113.4 (C-12), 111.3 (C-10), 107.9 (C-5), 91.2 (C-22), 79.3 (C-23), 65.9 (C-19), 59.6 (C-14), 53.7 (C-13), 27.5 (C-20), 11.8 (C-21) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 11.510 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 550.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 572.2061 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 572.2068 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3391, 2969, 1607, 1508, 1228, 1046, 750, 697 cm<sup>-1</sup>.

#### 5-(4-(5-(3-Bromophenoxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-92, KKS-040)



**KKS-023 (I-36, 298 g, 1.31 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (3.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (326 mg, 1.71  $\mu$ mol), DMAP (149 g, 1.22 mmol) und DIPEA (200  $\mu$ L) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (3x 10 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. 3-Bromphenol (311 mg, 1.80 mmol) wurde in trockenem DMF (3 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (74.2 mg, 1.85  $\mu$ mol) versetzt. Das Tosylat wurde in trockenem DMF (2 mL) gelöst und bei RT zu dem Phenolat zuge tropft. Die Lösung wurde 17 h bei RT gerührt, mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1 → 1:1) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (201 mg, 524  $\mu\text{mol}$ , 40 %) erhalten wurde.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$  10:1):  $\delta$  = 7.97 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-3), 7.44 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-4), 7.08 (t,  $^3J_{14,15}$  =  $^3J_{15,16}$  = 8.0 Hz, 1H, *H*-15), 7.04-6.97 (m, 2H, *H*-12, *H*-16), 6.80 (d,  $^3J_{14,15}$  = 7.9 Hz, 1H, *H*-14), 4.05 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.0 Hz, 2H, *H*-10), 2.59 (t,  $^3J_{8,9}$  = 6.9 Hz, 2H, *H*-8), 2.11 (p,  $^3J_{8,9}$  =  $^3J_{9,10}$  = 6.5 Hz, 1H, *H*-9) ppm;

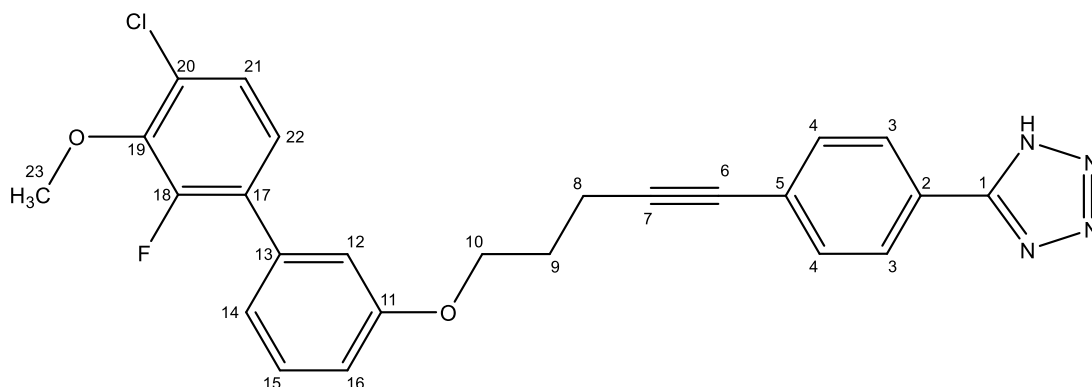
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$  10:1):  $\delta$  = 159.5 (C-11), 131.9 (C-4), 130.3 (C-15), 126.8 (C-3), 126.2 (C-5), 123.6 (C-2), 123.5 (C-12), 122.3 (C-13), 117.6 (C-16), 113.3 (C-14), 91.2 (C-7), 80.4 (C-6), 66.3 (C-10), 28.1 (C-9), 15.9 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 9.945 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 383.00  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 383.0505  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 383.0502 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3388, 2927, 2860, 1564, 1453, 1413, 1239, 699  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(3-((4'-Chloro-2'-fluoro-3'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)prop-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-93, KKS-044)**



**KKS-040 (I-92,** 131.2 mg, 342  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-Chloro-2-fluoro-3-methoxyphenylboronsäure (93.7 mg, 458  $\mu\text{mol}$ ), PdDPPF (17.5 mg, 23.9  $\mu\text{mol}$ ) und Kaliumcarbonat (150 mg, 1.09 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0 → 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (105 mg, 227  $\mu\text{mol}$ , 66 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>4,4</sub> = 8.3 Hz, 2H, H-3), 7.50 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.2 Hz, 2H, H-4), 7.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>14,15</sub> = <sup>3</sup>J<sub>17,18</sub> = 8.2 Hz, 1H, H-15), 7.20-7.14 (m, 1H, H-22), 7.12-7.05 (m, 3H, H-12, H-14, H-21), 6.99-6.92 (m, 1H, H-16), 4.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,9</sub> = 6.0 Hz, 2H, H-8), 3.99 (s, 3H, H-23), 2.68 (t, <sup>3</sup>J<sub>9,10</sub> = 6.9 Hz, 2H, H-10), 2.12 (quint, <sup>3</sup>J<sub>8,9</sub> = 6.0 Hz = <sup>3</sup>J<sub>9,10</sub> = 6.9 Hz, 2H, H-9) ppm;

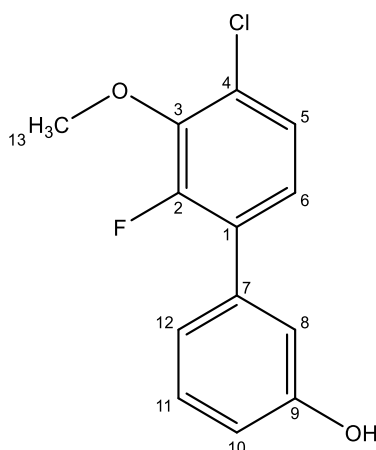
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 159.0 (C-11), 157.1 (C-1), 154.8 (C-18), 152.2 (C-20), 144.7 (C-19), 136.0 (C-13), 132.5 (C-4), 129.5 (C-15), 127.5 (C-17), 127.3 (C-5), 127.2 (C-3), 125.1 (C-22), 124.8 (C-21), 123.0 (C-2) 121.3 (C-14), 115.4 (C-12), 114.4 (C-16), 92.4 (C-7), 80.4 (C-6), 66.9 (C-8), 61.7 (C-23), 28.0 (C-9), 16.6 (C-10) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 11.045 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 463.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:** m/z = 461.1183 [M-H]<sup>-</sup> (ber. m/z = 461.1186 für [M-H]<sup>-</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3357, 2945, 1604, 1515, 1419, 1231, 799, 696 cm<sup>-1</sup>.

#### 4'-chloro-2'-fluoro-3'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-ol (I-94, KKS-052)



3-Bromphenol (600 mg, 3.47 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-Chloro-2-fluoro-3-methoxyphenylboronsäure (850 mg, 4.16 mmol), PdDPPF (145 mg, 200 μmol) und Kaliumcarbonat (1.61 g, 11.6 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0 → 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farbloses Öl (641 mg, 2.53 mmol, 73 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 7.30-7.23 (m, 2H, *H*-5, *H*-11), 7.17-7.12 (m, 1H, *H*-6), 7.00-6.93 (m, 2H, *H*-8, *H*-12), 6.86-6.82 (m, 1H, *H*-10), 3.96 (m, 3H, *H*-13) ppm;

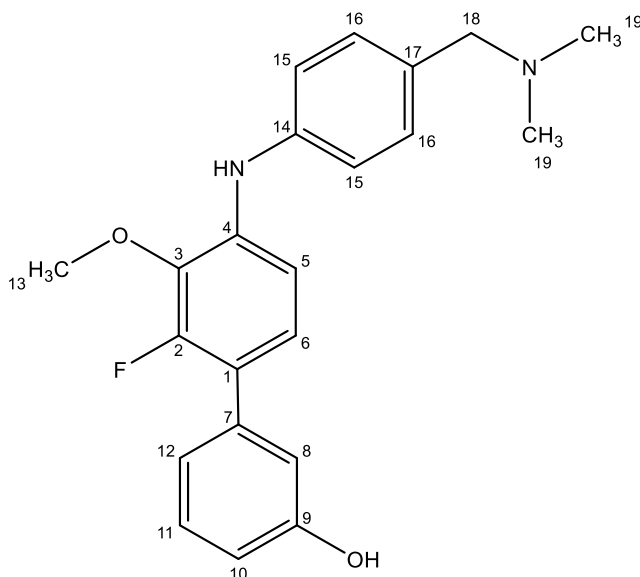
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 158.6 (*C*-9), 154.9 (*C*-2), 146.1 (*C*-3), 137.2 (*C*-7), 131.0 (*C*-1), 130.6 (*C*-11), 128.4 (*C*-4), 126.2 (*C*-6), 126.1 (*C*-5), 121.1 (*C*-12), 116.8 (*C*-8), 116.1 (*C*-10), 62.0 (*C*-13) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 8.694 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 252.95 [M+H]<sup>+</sup> (8.48);

**HR-APCI-MS:** *m/z* = 252.0348 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 252.0348 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3392, 2516, 1596, 1319, 1244, 997, 790, 688 cm<sup>-1</sup>.

**4'-((4-((Dimethylamino)methyl)phenyl)amino)-2'-fluoro-3'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-ol (I-95, KKS-053)**



**KKS-052 (I-94, 276 mg, 1.09 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre mit 4-((Dimethylamino)methyl)anilin (213 mg, 1.42 mmol), XPhos (52.1 mg, 54.6 μmol), Palladiumacetat (36.8 mg, 54.6 μmol) und Caesiumcarbonat (1.07 g, 3.28 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Ethanol, 1:0 → 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos, kristalliner Feststoff (385 mg, 1.05 mmol, 96 %) erhalten.

## 9. Experimenteller Teil

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.32-7.24 (m, 3H, *H*-11, *H*-16), 7.14-7.07 (m, 2H, *H*-15), 7.06-6.92 (m, 3H, *H*-5, *H*-6, *H*-12), 6.89-6.86 (m, 1H, *H*-8), 6.84-6.79 (m, 1H, *H*-10), 6.29 (s, 1H, *NH*), 5.33 (s, 1H, *OH*), 3.96 (m, 3H, *H*-13), 3.50 (s, 2H, *H*-18), 2.35 (s, 6H, *H*-19) ppm;

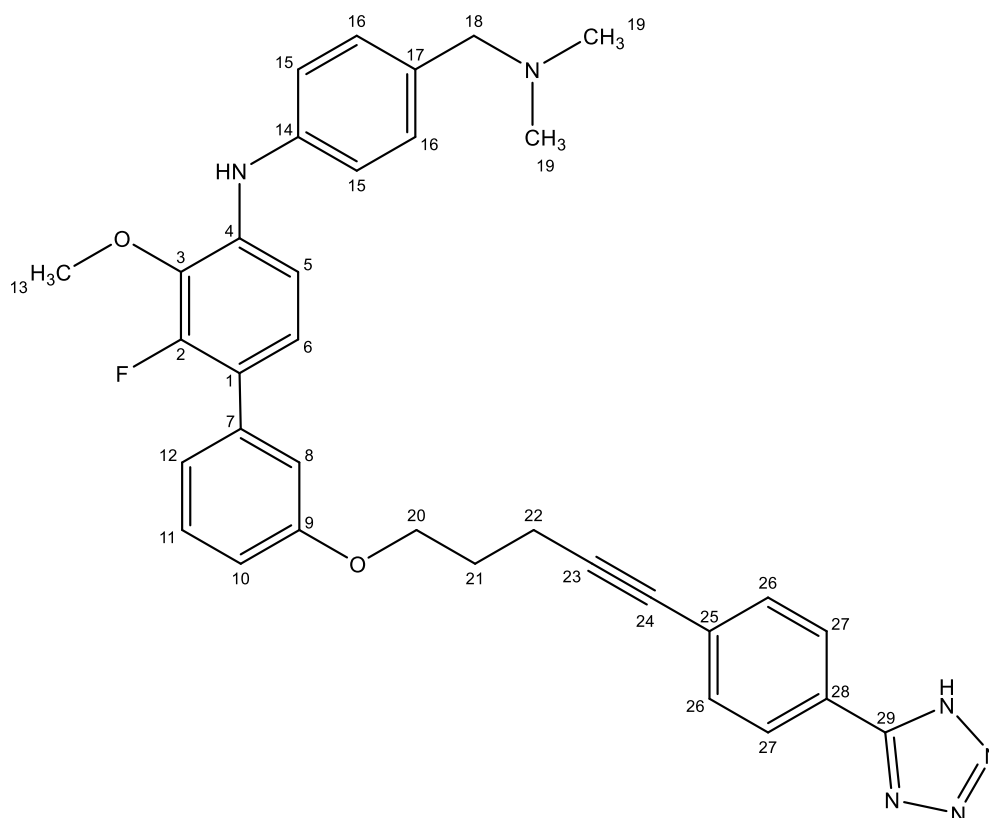
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 156.7 (C-9), 153.2 (C-2), 140.1 (C-14), 137.1 (C-7), 136.0 (C-3), 130.8 (C-16), 130.7 (C-4), 129.5 (C-11), 124.3 (C-6), 121.0 (C-1), 120.1 (C-12), 119.0 (C-15), 118.9 (C-17), 116.0 (C-8), 114.4 (C-10), 109.5 (C-5), 63.5 (C-18), 61.2 (C-13), 44.7 (C-19) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 6.294 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 322.00 [M-C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:** *m/z* = 367.1814 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 367.1816 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3377, 2940, 1605, 1516, 1275, 995, 764, 698 cm<sup>-1</sup>.

**3'-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-yn-1-yl)oxy)-*N*-(4-((dimethylamino)methyl)phenyl)-2-fluoro-3-methoxy-[1,1'-biphenyl]-4-amin (I-83, KKS-051)**



**KKS-023 (KKS-023,** 140 mg, 614 μmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (120 mg, 634 μmol) und DMAP (150 mg, 1.22 mmol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit

Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF (3 mL) gelöst und unter Ar-Atmosphäre nach 2 h bei RT zu einer Lösung von **KKS-053 (I-95)**, 150 mg, 409  $\mu\text{mol}$ ) und Natriumhydrid (21.3 mg, 532  $\mu\text{mol}$ ) in trockenem DMF (5.00 mL) gegeben. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C-18 (Acetonitril/Wasser, 95:5  $\rightarrow$  5:95) aufgereinigt. Es wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (126 mg, 219  $\mu\text{mol}$ , 54 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$** : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.00-7.94 (m, 2H, *H*-27), 7.48-7.442 (m, 2H, *H*-26), 7.35-7.26 (m, 3H, *H*-11, *H*-16), 7.14-7.01 (m, 5H, *H*-8, *H*-12, *H*-5, *H*-15), 7.01-6.96 (m, 1H, *H*-6), 6.91-6.83 (m, 1H, *H*-10), 4.19-4.14 (m, 2H, *H*-20), 4.08 (s, 2H, *H*-18), 2.75 (s, 6H, *H*-19) 2.66-2.59 (m, 2H, *H*-22), 2.13-1.99 (m, 2H, *H*-21) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$** : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 158.8 (C-9), 155.7 (C-29), 152.9 (C-2), 143.8 (C-14), 137.0 (C-3), 135.8 (C-4), 132.0 (C-15), 132.0 (C-26), 129.2 (C-11), 126.9 (C-27), 126.3 (C-25), 124.1 (C-6), 123.5 (C-28), 122.2 (C-1), 121.3 (C-12), 120.7 (C-17), 117.9 (C-16), 114.8 (C-8), 113.6 (C-10), 111.0 (C-5), 91.5 (C-23), 80.9 (C-24), 66.3 (C-20), 61.2 (C-13), 60.6 (C-18), 41.6 (C-19), 28.0 (C-21), 16.1 (C-22) ppm;

**LCMS**:  $t_{\text{R}}$  = 8.945 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 577.00  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (92.77);

**HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 577.2721  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 577.2722 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR)**:  $\tilde{\nu}$  = 3377, 2940, 1605, 1516, 1275, 995, 764, 698  $\text{cm}^{-1}$ .

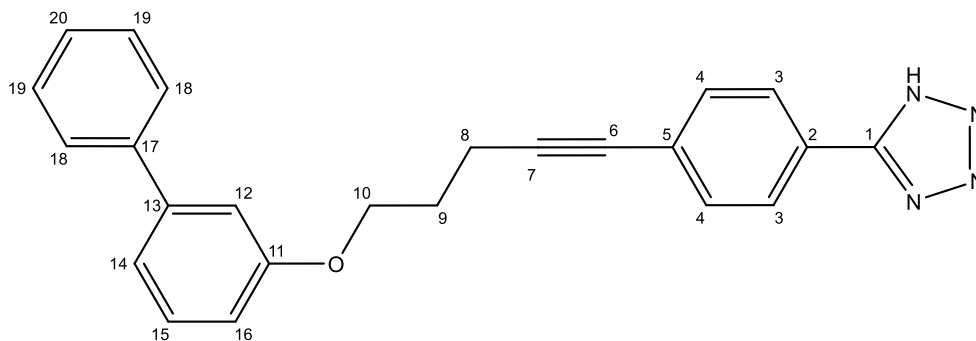
#### 9.2.1.4 Biphenylbibliothek

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Suzuki-Kupplung der Biphenyl-Bibliothek:

Das Bromid **KKS-040 (I-92)**, 200-300  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre mit der entsprechenden Boronsäure (300-450  $\mu\text{mol}$ , 1.5 Äq.), PdDPPF (24.0  $\mu\text{mol}$ , 0.07 Äq.) und Kaliumcarbonat (600-900  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq.) in entgastem 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und für 2 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, über Celite filtriert und danach mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (1x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über

Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an einer präparativen C18-HPLC (Wasser/Acetonitril, 95:5 → 5:95) aufgereinigt.

**5-(4-(5-([1,1'-Biphenyl]-3-yloxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1-tetrazol (I-96, KKS-075)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (41.2 mg, 108  $\mu$ mol, 52 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.01 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-3), 7.69-7.63 (m, 2H, *H*-18), 7.61 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-4), 7.48-7.33 (m, 4H, *H*-15, *H*-19, *H*-20), 7.26-7.16 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.01-6.93 (m, 1H, *H*-16), 4.20 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-10), 2.67 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.04 (quint,  $^3J_{8,9} = ^3J_{9,10} = 6.6$  Hz, 2H, *H*-9) ppm;

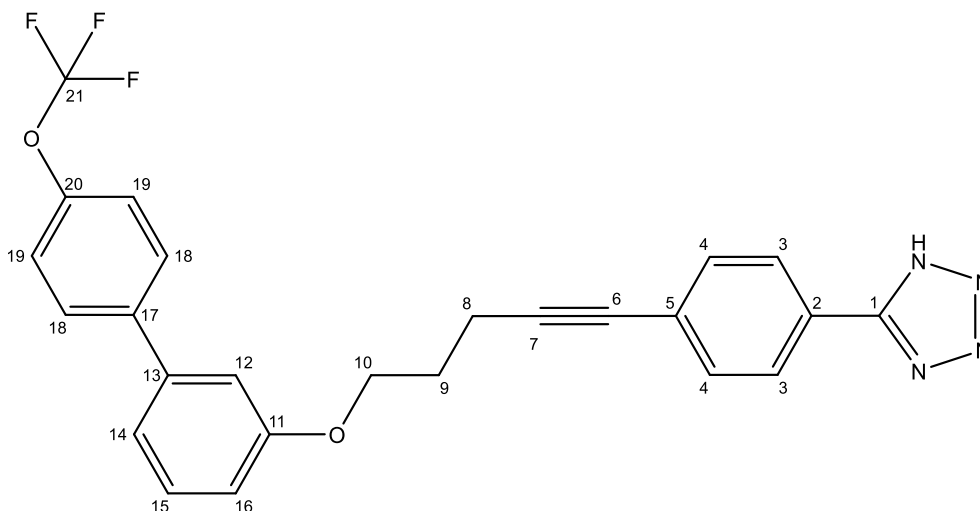
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.9 (C-11), 155.3 (C-1), 141.6 (C-13), 139.9 (C-17), 132.1 (C-4), 130.0 (C-15), 128.8 (C-19), 127.4 (C-20), 127.0 (C-3), 126.7 (C-18), 125.6 (C-5), 123.6 (C-2), 119.0 (C-14), 113.5 (C-16), 112.7 (C-12), 92.4 (C-7), 80.2 (C-6), 66.1 (C-10), 27.8 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.336 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 381.10 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 379.1567 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  (ber.  $m/z$  = 379.1564 für [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1609, 1596, 1484, 1294, 942, 753  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((4'-(Trifluoromethoxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-109, KKS-069)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (92.4 mg, 198  $\mu\text{mol}$ , 76 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.01 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-3), 7.78 (d,  $^3J_{18,19}$  = 8.7 Hz, 2H, *H*-18), 7.61 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-4), 7.43-7.35 (m, 3H, *H*-15, *H*-19), 7.26-7.21 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.04-6.97 (m, 1H, *H*-16), 4.22 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-10), 2.68 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.05 (quint,  $^3J_{8,9} = ^3J_{9,10} = 6.6$  Hz, 2H, *H*-9) ppm;

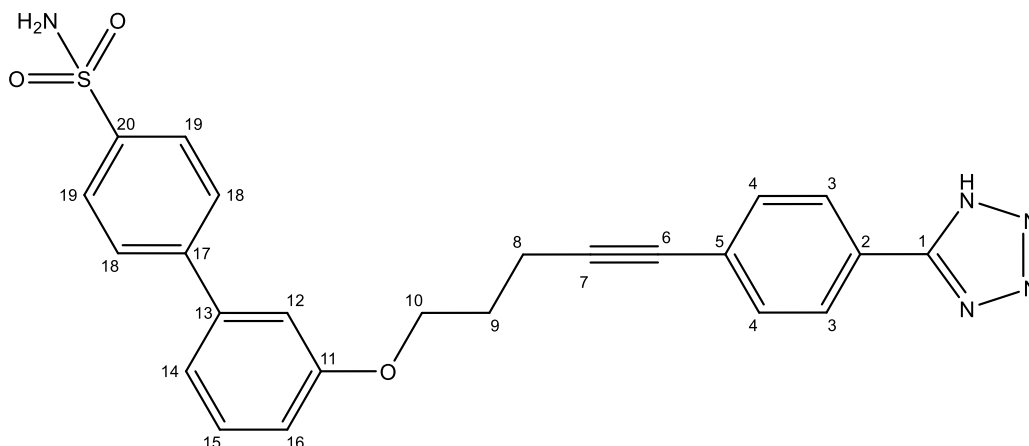
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.0 (C-11), 155.1 (C-1), 147.9 (C-20), 140.2 (C-13), 139.3 (C-17), 132.3 (C-4), 130.1 (C-15), 128.7 (C-18), 127.0 (C-3), 127.3 (C-5), 123.5 (C-2), 121.3 (C-19), 120.8 (C-21), 119.2 (C-14), 114.1 (C-16), 113.0 (C-12), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.2 (C-10), 27.8 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 11.227 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 465.05 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 487.1354 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 487.1352 für [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2920, 2702, 1610, 1573, 1481, 1296, 750  $\text{cm}^{-1}$ .

**3'-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-4-sulfonamid  
(I-113, KKS-070)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (84.3 mg, 183  $\mu$ mol, 61 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.00 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-3), 7.91-7.84 (m, 4H, *H*-18, *H*-19), 7.61 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-4), 7.44-7.37 (m, 3H, *H*-15, *NH*<sub>2</sub>), 7.33-7.26 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.07-7.01 (m, 1H, *H*-16), 4.22 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-10), 2.68 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.05 (quint,  $^3J_{8,9} = ^3J_{9,10} = 6.5$  Hz, 2H, *H*-9) ppm;

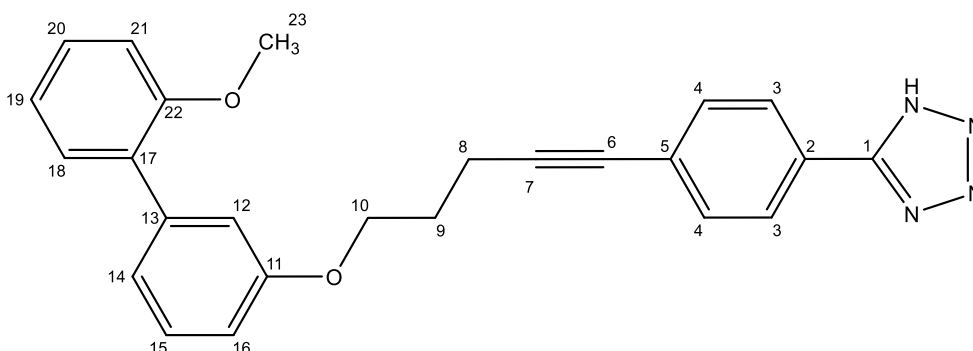
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.1 (C-11), 143.2 (C-20), 143.0 (C-17), 140.2 (C-13), 132.2 (C-4), 130.2 (C-15), 127.2, 126.2 (C-18, C-19), 127.1 (C-3), 125.9 (C-5), 123.3 (C-2), 119.4 (C-14), 114.4 (C-16), 113.2 (C-12), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.2 (C-10), 27.8 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:** *t*<sub>R</sub> = 8.371 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 460.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 460.1439 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 460.1438 für [M+H]<sup>+</sup>).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3273, 3019, 1593, 1566, 1483, 1284, 912, 759 cm<sup>-1</sup>.

**5-(4-(5-((2'-Methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1*H*-tetrazol  
(I-106, KKS-092)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (30.6 mg, 74.5  $\mu\text{mol}$ , 42 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.00 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.4 Hz, 2H, *H-3*), 7.60 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.4 Hz, 2H, *H-4*), 7.36-7.26 (m, 3H, *H-15*, *H-19*, *H-21*), 7.12-6.96 (m, 4H, *H-12*, *H-14*, *H-18*, *H-20*), 6.96-6.82 (m, 1H, *H-16*), 4.15 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H-10*), 3.75 (s, 3H, *H-23*), 2.66 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H-8*), 2.09-1.94 (m, 2H, *H-9*) ppm;

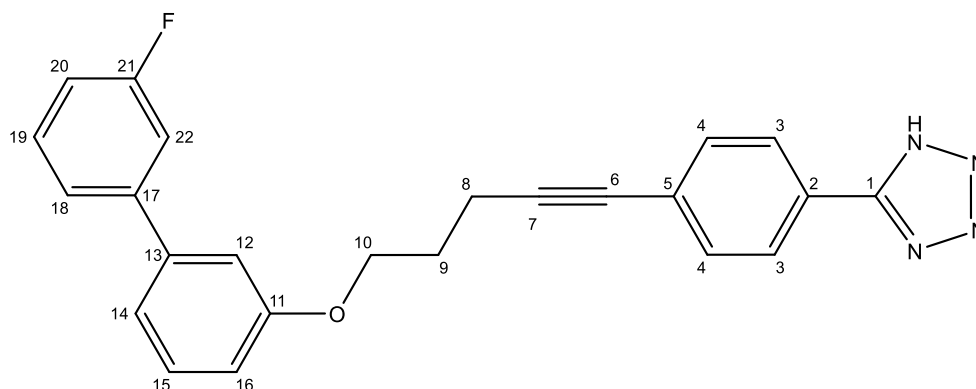
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.1 (C-11), 156.1 (C-22), 155.3 (C-1), 139.6 (C-13), 132.2 (C-4), 130.3 (C-17), 129.6 (C-15), 129.0, 128.9 (C-19, C-21), 127.0 (C-3), 125.8 (C-5), 123.5 (C-2), 121.7, 120.7 (C-18, C-20), 115.5 (C-14), 112.9 (C-16), 111.7 (C-12), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.0 (C-10), 55.4 (C-23), 27.8 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.213 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 409.10 [ $\text{M-H}$ ]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 411.1814 [ $\text{M+H}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 411.1816 für [ $\text{M+H}$ ]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1609, 1596, 1484, 1294, 942, 753  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((3'-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1*H*-tetrazol (I-101, KKS-100)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (46.7 mg, 117  $\mu\text{mol}$ , 56 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.04-7.98 (m, 2H, *H-3*), 7.65-7.59 (m, 2H, *H-4*), 7.55-7.44 (m, 3H, *H-18*, *H-19*, *H-22*), 7.43-7.35 (m, 1H, *H-15*), 7.30-7.25 (m, 2H, *H-12*, *H-14*), 7.22-7.16 (m, 1H, *H-20*), 7.04-6.98 (m, 1H, *H-16*), 4.25-4.11 (m, 2H, *H-10*), 2.75-2.60 (m, 2H, *H-8*), 2.14-2.00 (m, 2H, *H-9*) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 162.6 (C-21), 159.0 (C-11), 155.3 (C-1), 142.5 (C-17), 140.3 (C-13), 132.2 (C-4), 130.7 (C-19), 130.1 (C-15), 127.1 (C-3), 125.8 (C-5), 123.6 (C-

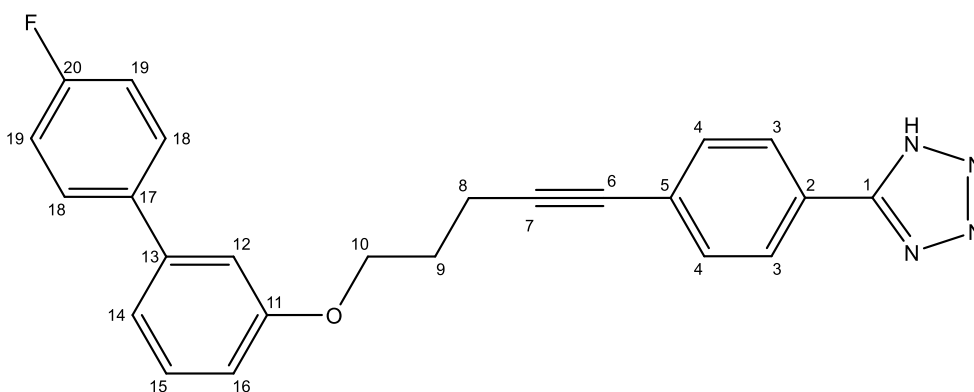
2), 122.8 (C-18), 119.2 (C-14), 114.3 (C-16), 114.1 (C-20), 113.5 (C-22), 112.9 (C-12), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.2 (C-10), 27.8 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 10.459 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 397.05 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 421.1435 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 421.1435 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1609, 1573, 1470, 1266, 960, 749 cm<sup>-1</sup>.

**5-(4-(5-((4'-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-100, KKS-077)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (56.7 mg, 142  $\mu$ mol, 68 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.06-7.94 (m, 2H, H-3), 7.76-7.67 (m, 2H, H-18), 7.65-7.57 (m, 2H, H-4), 7.42-7.34 (m, 1H, H-15), 7.30-7.24 (m, 2H, H-19), 7.23-7.18 (m, 2H, H-12, H-14), 7.01-6.94 (m, 1H, H-16), 4.21 (t, <sup>3</sup>J<sub>9,10</sub> = 6.0 Hz, 2H, H-10), 2.68 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,9</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-8), 2.05 (quint, <sup>3</sup>J<sub>8,9</sub> = <sup>3</sup>J<sub>9,10</sub> = 6.4 Hz, 2H, H-9) ppm;

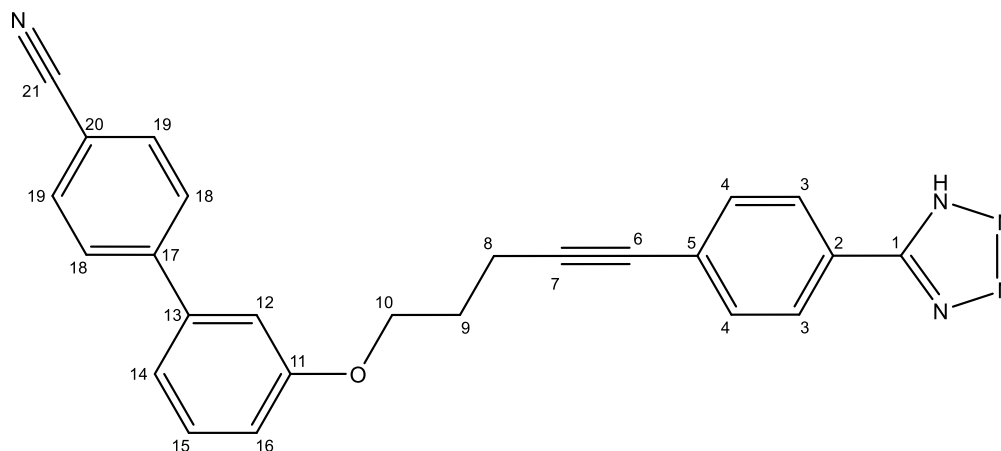
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 161.8 (C-20), 158.9 (C-11), 155.6 (C-1), 140.6 (C-13), 136.4 (C-17), 132.1 (C-4), 130.0 (C-15), 128.7 (C-19), 126.9 (C-3), 125.6 (C-5), 123.7 (C-2), 119.0 (C-14), 115.5 (C-18), 113.5 (C-16), 112.9 (C-12), 92.3 (C-7), 80.2 (C-6), 66.1 (C-10), 27.8 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 10.436 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 399.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 399.1618 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 399.1616 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2922, 1599, 1574, 1481, 1297, 981, 751 cm<sup>-1</sup>.

**3'-((5-(4-(1H-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-4-carbonitril  
(I-112, KKS-091)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (31.7 mg, 78.2  $\mu\text{mol}$ , 41 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.01 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.0 Hz, 2H, *H*-3), 7.92-7.85 (m, 4H, *H*-18, *H*-19), 7.61 (d,  $^3J_{3,4}$  = 7.8 Hz, 2H, *H*-4), 7.47-7.40 (m, 1H, *H*-15), 7.34-7.28 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.11-7.02 (m, 1H, *H*-16), 4.23 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.0 Hz, 2H, *H*-10), 2.68 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.10-1.99 (m, 2H, *H*-9) ppm;

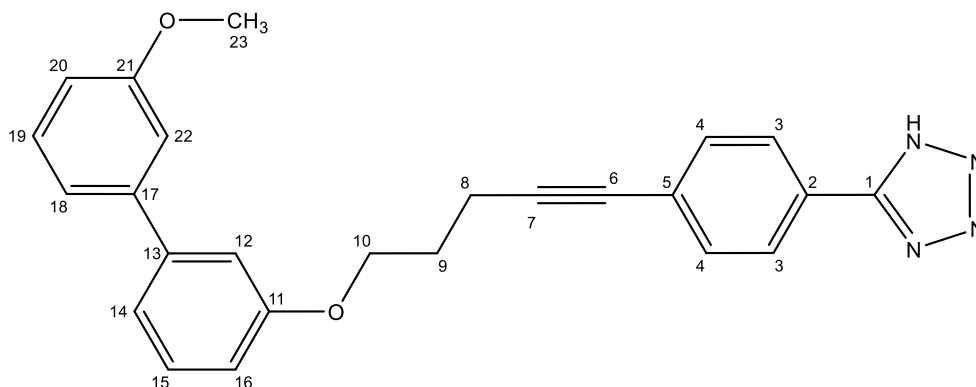
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.1 (C-11), 154.4 (C-1), 144.4 (C-17), 139.7 (C-13), 132.7, 127.6 (C-18, C-19), 132.2 (C-4), 130.3 (C-15), 127.0 (C-3), 125.7 (C-5), 123.5 (C-2), 119.4 (C-21), 118.7 (C-14), 114.9 (C-16), 113.1 (C-12), 110.1 (C-20), 92.4 (C-7), 80.2 (C-6), 66.2 (C-10), 27.8 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 9.928 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 404.10  $[\text{M-H}]^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 406.1663  $[\text{M+H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 406.1662 für  $[\text{M+H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1603, 1392, 1295, 1158, 954, 776  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((3'-Methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-105, KKS-099)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (53.5 mg, 130  $\mu$ mol, 62 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.06-7.94 (m, 2H, *H*-3), 7.60-7.55 (m, 2H, *H*-4), 7.42-7.32 (m, 2H, *H*-15, *H*-19), 7.28-7.13 (m, 4H, *H*-12, *H*-14, *H*-18, *H*-22), 7.03-6.88 (m, 2H, *H*-16, *H*-20), 4.25-4.18 (m, 2H, *H*-10), 3.82 (s, 3H, *H*-23), 2.77-2.63 (m, 2H, *H*-8), 2.12-1.87 (m, 2H, *H*-9) ppm;

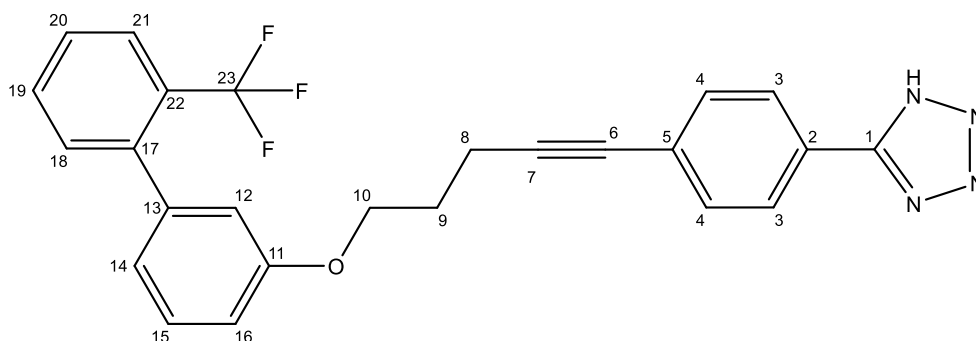
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.6 (C-21), 158.9 (C-11), 155.0 (C-1), 141.6, 141.5 (C-13, C-17), 132.1 (C-4), 129.9, 129.8 (C-15, C-19), 127.0 (C-3), 125.8 (C-5), 123.5 (C-2), 119.1, 119.0 (C-14, C-22), 113.6, 113.0, 112.9, 112.3 (C-12, C-16, C-18, C-20), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.1 (C-10), 55.0 (C-23), 27.8 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.279 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 409.10 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 433.1635 [ $\text{M+Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 433.1635 für [ $\text{M+Na}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1596, 1572, 1472, 1230, 1023, 969, 773  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((2'-Trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-108, KKS-093)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (35.0 mg, 78.1  $\mu\text{mol}$ , 42 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.04-7.96 (m, 2H, *H*-3), 7.87-7.78 (m, 1H, *H*-21), 7.76-7.66 (m, 1H, *H*-19), 7.66-7.53 (m, 3H, *H*-4, *H*-20), 7.47-7.28 (m, 2H, *H*-15, *H*-18), 7.10-6.97 (m, 1H, *H*-14), 6.99-6.92 (m, 2H, *H*-12, *H*-16), 4.24-4.03 (m, 2H, *H*-10), 2.72-2.61 (m, 2H, *H*-8), 2.11-1.97 (m, 2H, *H*-9) ppm;

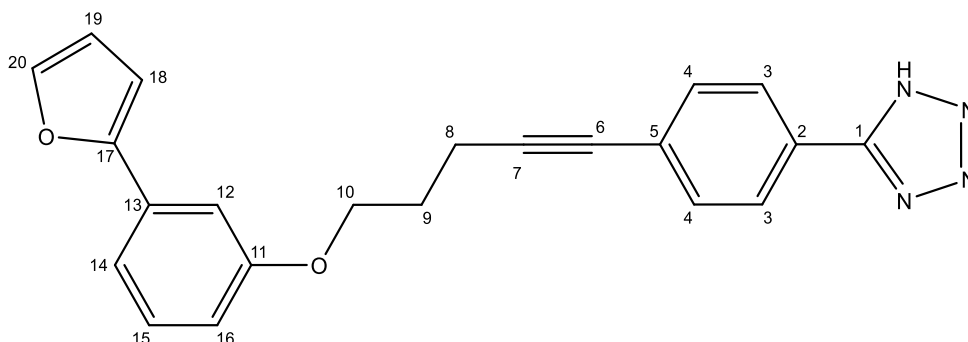
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 157.8 (C-11), 154.0 (C-1), 140.6 (C-13), 140.5 (C-17), 132.2 (C-19), 132.2 (C-4), 132.0 (C-18), 129.1 (C-15), 128.1 (C-20), 127.0 (C-3), 126.7 (C-21), 126.0 (C-22), 125.7 (C-5), 125.5 (C-23), 123.5 (C-2), 121.1 (C-14), 114.9 (C-16), 113.9 (C-12), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.1 (C-10), 27.7 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.721 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 447.10 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 449.1584 [ $\text{M+Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 449.1584 für [ $\text{M+Na}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1610, 1472, 1391, 1239, 942, 750  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 5-(4-(5-(3-(Furan-2-yl)phenoxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1*H*-tetrazol (I-98, KKS-081)



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (26.5 mg, 71.5  $\mu\text{mol}$ , 34 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.07-7.97 (m, 2H, *H*-3), 7.76-7.67 (m, 1H, *H*-20), 7.66-7.53 (m, 2H, *H*-4), 7.38-7.32 (m, 1H, *H*-15), 7.32-7.26 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 6.99-6.94 (m, 1H, *H*-18), 6.93-6.89 (m, 1H, *H*-16), 6.63-6.55 (m, 1H, *H*-19), 4.22-4.16 (m, 2H, *H*-10), 2.72-2.64 (m, 2H, *H*-8), 2.13-1.97 (m, 2H, *H*-9) ppm;

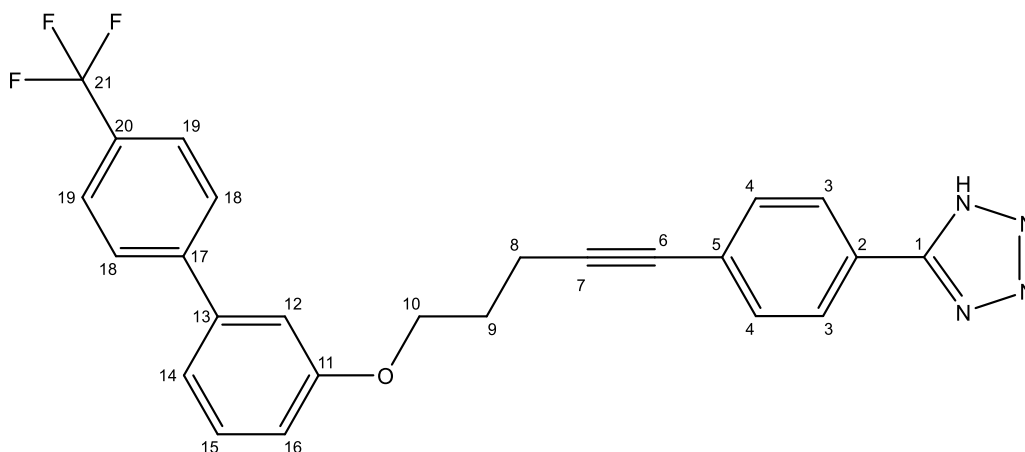
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.8 (C-11), 155.3 (C-1), 152.7 (C-17), 142.8 (C-20), 132.1 (C-4), 131.6 (C-13), 129.9 (C-15), 127.0 (C-3), 125.5 (C-5), 123.9 (C-2), 115.8 (C-14), 113.6 (C-16), 112.0 (C-19), 109.3 (C-12), 106.1 (C-18), 92.3 (C-7), 80.2 (C-6), 66.1 (C-10), 27.7 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 9.855 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 369.05 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z = 369.1357$   $[M-H]^-$  (ber.  $m/z = 369.1357$  für  $[M-H]^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2869, 1610, 1488, 1293, 1227, 913, 748$   $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((4'-(Trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-107, KKS-086)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (32.9 mg, 73.4  $\mu\text{mol}$ , 35 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta = 8.06\text{-}7.97$  (m, 2H,  $H\text{-}3$ ),  $7.93\text{-}7.87$  (m, 2H,  $H\text{-}18$ ),  $7.81\text{-}7.74$  (m, 2H,  $H\text{-}19$ ),  $7.64\text{-}7.58$  (m, 2H,  $H\text{-}4$ ),  $7.48\text{-}7.41$  (m, 1H,  $H\text{-}15$ ),  $7.30\text{-}7.26$  (m, 2H,  $H\text{-}12$ ,  $H\text{-}14$ ),  $7.10\text{-}7.01$  (m, 1H,  $H\text{-}16$ ),  $4.31\text{-}4.18$  (m, 2H,  $H\text{-}10$ ),  $2.73\text{-}2.59$  (m, 2H,  $H\text{-}8$ ),  $2.15\text{-}1.88$  (m, 2H,  $H\text{-}9$ ) ppm;

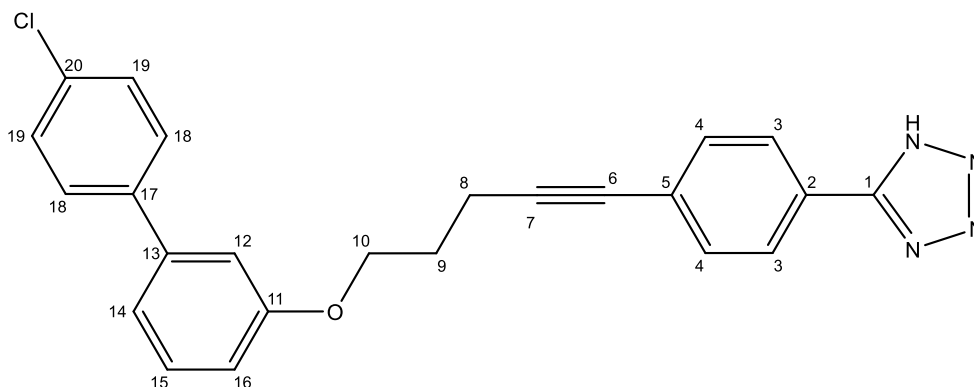
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta = 159.0$  (C-11),  $155.2$  (C-1),  $144.1$  (C-13),  $140.0$  (C-17),  $132.1$  (C-4),  $130.1$  (C-15),  $127.9$  (C-20),  $127.5$  (C-18),  $127.0$  (C-3),  $125.5$  (C-19),  $125.4$  (C-5),  $123.8$  (C-2),  $123.3$  (C-21),  $119.3$  (C-14),  $114.5$  (C-16),  $113.1$  (C-12),  $92.2$  (C-7),  $80.2$  (C-6),  $66.2$  (C-10),  $27.7$  (C-9),  $15.5$  (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}} = 11.108$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) =  $447.10$   $[M-H]^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z = 447.1438$   $[M-H]^-$  (ber.  $m/z = 447.1438$  für  $[M-H]^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2929, 1612, 1486, 1323, 1205, 838, 720$   $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((4'-Chloro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-99, KKS-082)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (37.6 mg, 90.6  $\mu\text{mol}$ , 43 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.06-7.97 (m, 2H, *H*-3), 7.70 (d,  $^3J_{18,19}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-18), 7.61 (d,  $^3J_{3,4}$  = 7.9 Hz, 2H, *H*-4), 7.49 (d,  $^3J_{18,19}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-19), 7.39 (t,  $^3J_{14,15}$  =  $^3J_{15,16}$  = 8.0 Hz, 1H, *H*-15), 7.27-7.21 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.02-6.96 (m, 1H, *H*-16), 4.22 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-10), 2.68 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.12 (quint,  $^3J_{8,9}$  =  $^3J_{9,10}$  = 6.4 Hz, 2H, *H*-10) ppm;

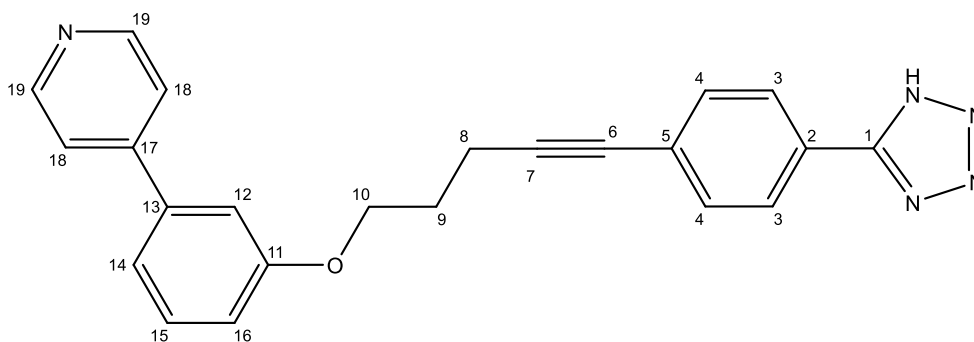
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.9 (C-11), 155.1 (C-1), 140.2 (C-13), 138.7 (C-17), 132.3 (C-20), 132.1 (C-4), 130.0 (C-15), 128.6 (C-19), 128.4 (C-18), 127.0 (C-3), 125.4 (C-5), 123.9 (C-2), 118.9 (C-14), 113.9 (C-16), 112.7 (C-12), 92.2 (C-7), 80.2 (C-6), 66.1 (C-10), 27.7 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.986 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 413.05 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 415.1321 [ $\text{M+H}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 415.1320 für [ $\text{M+H}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1609, 1499, 1387, 1202, 825, 692  $\text{cm}^{-1}$ .

**4-(3-((5-(4-(1H-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)phenyl)pyridin (I-97, KKS-076)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (40.8 mg, 107  $\mu\text{mol}$ , 51 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.61-8.57 (m, 2H, *H*-19), 7.99 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-3), 7.72-7.66 (m, 2H, *H*-18), 7.58 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.3 Hz, 2H, *H*-4), 7.49-7.38 (m, 1H, *H*-15), 7.39-7.33 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.12-7.06 (m, 1H, *H*-16), 4.23 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-10), 2.67 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.05 (quint,  $^3J_{8,9}$  =  $^3J_{9,10}$  = 6.4 Hz, 2H, *H*-9) ppm;

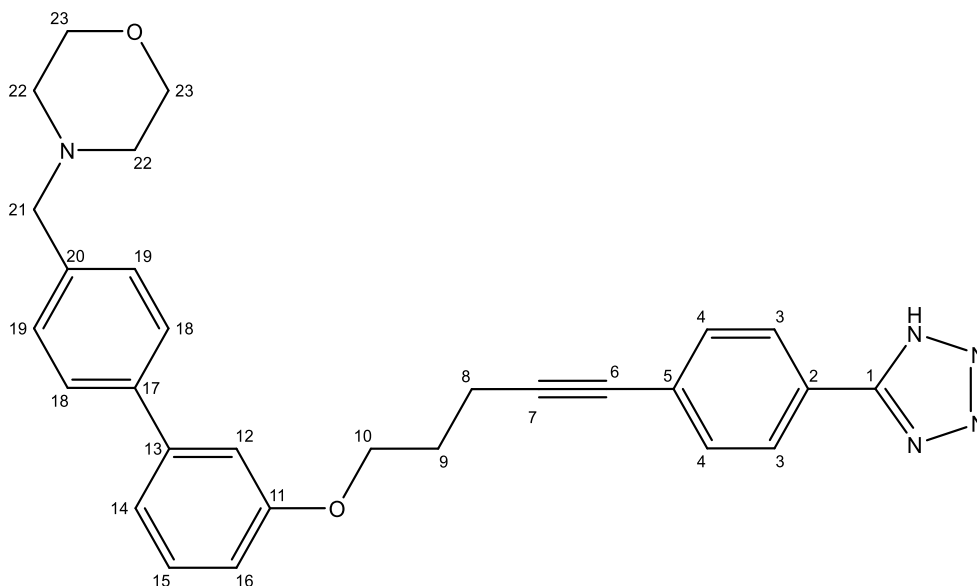
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.1 (C-11), 155.8 (C-1), 150.1 (C-19), 146.8 (C-17), 138.6 (C-13), 132.1 (C-4), 130.3 (C-15), 126.9 (C-3), 125.3 (C-5), 124.5 (C-2), 121.3 (C-18), 119.1 (C-14), 115.4 (C-16), 112.9 (C-12), 92.4 (C-7), 80.2 (C-6), 66.1 (C-10), 27.8 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 6.770 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 382.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 380.1520  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (ber.  $m/z$  = 380.1517 für  $[\text{M}-\text{H}]^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1597, 1498, 1410, 1210, 843, 750  $\text{cm}^{-1}$ .

**4-((3'-((5-(4-(1*H*-tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-morpholin (I-111, KKS-084)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (31.6 mg, 66.9  $\mu\text{mol}$ , 32 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.98-7.89 (m, 2H, *H*-3), 7.67-7.60 (m, 2H, *H*-18), 7.44-7.35 (m, 5H, *H*-4, *H*-15, *H*-19), 7.29-7.18 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.04-6.95 (m, 1H, *H*-16), 4.28-4.14 (m, 2H, *H*-8), 3.65-3.55 (m, 4H, *H*-23), 3.49 (s, 2H, *H*-21), 2.69-2.57 (m, 2H, *H*-8), 2.46-2.26 (m, 4H, *H*-22), 2.07-1.99 (3, 2H, *H*-9) ppm;

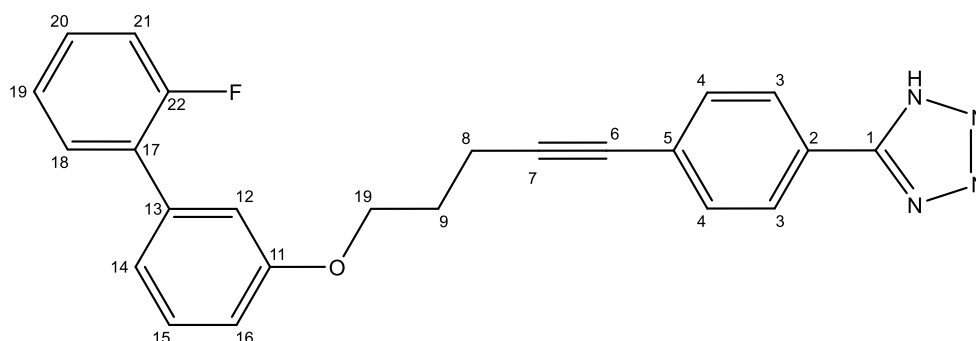
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 160.1 (C-1), 159.0 (C-11), 141.5 (C-13), 138.7 (C-17), 137.2 (C-20), 132.0 (C-2), 131.4 (C-4), 130.0 (C-15), 129.4 (C-19), 126.5 (C-18), 125.7 (C-3), 121.4 (C-5), 119.0 (C-14), 113.5 (C-16), 112.7 (C-12), 89.7 (C-7), 81.2 (C-6), 66.2 (C-10), 66.2 (C-23), 62.0 (C-21), 53.2 (C-22), 28.0 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 6.946 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 480.15 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 480.2395 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 480.2394 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1562, 1442, 1418, 1200, 865, 762 cm<sup>-1</sup>.

**5-(4-(5-((2'-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-102, KKS-094)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (53.4 mg, 134  $\mu$ mol, 64 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.4 Hz, 2H, H-3), 7.61 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 8.4 Hz, 2H, H-4), 7.56-7.50 (m, 1H, H-20), 7.45-7.37 (m, 2H, H-15, H-18), 7.33-7.25 (m, 2H, H-19, H-21), 7.14-7.10 (m, 2H, H-12, H-14), 7.06-6.98 (m, 1H, H-16), 4.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>9,10</sub> = 6.1 Hz, 2H, H-10), 2.66 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,9</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-8), 2.10-1.98 (m, 2H, H-9) ppm;

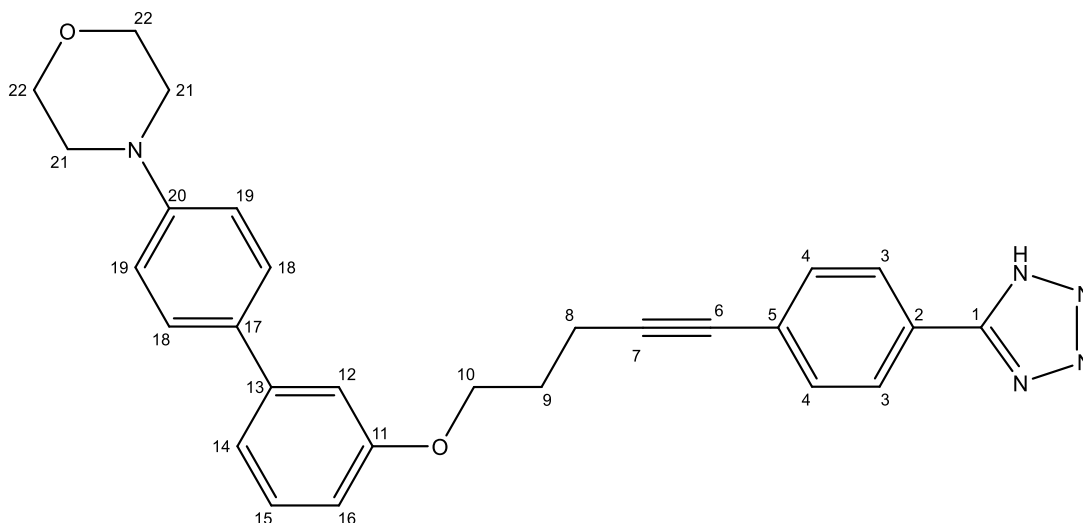
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.5 (C-11), 158.0 (C-22), 155.2 (C-1), 136.5 (C-13), 132.2 (C-4), 130.8 (C-20), 129.8 (C-15), 129.6 (C-18), 128.1 (C-17), 127.1 (C-3), 125.3 (C-5), 124.9 (C-19), 123.6 (C-2), 121.2 (C-14), 116.1 (C-21), 115.0 (C-12), 114.0 (C-16), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.2 (C-10), 27.8 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 10.363 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 397.1 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 399.1616 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 399.1616 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1383, 1252, 1153, 953 cm<sup>-1</sup>.

**4-(3'-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)morpholin (I-110, KKS-079)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (75.8 mg, 162  $\mu$ mol, 78 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.02-7.94 (m, 2H, *H*-3), 7.58-7.48 (m, 4H, *H*-4, *H*-18), 7.37-7.29 (m, 1H, *H*-15), 7.20-7.14 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 6.99-6.92 (m, 2H, *H*-19), 6.91-6.86 (m, 1H, *H*-16), 4.23-4.14 (m, 2H, *H*-8), 3.77-3.68 (m, 4H, *H*-22), 3.17-3.04 (m, 4H, *H*-21), 2.69-2.60 (m, 2H, *H*-8), 2.08-2.00 (3, 2H, *H*-9) ppm;

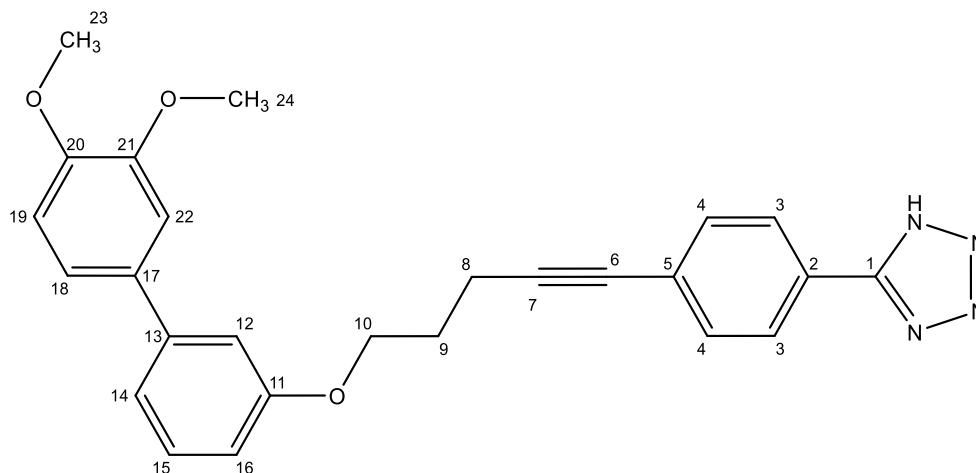
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.0 (C-11), 156.9 (C-1), 150.5 (C-20), 141.5 (C-13), 131.8 (C-4), 130.5 (C-17), 129.9 (C-15), 127.2 (C-18), 126.8 (C-2), 126.5 (C-3), 124.0 (C-5), 118.2 (C-14), 115.1 (C-19), 112.6 (C-16), 111.9 (C-12), 91.4 (C-7), 80.7 (C-6), 66.1 (C-10), 66.0 (C-22), 48.1 (C-21), 27.9 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.036 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 466.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 466.2239  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 466.2238 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1604, 1579, 1446, 1381, 1201, 823, 763  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((3',4'-Dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol**  
(I-103, KKS-083)



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (74.2 mg, 168  $\mu\text{mol}$ , 81 %) erhalten.

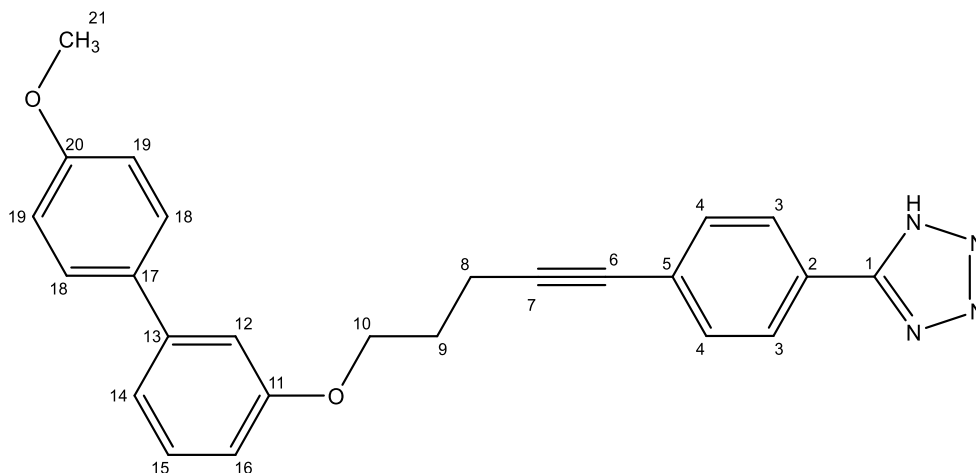
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.08-7.99 (m, 2H, H-3), 7.64-7.58 (m, 2H, H-4), 7.37-7.30 (m, 1H, H-15), 7.23-7.12 (m, 4H, H-12, H-14, H-18, H-22), 7.03-6.94 (m, 1H, H-19), 6.97-6.90 (m, 1H, H-16), 4.20 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, H-10), 3.84 (s, 3H, H-2), 3.78 (s, 3H, H-2), 2.68 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, H-8), 2.05 (quin,  $^3J_{8,9}$  =  $^3J_{9,10}$  = 6.5 Hz, 2H, H-9) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.7 (C-11), 148.7 (C-21), 148.4 (C-20), 141.5 (C-13), 132.6 (C-17), 132.0 (C-4), 129.6 (C-15), 127.2 (C-3), 125.4 (C-5), 123.8 (C-2), 118.7, 118.6, 112.5, 112.4 (C-14, C-16, C-18, C-22), 111.9 (C-19), 110.4 (C-12), 92.2 (C-7), 80.1 (C-6), 65.9 (C-10), 55.4 (C-23, C-24), 27.7 (C-9), 15.4 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 9.753 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 439.10  $[\text{M-H}]^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 439.1774  $[\text{M-H}]^-$  (ber.  $m/z$  = 439.1776 für  $[\text{M-H}]^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2931, 1606, 1572, 1464, 1227, 1022, 993, 763  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((4'-Methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-104, KKS-078)**

Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (56.3 mg, 137  $\mu$ mol, 66 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.06-7.98 (m, 2H, *H*-3), 7.66-7.56 (m, 4H, *H*-4, *H*-18), 7.39-7.32 (m, 1H, *H*-15), 7.23-7.12 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.06-6.96 (m, 2H, *H*-19), 6.96-6.91 (m, 1H, *H*-16), 4.27-4.11 (m, 2H, *H*-10), 3.79 (s, 3H, *H*-21), 2.72-2.63 (m, 2H, *H*-8), 2.10-1.99 (m, 2H, *H*-9) ppm;

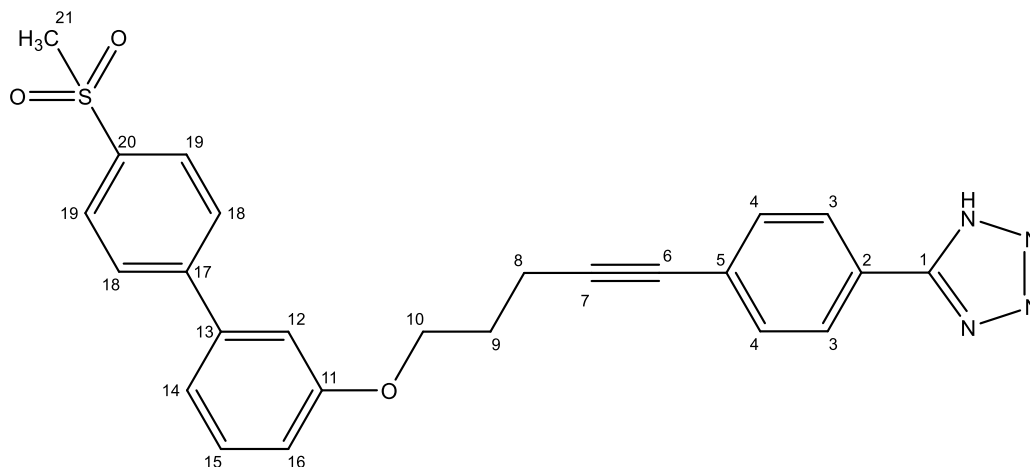
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.9 (C-11, C-20), 155.2 (C-1), 141.3 (C-13), 132.3 (C-17), 132.1 (C-4), 129.8 (C-15), 127.8 (C-18), 126.9 (C-3), 125.5 (C-5), 123.7 (C-2), 118.6 (C-14), 114.2 (C-19), 112.8 (C-16), 112.3 (C-12), 91.9 (C-7), 79.6 (C-6), 66.1 (C-10), 55.1 (C-21), 27.8 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.266 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 411.05 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (58);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 411.1812 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 411.1816 für [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2931, 1607, 1585, 1269, 1049, 982, 829, 778  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-((4'-(Methylsulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-114, KKS-089)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (79.4 mg, 173  $\mu$ mol, 83 %) erhalten.

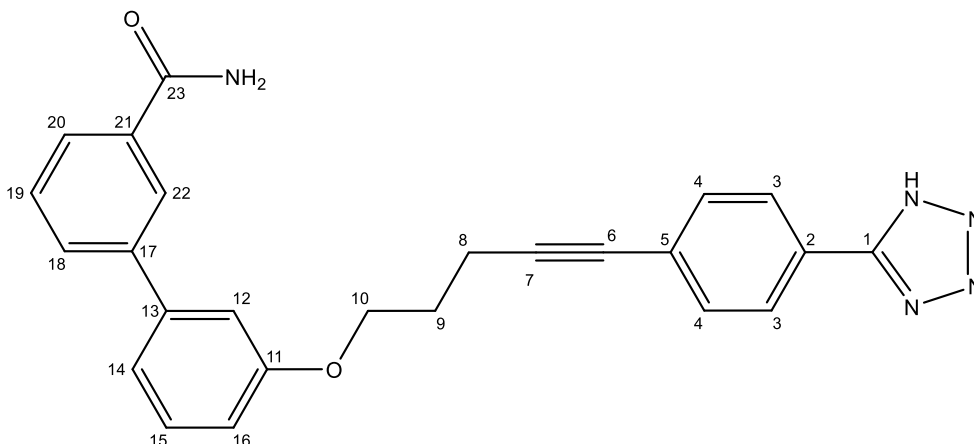
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.04-7.91 (m, 6H, *H*-3, *H*-18, *H*-19), 7.62 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.4 Hz, 2H, *H*-4), 7.49-7.39 (m, 1H, *H*-15), 7.36-7.30 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.10-7.03 (m, 1H, *H*-16), 4.23 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-10), 3.25 (s, 3H, *H*-21), 2.68 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-8), 2.14-1.99 (m, 2H, *H*-9) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.1 (C-11), 154.9 (C-1), 144.9 (C-17), 139.9 (C-13), 139.7 (C-20), 132.2 (C-4), 130.3 (C-15), 127.7 (C-3), 127.5, 127.1 (C-18, C-19), 125.8 (C-5), 123.5 (C-2), 119.6 (C-14), 114.8 (C-16), 113.3 (C-12), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.3 (C-10), 43.6 (C-21), 27.8 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 9.040 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 457.05 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 459.1483 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 459.1485 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1565, 1471, 1391, 1297, 1142, 771, 534  $\text{cm}^{-1}$ .

**3'-((5-(4-(1H-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamid  
(I-115, KKS-085)**

Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (62.1 mg, 146  $\mu$ mol, 70 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.05-7.94 (m, 4H, *H*-3, *H*-20, *H*-22), 7.77-7.74 (m, 2H, *H*-18, *H*-19), 7.60-7.55 (m, 2H, *H*-4), 7.44-7.40 (m, 1H, *H*-15), 7.31-7.27 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.06-6.99 (m, 1H, *H*-16), 4.28-4.16 (m, 2H, *H*-10), 2.73-2.65 (m, 2H, *H*-8), 2.12-2.02 (m, 2H, *H*-9) ppm;

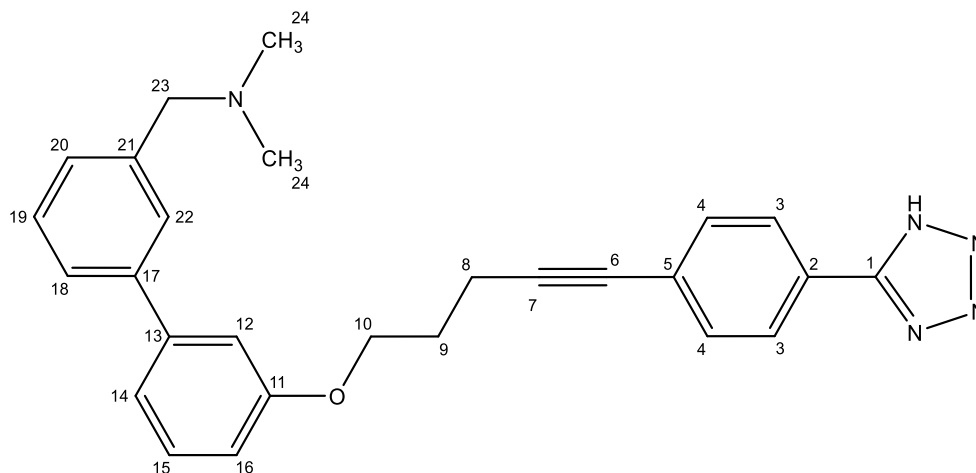
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 167.6 (C-23), 159.0 (C-11), 156.0 (C-1), 142.5 (C-17), 140.8 (C-13), 134.6 (C-21), 132.0 (C-4), 130.1 (C-15), 129.7 (C-19), 127.4 (C-20), 126.7 (C-3), 126.5, 126.3 (C-18, C-22), 125.9 (C-5), 123.9 (C-2), 119.2 (C-14), 114.1 (C-16), 113.0 (C-12), 92.0 (C-7), 80.2 (C-6), 65.7 (C-10), 27.8 (C-9), 15.4 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 8.275 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 424.05  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (82);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 424.1770  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 424.1768 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3273, 2924, 1650, 1594, 1395, 1222, 1119, 760, 535  $\text{cm}^{-1}$ .

**1-(3'-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)-*N,N*-dimethylmethanamin (I-116, KKS-080)**



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (71.4 mg, 163  $\mu\text{mol}$ , 78 %) erhalten.

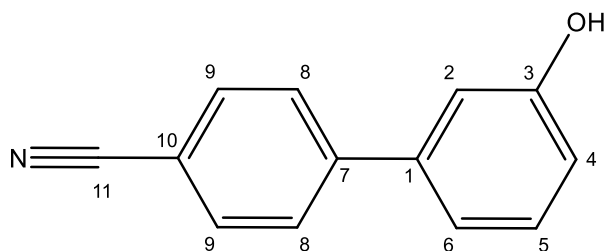
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.95 (d,  $^3J_{3,4}$  = 7.9 Hz, 2H, *H*-3), 7.77 (s, 1H, *H*-22), 7.71 (d,  $^3J_{18,19}$  = 7.6 Hz, 1H, *H*-8), 7.50 (t,  $^3J_{18,19}$  =  $^3J_{19,20}$  = 7.5 Hz, 1H, *H*-19), 7.47-7.37 (m, 4H, *H*-4, *H*-15, *H*-20), 7.31-7.23 (m, 2H, *H*-12, *H*-14), 7.08-6.99 (m, 1H, *H*-16), 4.21 (t,  $^3J_{9,10}$  = 5.9 Hz, 2H, *H*-10), 4.09 (s, 2H, *H*-23), 2.65 (t,  $^3J_{8,9}$  = 6.9 Hz, 2H, *H*-8), 2.61 (s, 6H, *H*-24), 2.08-2.00 (m, 2H, *H*-9) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.1 (C-11), 158.8 (C-1), 141.0 (C-13), 140.1 (C-17), 133.6 (C-21), 131.5 (C-4), 130.1 (C-15), 129.3 (C-20), 129.2 (C-19), 128.6 (C-22), 127.1 (C-18), 126.0 (C-8), 125.2 (C-5), 122.3 (C-2), 119.1 (C-14), 113.7 (C-16), 113.1 (C-12), 90.0 (C-7), 80.2 (C-6), 66.2 (C-10), 60.9 (C-23), 42.8 (C-24), 27.9 (C-9), 15.5 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 7.105 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 438.15 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 438.2288 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 438.2288 für [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 1604, 1576, 1390, 1227, 1119, 767, 538  $\text{cm}^{-1}$ .

**3'-Hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-carbonitril (I-118, KKS-087)**

Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (605 mg, 310  $\mu\text{mol}$ , 89 %) erhalten.

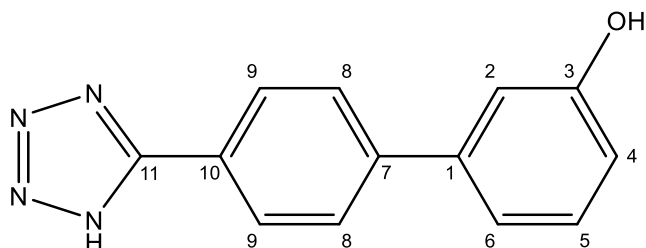
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.67 (s, 1H, OH), 7.90 (d,  $^3J_{8,9}$  = 6.8 Hz, 2H, H-9), 7.80 (d,  $^3J_{8,9}$  = 6.8 Hz, 2H, H-8), 7.31 (t,  $^3J_{4,5}$  =  $^3J_{5,6}$  = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.15 (d,  $^3J_{5,6}$  = 7.6 Hz, 1H, H-6), 7.09 (s, 1H, H-2), 6.87 (d,  $^3J_{4,5}$  = 8.0 Hz, 1H, H-4) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 157.9 (C-3), 144.8 (C-7), 139.7 (C-1), 132.7 (C-9), 130.2 (C-5), 127.4 (C-8), 118.8 (C-11), 117.7 (C-6), 115.7 (C-4), 113.7 (C-2), 109.9 (C-10) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 6.875 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 194.00  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 218.0575  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 218.0576 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3340, 2980, 2888, 2235, 1601, 1497, 1157, 877, 778  $\text{cm}^{-1}$ .

**4'-(1H-Tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-ol (I-119, KKS-088)**

**KKS-087** (I-118, 89.6 mg, 459  $\mu\text{mol}$ ), Natriumazid (35.8 mg, 550  $\mu\text{mol}$ ) und Ammoniumchlorid (31.9 mg, 602  $\mu\text{mol}$ ) wurden unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1.50 mL) gelöst und 12 h bei 130 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, danach mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (61.7 mg, 259  $\mu\text{mol}$ , 56 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.62 (s, 1H, OH), 8.13 (d,  $^3J_{8,9}$  = 8.2 Hz, 2H, H-9), 7.86 (d,  $^3J_{8,9}$  = 8.2 Hz, 2H, H-8), 7.31 (t,  $^3J_{4,5}$  =  $^3J_{5,6}$  = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.18 (d,  $^3J_{5,6}$  = 7.6 Hz, 1H, H-11), 7.13 (s, 1H, H-2), 6.85 (d,  $^3J_{4,5}$  = 7.9 Hz, 1H, H-4) ppm;

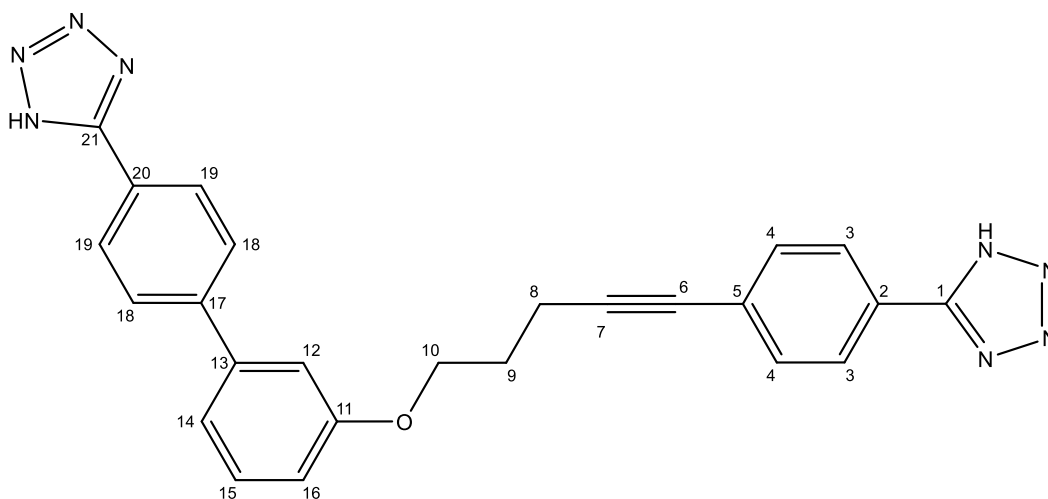
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 157.9 (C-3), 154.8 (C-11), 142.8 (C-7), 140.3 (C-1), 130.1 (C-5), 127.5 (C-8, C-9), 123.0 (C-10), 117.6 (C-6), 115.2 (C-4), 113.6 (C-2) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 5.544 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 237.00 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 239.0926 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 239.0927 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3340, 2980, 1618, 1585, 1474, 1309, 1159, 836, 785 cm<sup>-1</sup>.

**5-(4-(5-((4'-(1H-Tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)oxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-1H-tetrazol (I-120, KKS-095)**



**KKS-023 (I-36, 80.0 mg, 350  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (73.5 mg, 386  $\mu$ mol) und DMAP (98.5 mg, 807  $\mu$ mol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-088 (I-119, 91.9 mg, 386  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (18.2 mg, 455  $\mu$ mol) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak.

entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1 → 1:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (25.1 mg, 55.7  $\mu\text{mol}$ , 16 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.12 (d,  $^3J_{18,19}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-19), 8.01 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-3), 7.94 (d,  $^3J_{18,19}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-18), 7.62 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-4), 4.25 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.0 Hz, 2H, *H*-10), 2.70 (t,  $^3J_{8,9}$  = 6.9 Hz, 2H, *H*-8), 2.11-2.03 (m, 2H, *H*-9) ppm;

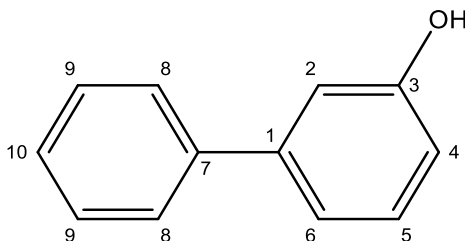
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.1 (C-11), 155.0, 154.9 (C-1, C-21), 142.5 (C-17), 140.4 (C-13), 132.2 (C-4), 130.2 (C-15), 127.7 (C-18), 127.4 (C-19), 127.0 (C-3), 125.8 (C-5), 123.5, 123.3 (C-2, C-20), 119.2 (C-14), 114.7 (C-16), 112.9 (C-12), 92.5 (C-7), 80.3 (C-6), 66.2 (C-10), 27.8 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 8.630 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 449.05  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 471.1649  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 471.1652 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3464, 2980, 1581, 1428, 1292, 1132, 841, 750, 539  $\text{cm}^{-1}$ .

#### [1,1'-Biphenyl]-3-ol (I-122, KKS-132)



Es wurde nach Methode A ein farblos-kristalliner Feststoff (193 mg, 1.13 mmol, 98 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.56 (s, 1H, OH), 7.63-7.55 (m, 2H, *H*-8), 7.48-7.41 (m, 2H, *H*-9), 7.39-7.31 (m, 1H, *H*-10), 7.26 (t,  $^3J_{4,5}$  =  $^3J_{5,6}$  = 7.8 Hz, 1H, *H*-5), 7.11-7.00 (m, 2H, *H*-2, *H*-6), 6.83-6.75 (m, 1H, *H*-4) ppm;

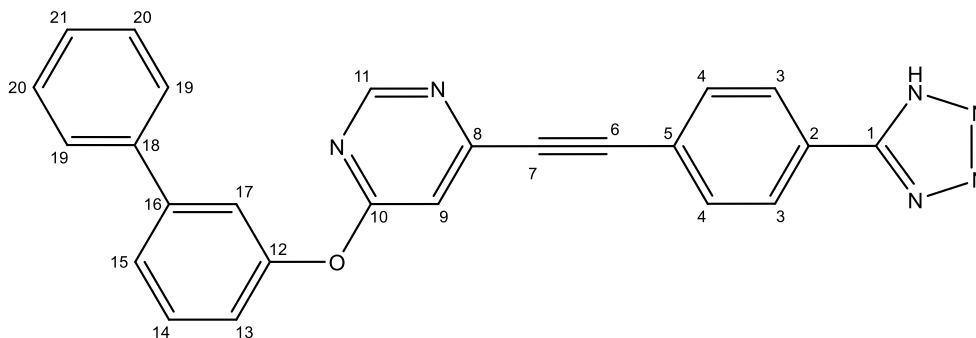
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 157.9 (C-3), 141.7 (C-1), 140.4 (C-7), 129.9 (C-5), 128.9 (C-9), 127.4 (C-10), 126.6 (C-8), 117.5 (C-6), 114.4 (C-4), 113.5 (C-2) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 7.237 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 168.95  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (16);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 169.0662  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (ber.  $m/z$  = 169.0659 für  $[\text{M}-\text{H}]^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3253, 1587, 1459, 1428, 1295, 1182, 1182, 882, 692  $\text{cm}^{-1}$ .

**4-((4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)ethynyl)-6-([1,1'-biphenyl]-3-yloxy)pyrimidin (I-123, KKS-163)**



**KKS-132 (I-122, 36.4 mg, 214  $\mu\text{mol}$ )** wurde mit **KKS-165 (I-64, 72.4 mg, 194  $\mu\text{mol}$ )** und Kaliumcarbonat (65.0 mg, 470  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (5 mL) gelöst und 2 h bei 80 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 100:0  $\rightarrow$  97:3) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (63.4 mg, 152  $\mu\text{mol}$ , 79 %) erhalten wurde.

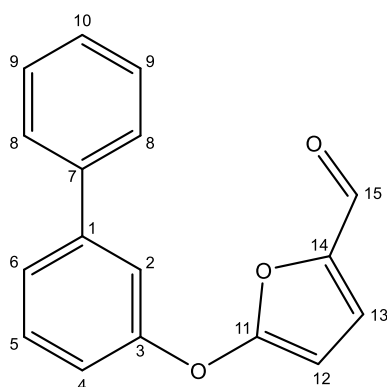
**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.81 (s, 1H, *H*-11), 8.22-8.08 (m, 2H, *H*-3), 7.94-7.86 (m, 2H, *H*-4), 7.75-7.52 (m, 5H, *H*-13, *H*-14, *H*-17, *H*-19), 7.51-7.42 (m, 3H, *H*-9, *H*-20), 7.42-7.35 (m, 1H, *H*-21), 7.30-7.21 (m, 1H, *H*-15) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 169.2 (C-10), 158.7 (C-11), 152.5 (C-12), 150.8 (C-8), 142.1 (C-16), 139.0 (C-18), 133.1 (C-4), 130.5 (C-14), 129.0 (C-20), 127.9 (C-21), 127.4 (C-3), 126.8 (C-19), 125.9 (C-2), 124.2 (C-13), 122.8 (C-5), 120.6 (C-15), 119.9 (C-17), 111.0 (C-9), 91.6 (C-6), 88.1 (C-7) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 9.573 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 417.05 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 417.1458 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 417.1458 für [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2980, 2217, 1580, 1419, 1285, 1175, 972, 696  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-([1,1'-Biphenyl]-3-yloxy)furan-2-carbaldehyd (I-129, KKS-167)**

Zu einer Lösung aus 5-Nitro-2-furaldehyd Diacetat (400 mg, 1.64 mmol) in THF (3.0 mL) wurde bei 0 °C eine Lösung aus **KKS-132 (I-122)**, 573 mg, 3.37 mmol) und Kalium-*tert*-butanolat (387 mg, 3.45 mmol) in THF (5.0 mL) gegeben. Die Lösung wurde weitere 30 min bei 0 °C gerührt und über 17 h langsam auf RT erwärmt. Danach wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 100:0 → 4:1) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (41.2 mg, 108 µmol, 52 %) erhalten wurde.

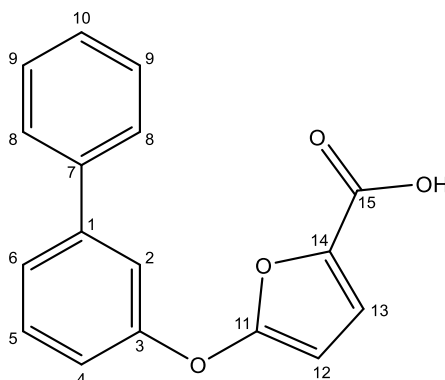
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.39 (s, 1H, *H*-15), 7.72 (d,  $^3J_{8,9}$  = 7.6 Hz, 2H, *H*-8), 7.66-7.55 (m, 4H, *H*-2, *H*-5, *H*-6, *H*-13), 7.49 (t,  $^3J_{8,9}$  =  $^3J_{9,10}$  = 7.6 Hz, 2H, *H*-9), 7.49 (t,  $^3J_{9,10}$  = 7.3 Hz, 1H, *H*-10), 7.35-7.24 (m, 1H, *H*-4), 5.95 (d,  $^3J_{12,13}$  = 3.5 Hz, 1H, *H*-12) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 176.3 (C-15), 161.7 (C-11), 154.5 (C-3), 144.6 (C-14), 142.6 (C-1), 138.7 (C-7), 130.9 (C-5), 129.0 (C-9), 128.1 (C-10), 126.8 (C-8), 124.4 (C-6), 117.7 (C-4), 117.1 (C-2), 90.7 (C-12) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 9.236 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 265.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 265.0855 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 265.0859 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1656, 1513, 1365, 1216, 1038, 762 cm<sup>-1</sup>.

**5-([1,1'-Biphenyl]-3-yloxy)furan-2-carbonsäure (I-130, KKS-168)**

**KKS-167 (I-129)**, 70.0 mg, 264  $\mu\text{mol}$ ) wurde mit DMSO (75.0  $\mu\text{L}$ ), *tert*-Butanol (660  $\mu\text{L}$ ) und Kaliumdihydrogenphosphat (144 mg, 514  $\mu\text{mol}$ ) bei RT in THF (1 mL) suspendiert und mit  $\text{NaClO}_2$  (102 mg, 397  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. (3x 5 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (1x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an  $\text{C}_{18}$  (Wasser/Acetonitril, 95:5  $\rightarrow$  5:95) aufgereinigt. Es wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (54.1 mg, 193  $\mu\text{mol}$ , 73 %) erhalten.

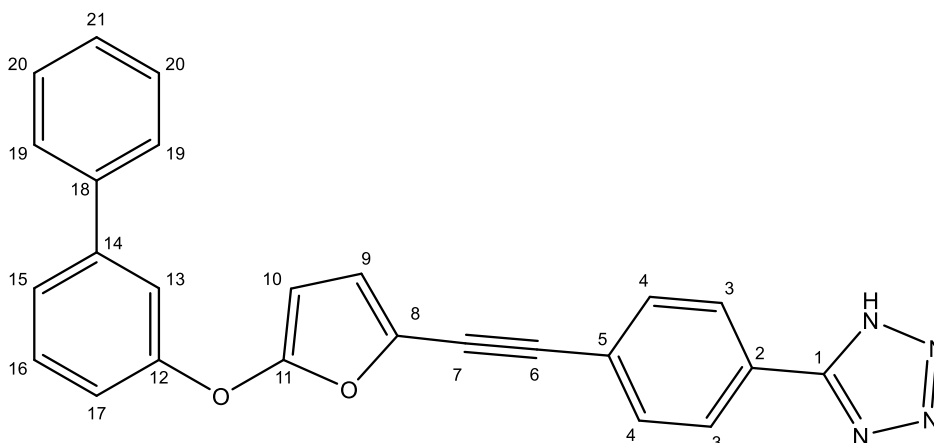
**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.73-7.66 (m, 2H, *H*-8), 7.60-7.45 (m, 5H, *H*-2, *H*-5, *H*-6, *H*-9), 7.43-7.37 (m, 1H, *H*-10), 7.26 (d,  $^3J_{12,13}$  = 3.6 Hz, 1H, *H*-13), 7.21-7.16 (m, 1H, *H*-4), 5.91 (d,  $^3J_{12,13}$  = 3.6 Hz, 1H, *H*-12) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 158.8 (*C*-15), 158.5 (*C*-11), 155.4 (*C*-3), 142.5 (*C*-1), 138.9 (*C*-7), 136.8 (*C*-14), 130.8 (*C*-5), 129.0 (*C*-9), 128.1 (*C*-10), 126.8 (*C*-8), 123.6 (*C*-6), 120.5 (*C*-13), 116.8 (*C*-4), 116.2 (*C*-2), 91.0 (*C*-12) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 8.549 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 281.00 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 279.0665 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  (ber.  $m/z$  = 279.0663 für [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1657, 1505, 1366, 1216, 1150, 1035, 761  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-((5-([1,1'-Biphenyl]-3-yloxy)furan-2-yl)ethynyl)phenyl)-1H-tetrazol (I-132, KKS-175)**

Eine Lösung aus **KKS-168 (I-130)** 136 mg, 485  $\mu\text{mol}$ ) und NaOH (23.3 mg, 582  $\mu\text{mol}$ ) in Wasser (3.5 mL) wurde bei 50 °C mit Ethylacetat (4.0 mL), Kaliumiodid (161 mg, 970  $\mu\text{mol}$ ) und Iod (123 mg, 485  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Lösung wurde weitere 3 h bei 50 °C gerührt, danach mit Ethylacetat verdünnt und mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt.

Dazu wurde es unter Ar-Atmosphäre mit **KKS-164 (I-63)**, 82.6 mg, 485  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (17.0 mg, 24.3  $\mu\text{mol}$ ), Kupfer(I)iodid (4.62 mg, 24.3  $\mu\text{mol}$ ) und Kaliumcarbonat (201 mg, 1.46 mmol) in entgaster THF/ $\text{H}_2\text{O}$ -Lsg. (99:1, 10 mL) gelöst und für 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (3x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 100:0  $\rightarrow$  4:1) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (41.2 mg, 108  $\mu\text{mol}$ , 52 %) erhalten wurde.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$  9:1):  $\delta$  = 7.92 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-3), 7.44 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.2 Hz, 2H, *H*-4), 7.40 (d,  $^3J_{19,20}$  = 7.5 Hz, 2H, *H*-19), 7.31-7.13 (m, 6H, *H*-13, *H*-15, *H*-16, *H*-20, *H*-21), 6.94-6.90 (m, 1H, *H*-17), 6.54 (d,  $^3J_{9,10}$  = 3.4 Hz, 1H, *H*-9), 5.47 (d,  $^3J_{9,10}$  = 3.4 Hz, 1H, *H*-10) ppm;

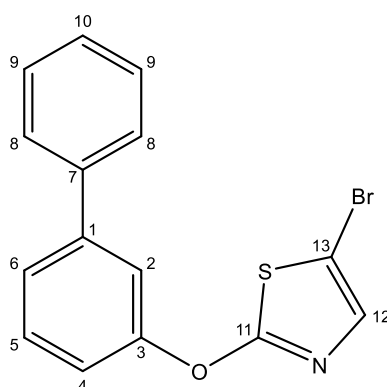
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>/DMSO 9:1): δ = 156.5 (C-11), 155.9 (C-12), 142.7 (C-14), 139.4 (C-18), 131.2 (C-4), 129.7 (C-21), 128.7 (C-8), 128.4 (C-20), 127.4 (C-16), 126.7 (C-3), 126.5 (C-19), 124.4 (C-2), 123.9 (C-5), 122.8 (C-15), 117.8 (C-9), 115.8 (C-17), 115.7 (C-13), 91.7 (C-6), 90.0 (C-10), 81.4 (C-7) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 10.842 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 403.05 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-APCI-MS:** m/z = 405.1347 [M+H]<sup>+</sup> (ber. m/z = 405.1346 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):** ν̃ = 2204, 1738, 1610, 1570, 1480, 1246, 1159, 1051, 749 cm<sup>-1</sup>.

### 2-([1,1'-Biphenyl]-3-yloxy)-5-bromothiazol (KKS-177)



**KKS-132 (I-122,** 400 mg, 2.35 mmol) wurde mit 2,5-Dibromthiazol (570 mg, 2.35 mmol) und Kaliumcarbonat (487 mg, 3.52 mmol) in DMF (5 mL) gelöst und 4 h bei 100 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 15 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 100:0 → 4:1) wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (670 mg, 2.02 mmol, 86 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.65-7.59 (m, 2H, H-8), 7.56-7.50 (m, 3H, H-2, H-5, H-6), 7.50-7.46 (m, 2H, H-9), 7.44-7.38 (m, 1H, H-10), 7.30-7.26 (m, 1H, H-4), 7.23 (s, 1H, H-12), ppm;

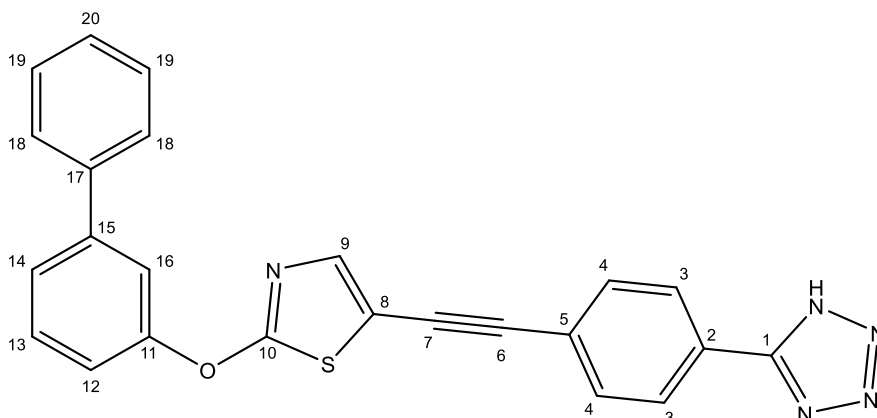
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.0 (C-11), 155.2 (C-3), 143.5 (C-1), 139.8 (C-7), 138.4 (C-12), 130.3 (C-5), 128.9 (C-9), 127.9 (C-10), 127.1 (C-8), 125.0 (C-6), 118.8 (C-2), 118.7 (C-4), 101.1 (C-13) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 11.131 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 333.85 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** m/z = 355.9543 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. m/z = 355.9539 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1738, 1572, 1513, 1467, 1218, 1152, 987, 751, 692  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-((4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)ethynyl)-2-([1,1'-biphenyl]-3-yloxy)thiazol (I-126, KKS-188)**



**KKS-177 (I-124, 50.0 mg, 151  $\mu\text{mol}$ )** wurde unter Ar-Atmosphäre mit dem **KKS-164 (I-63, 51.2 mg, 301  $\mu\text{mol}$ )**,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (4.17 mg, 5.93  $\mu\text{mol}$ ), Kaliumcarbonat (62.4 mg, 452  $\mu\text{mol}$ ) und Kupfer(I)iodid (1.52 mg, 7.96  $\mu\text{mol}$ ) in Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1, 3.0 mL) gelöst und 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 95:5  $\rightarrow$  4:1) wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (54.3 mg, 129  $\mu\text{mol}$ , 86 %) erhalten.

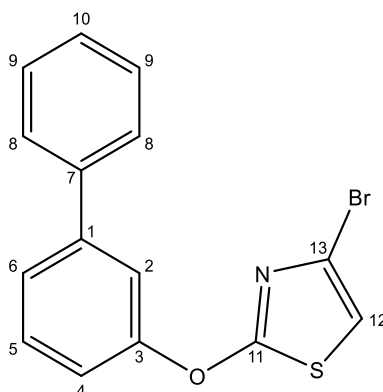
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$  9:1):  $\delta$  = 8.03-7.98 (m, 2H, *H*-3), 7.53-7.46 (m, 4H, *H*-4, *H*-18), 7.4-7.39 (m, 3H, *H*-13, *H*-14, *H*-16), 7.38-7.32 (m, 3H, *H*-19, *H*-20), 7.32-7.24 (m, 1H, *H*-12), 7.20-7.17 (m, 1H, *H*-9) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$  9:1):  $\delta$  = 173.1 (C-10), 155.0 (C-11), 143.1 (C-15), 142.2 (C-9), 139.3 (C-17), 131.6 (C-4), 130.1 (C-13), 128.6 (C-19), 127.6 (C-20), 126.9 (C-3), 126.7 (C-18), 126.7 (C-2), 124.7 (C-14), 124.6 (C-5), 118.6 (C-12), 118.5 (C-16), 112.1 (C-8), 93.6 (C-6), 80.4 (C-7) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.570 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 422.05  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 422.1070  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 422.1070 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1434, 1366, 1229, 1216, 1171, 748  $\text{cm}^{-1}$ .

**2-([1,1'-Biphenyl]-3-yloxy)-4-bromthiazol (I-125, KKS-179)**

**KKS-132 (I-122, 400 mg, 2.35 mmol)** wurde mit 2,4-Dibromthiazol (570 mg, 2.35 mmol) und Kaliumcarbonat (487 mg, 3.52 mmol) in DMF (5 mL) gelöst und 4 h bei 100 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 15 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 100:0 → 4:1) wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (694 mg, 2.09 mmol, 89 %) erhalten.

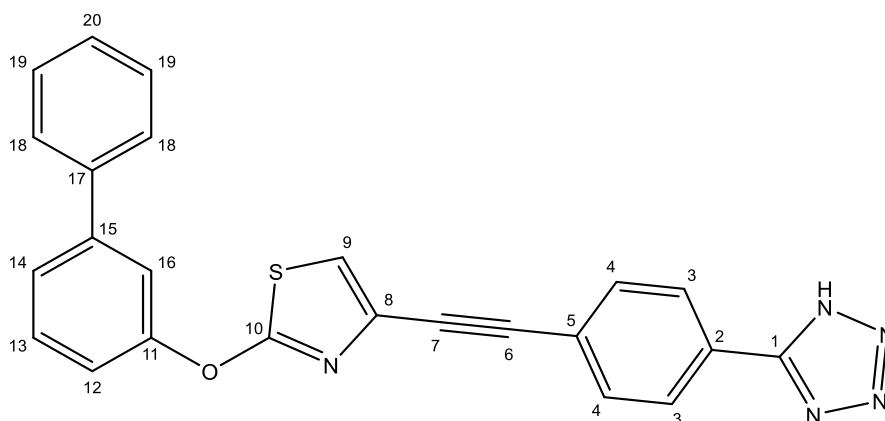
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.64-7.59 (m, 2H, *H*-8), 7.57-7.51 (m, 3H, *H*-2, *H*-5, *H*-6), 7.51-7.46 (m, 2H, *H*-9), 7.43-7.39 (m, 1H, *H*-10), 7.33-7.28 (m, 1H, *H*-4), 6.77 (s, 1H, *H*-12), ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.1 (C-11), 155.3 (C-3), 143.5 (C-1), 139.8 (C-7), 130.3 (C-5), 128.9 (C-9), 127.9 (C-10), 127.1 (C-8), 125.0 (C-6), 119.7 (C-13), 118.8 (C-2), 118.7 (C-4), 110.3 (C-12) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 10.646 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 333.85 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 353.9558 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 353.9559 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1738, 1571, 1470, 1417, 1219, 1079, 752, 692 cm<sup>-1</sup>.

**4-((4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)ethynyl)-2-([1,1'-biphenyl]-3-yloxy)thiazol (I-127, KKS-190)**

**KKS-179 (I-125, 50.0 mg, 151  $\mu\text{mol}$ )** wurde unter Ar-Atmosphäre mit dem **KKS-164 (I-63, 51.2 mg, 301  $\mu\text{mol}$ )**,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (4.17 mg, 5.93  $\mu\text{mol}$ ), Kaliumcarbonat (62.4 mg, 452  $\mu\text{mol}$ ) und Kupfer(I)iodid (1.52 mg, 7.96  $\mu\text{mol}$ ) in Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  (99:1, 3.0 mL) gelöst und 17 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen. Danach wurden die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 95:5  $\rightarrow$  4:1) wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (51.5 mg, 122  $\mu\text{mol}$ , 81 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.14-8.01 (m, 2H, *H*-3), 7.82-7.67 (m, 7H, *H*-4, *H*-9, *H*-14, *H*-16, *H*-18), 7.67-7.57 (m, 1H, *H*-13), 7.54-7.47 (m, 2H, *H*-19), 7.47-7.37 (m, 2H, *H*-12, *H*-20) ppm;

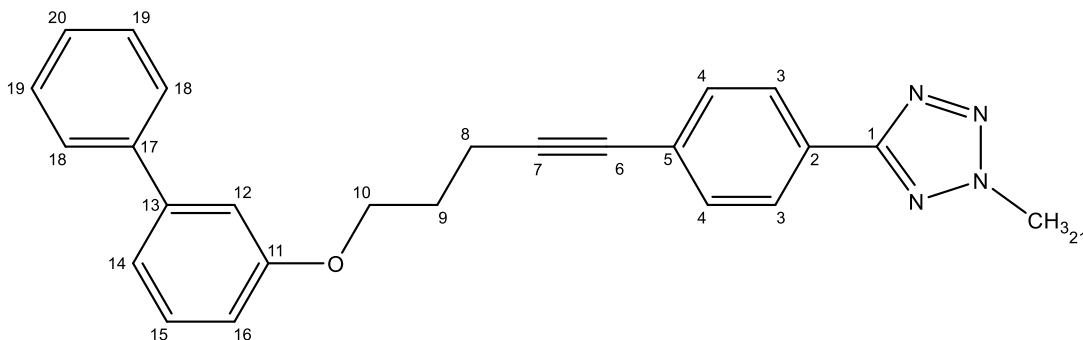
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 172.4 (C-10), 155.2 (C-11), 142.4 (C-15), 138.7 (C-17), 132.4 (C-4), 130.8 (C-13), 129.1 (C-19), 128.1 (C-20), 127.2 (C-3), 126.8 (C-18), 124.9 (C-2), 124.7 (C-14), 123.8 (C-5), 120.4 (C-9), 119.5 (C-12), 118.7 (C-16), 111.5 (C-8), 87.5 (C-6), 85.7 (C-7) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.331 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 420.05 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 422.1067 [ $\text{M+H}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 422.1070 für [ $\text{M+H}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1434, 1366, 1229, 1216, 1171, 748  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(4-(5-([1,1'-Biphenyl]-3-yloxy)pent-1-in-1-yl)phenyl)-2-methyl-2H-tetrazol (I-133, KKS-134)**



**KKS-110 (I-44, 94.3 mg, 389  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (81.6 mg, 428  $\mu$ mol), DMAP (52.3 mg, 428  $\mu$ mol) und DIPEA (0.06 mL) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-132 (I-122, 79.5 mg, 467  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (21.8 mg, 545  $\mu$ mol) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol, 100:0  $\rightarrow$  97:3) wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (79.6 mg, 202  $\mu$ mol, 52 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.04-7.96 (m, 2H, H-3), 7.71-7.62 (m, 2H, H-18), 7.59-7.53 (m, 2H, H-4), 7.49-7.41 (m, 2H, H-19), 7.41-7.32 (m, 2H, H-15, H-20), 7.25-7.18 (m, 2H, H-12, H-14), 7.02-6.95j (m, 1H, H-16), 4.42 (s, 3H, H-21), 4.20 (t,  $^3J_{9,10}$  = 6.1 Hz, 2H, H-10), 2.67 (t,  $^3J_{8,9}$  = 7.0 Hz, 2H, H-8), 2.05 (quint,  $^3J_{8,9}$  =  $^3J_{9,10}$  = 6.6 Hz, 2H, H-9) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 163.5 (C-1), 159.0 (C-11), 141.7 (C-13), 140.0 (C-17), 132.1 (C-4), 130.0 (C-15), 128.8 (C-19), 127.5 (C-20), 126.7 (C-18), 126.3 (C-3), 126.2 (C-2), 125.1 (C-5), 119.1 (C-14), 113.5 (C-16), 112.8 (C-12), 92.0 (C-7), 80.4 (C-6), 66.1 (C-10), 40.0 (C-21), 27.9 (C-9), 15.6 (C-8) ppm;

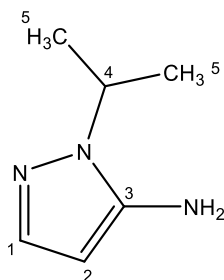
**LCMS:**  $t_R = 10.931$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 395.10  $[M+H]^+$  (63);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 417.1685$   $[M+H]^+$  (ber.  $m/z = 417.1686$  für  $[M+H]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2980, 1568, 1464, 1387, 1297, 1200, 1057, 755, 697$   $\text{cm}^{-1}$ .

### 9.2.1.5 Pyrazolpyridine

#### 5-Amino-1-isopropyl-1H-pyrazol (I-153, KKS-007)<sup>[183]</sup>



2-Cyanoethylhydrazin (0.780 mL, 10.6 mmol) wurde in Ethanol (10.0 mL) gelöst und bei 0 °C mit Aceton (0.850 mL, 10.5 mmol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Ar-Atmosphäre zu einer Lösung aus Natrium (306 mg, 13.3 mmol) in *n*-Butanol (20.0 mL) gegeben und 16 h unter Reflux gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1 → 7:3) aufgereinigt. Es wurde ein rot-kristalliner Feststoff (923 mg, 7.37 mmol, 70 %) erhalten.

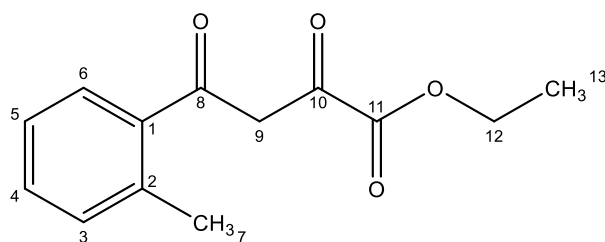
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta = 7.03$  (d,  $^3J_{1,2} = 1.6$  Hz, 1H, *H*-1), 5.24 (d,  $^3J_{1,2} = 1.6$  Hz, 1H, *H*-2), 5.02 (s, 2H, *NH*<sub>2</sub>), 4.36 (hept,  $^3J_{4,5} = 6.6$  Hz, 1H, *H*-4), 1.28 (d,  $^3J_{4,5} = 6.6$  Hz, 6H, *H*-5), ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta = 145.3$  (C-3), 137.0 (C-1), 88.1 (C-2), 46.3 (C-4), 21.9 (C-5) ppm;

**LCMS:**  $t_R = 0.715$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 126.05  $[M+H]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 126.1026$   $[M+H]^+$  (ber.  $m/z = 126.1025$  für  $[M+H]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3316, 3161, 2973, 1548, 927, 729$   $\text{cm}^{-1}$ .

**Ethyl-2,4-dioxy-(*o*-tolyl)butanoat (I-155, KKS-008)<sup>[183]</sup>**

*o*-Methylacetophenon (2.68 g, 20.0 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem Toluol (100 mL) gelöst und bei 0 °C mit Kalium-*tert*-butanolat (2.69 g, 24.0 mmol) versetzt. Nach 15 min bei gleicher Temperatur wurde Diethyloxalat (4.00 mL, 29.5 mmol) hinzugegeben und weitere 17 h bei RT gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde unter vermindertem Druck filtriert, mit Toluol (3x 50 mL) gewaschen und i. Vak. getrocknet. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (4.64 g, 19.8 mmol, 99 %) erhalten.

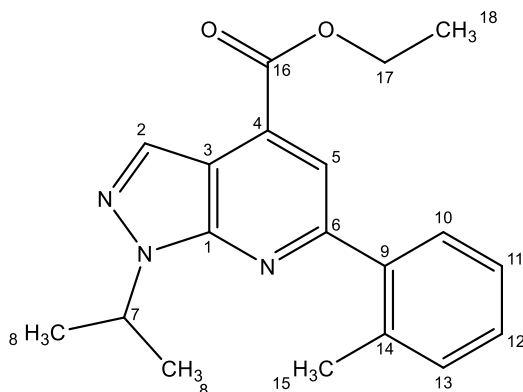
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 7.7 Hz, 1H, *H*-6), 7.45 (t, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 7.5 Hz, 1H, *H*-4), 7.32 (m, 2H, *H*-5, *H*-3), 6.8 (s, 2H, *H*-9), 4.24 (q, <sup>3</sup>J<sub>12,13</sub> = 7.1 Hz, 2H, *H*-12), 2.52 (s, 3H, *H*-7), 1.36 (t, <sup>3</sup>J<sub>12,13</sub> = 7.1 Hz, 3H, *H*-13.) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 195.5 (C-8), 167.9 (C-10), 167.9 (C-11), 138.4 (C-1), 135.2 (C-2), 132.1 (C-4), 131.9 (C-5), 128.9 (C-6), 125.9 (C-3), 102.0.1 (C-9), 62.7 (C-12), 21.1 (C-7), 14.3 (C-13) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 6.492 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 235.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 257.0781 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 257.0784 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1730, 1646, 1488, 1252, 740 cm<sup>-1</sup>.

**Ethyl-1-isopropyl-6-(*o*-tolyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-carboxylat (I-156, KKS-010)<sup>[183]</sup>**

**KKS-007 (I-153,** 250 mg, 2.00 mmol) und **KKS-008 (I-155,** 468 mg, 2.00 mmol) wurden unter Ar-Atmosphäre in Essigsäure (12 mL) gelöst. Nach 15 min bei RT wurde die Lösung

unter Reflux für 4 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entzogen und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM) aufgereinigt. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (618 mg, 1.91 mmol, 95 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.47 (s, 1H, *H*-2), 7.92 (s, 1H, *H*-5), 7.59-7.51 (m, 1H, *H*-10), 7.44-7.32 (m, 3H, *H*-11, *H*-12, *H*-13), 5.42 (hept, <sup>3</sup>*J*<sub>7,8</sub> = 6.7 Hz, 1H, *H*-7), 4.55 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>17,18</sub> = 7.1 Hz, 2H, *H*-17), 2.48 (s, 3H, *H*-15), 1.65 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>7,8</sub> = 6.7 Hz, 6H, *H*-8), 1.51 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>17,18</sub> = 7.1 Hz, 3H, *H*-18) ppm;

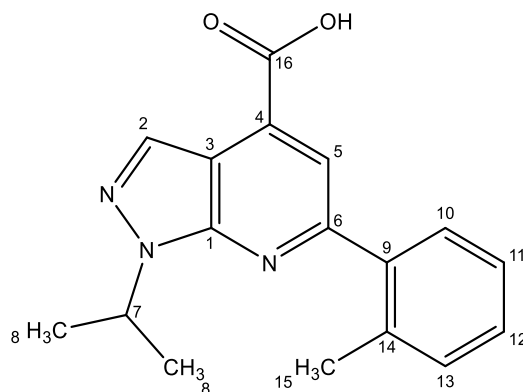
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 165.3 (C-16), 158.9 (C-6), 150.3 (C-1), 139.8 (C-9), 136.4 (C-14), 132.3 (C-2), 131.3 (C-3), 130.2 (C-10), 131.1, 128.8, 126.1 (C-11, C-12, C-13), 118.6 (C-5), 111.8 (C-4), 61.8 (C-17), 49.1 (C-7), 22.1 (C-8), 20.6 (C-15), 14.5 (C-18) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 11.358 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 324.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 324.1709 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 324.1707 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2977, 1723, 1585, 1385, 1234, 754 cm<sup>-1</sup>.

### 1-Isopropyl-6-(*o*-tolyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-carbonsäure (I-157, KKS-011)<sup>[183]</sup>



**KKS-010 (I-156,** 2.00 g, 6.20 mmol) und Kaliumhydroxid (1.06 g, 18.9 mmol) wurden in DMF (30 mL) gelöst und 4 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 30 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C18 (Wasser/Acetonitril 9:1 → 1:9) aufgereinigt. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (1.41 g, 5.36 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.48 (s, 1H, OH), 8.63 (s, 1H, H-2), 8.05 (s, 1H, H-5), 7.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>10,11</sub> = 7.6 Hz, 1H, H-10), 7.47-7.35 (m, 3H, H-11, H-12, H-13), 5.47 (hept, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 6.6 Hz, 1H, H-7), 2.51 (s, 3H, H-15), 1.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 6.7 Hz, 6H, H-8) ppm;

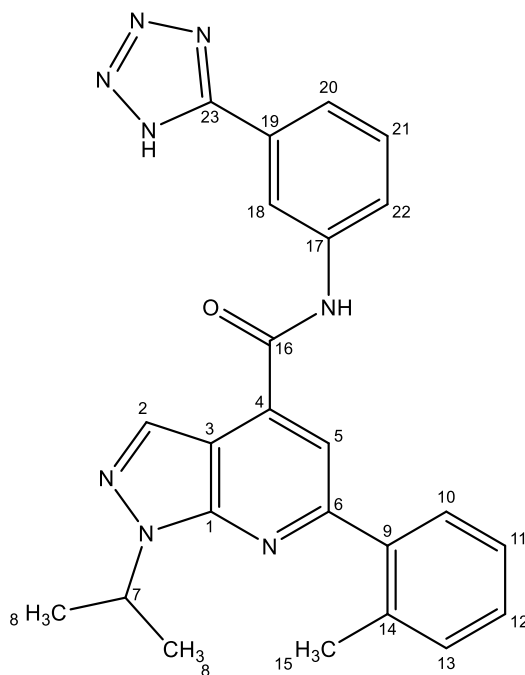
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.9 (C-16), 159.9 (C-6), 150.2 (C-1), 139.1 (C-14), 136.4 (C-9), 132.3 (C-2), 130.2 (C-3), 130.0 (C-10), 131.2, 129.1, 126.7 (C-11, C-12, C-13), 119.8 (C-5), 111.1 (C-4), 49.4 (C-7), 22.0 (C-8), 20.5 (C-15) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 6.397 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 296.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** m/z = 296.1395 [M+H]<sup>+</sup> (ber. m/z = 296.1394 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):** ν̃ = 2980, 2515, 1866, 1713, 1484, 1239, 973, 774, 752 cm<sup>-1</sup>.

**N-(3-(1H-Tetrazol-5-yl)phenyl)-1-isopropyl-6-(o-tolyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide (I-148, KKS-012)**



**KKS-011 (I-157, 150 mg, 508 μmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5 mL) gelöst und Oxalylchlorid (87.0 μL, 1.02 mmol) sowie eine katalytische Menge DMF bei 0 °C zugetropft. Die Lösung wurde 4 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel i. Vak. entzogen. Der Rückstand wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem Toluol (5 mL) und trockenem DMF (1 mL) gelöst, 5-(3-Aminophenyl)-1H-tetrazol (204 mg, 1.27 μmol) zugegeben und die Lösung 17 h bei Reflux gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel

i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C18 (Wasser/Acetonitril 9:1 → 1:9) aufgereinigt. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (21.0 mg, 47.9  $\mu$ mol, 9 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 9.35 (s, 1H, NH), 8.40 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-5), 7.74-7.66 (m, 2H, H-20, H-22), 7.60 (s, 1H, H-18), 7.37 (d,  $^3J_{10,11}$  = 7.5 Hz, 1H, H-10), 7.27 (t,  $^3J_{20,21}$  =  $^3J_{21,22}$  = 7.8 Hz, 1H, H-21), 7.23-7.15 (m, 2H, H-11, H-13), 7.12 (t,  $^3J_{11,12}$  =  $^3J_{12,13}$  = 7.1 Hz, 1H, H-12) 5.31 (hept,  $^3J_{7,8}$  = 6.7 Hz, 1H, H-7), 2.34 (s, 3H, H-15), 1.54 (d,  $^3J_{7,8}$  = 6.7 Hz, 6H, H-8) ppm;

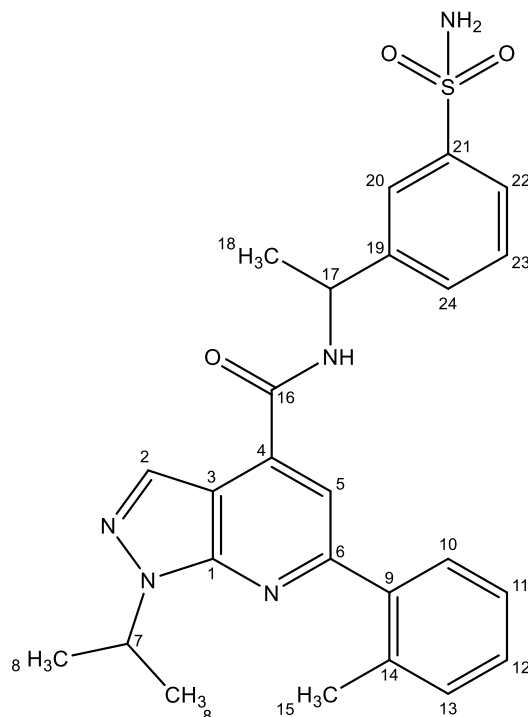
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 164.4 (C-16), 159.1 (C-6), 155.8 (C-23), 149.7 (C-1), 138.7 (C-14), 138.0 (C-17), 136.4 (C-9), 135.7 (C-19), 131.6 (C-2), 130.1 (C-21), 129.9 (C-10), 131.0, 129.0 (C-11, C-13), 125.8 (C-12), 124.1, 124.0 (C-20, C-22), 123.8 (C-3), 119.6 (C-5), 116.1 (C-18), 111.1 (C-4), 49.8 (C-7), 22.0 (C-8), 20.5 (C-15) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 6.659 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 439.05  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 439.1989  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 439.1989 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3480, 3138, 2932, 1779, 1486, 1322, 596  $\text{cm}^{-1}$ .

**1-Isopropyl-N-(1-(3-sulfamoylphenyl)ethyl)-6-(o-tolyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]-pyridine-4-carboxamide (I-158, KKS-016)**



**KKS-011 (I-157, 100 mg, 341  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5 mL) gelöst und Oxalylchlorid (58.0  $\mu$ L, 685  $\mu$ mol) sowie eine katalytische Menge DMF

bei 0 °C zugetropft. Die Lösung wurde 4 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel i. Vak. entzogen. Der Rückstand wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem Toluol (5 mL) und trockenem DMF (1 mL) gelöst, 4-(1-Aminoethyl)phenylsulfonamid (101 mg, 514 µmol) zugegeben und die Lösung 17 h bei Reflux gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C18 (Wasser/Acetonitril 9:1 → 1:9) aufgereinigt. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (63,0 mg, 134 µmol, 39 %) erhalten.

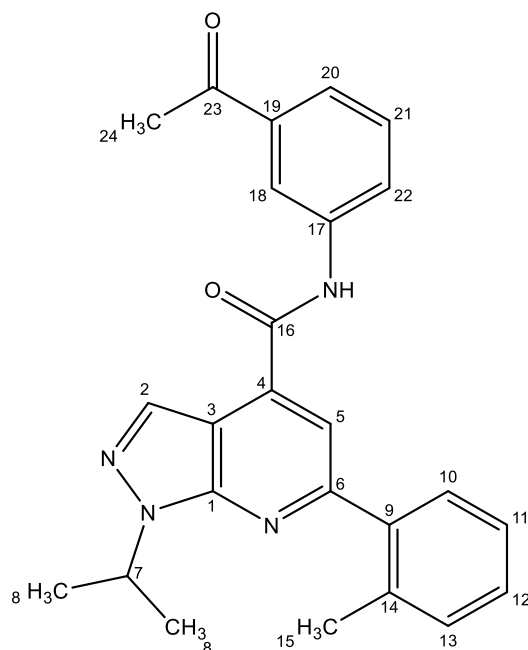
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 8.32 (s, 1H, *H*-2), 8.01 (s, 1H, *H*-20), 7.85-7.79 (m, 1H, *H*-22), 7.73-7.67 (m, 2H, *H*-5, *H*-24), 7.59-7.51 (m, 2H, *H*-10, *H*-23), 7.23-7.15 (m, 3H, *H*-11, *H*-12, *H*-13), 5.44-5.28 (m, 2H, *H*-7, *H*-17), 2.34 (s, 3H, *H*-15), 1.65 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>17,18</sub> = 7.1 Hz, 3H, *H*-18), 1.57-1.53 (m, 6H, *H*-8) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 165.7 (C-16), 159.5 (C-6), 149.8 (C-3), 144.9 (C-19), 143.7 (C-14), 139.4 (C-1), 136.3 (C-9), 136.0 (C-21), 131.4 (C-2), 129.6 (C-24), 129.2 (C-23), 128.8 (C-10), 130.5, 128.4, 125.5 (C-11, C-12, C-13), 124.4 (C-22), 123.3 (C-20), 115.4 (C-5), 111.1 (C-4), 49.3 (C-17), 48.7 (C-7), 20.7 (C-8), 20.4 (C-18), 19.7 (C-15) ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 9.015 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 478.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 478.1911 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 478.1907 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3248, 2978, 2931, 1644, 1522, 1154, 587 cm<sup>-1</sup>.

***N*-(3-Acetylphenyl)-1-isopropyl-6-(*o*-tolyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-4-carboxamide (I-159, KKS-021)**

**KKS-011 (I-157, 100 mg, 341  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5 mL) gelöst und Oxalylchlorid (87.0  $\mu$ L, 1.02 mmol) sowie eine katalytische Menge DMF bei 0 °C zugetropft. Die Lösung wurde 4 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel i. Vak. entzogen. Der Rückstand wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem Toluol (5 mL) und trockenem DMF (1 mL) gelöst, 3-Aminoacetophenon (103 mg, 684  $\mu$ mol) zugegeben und die Lösung 17 h bei Reflux gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C18 (Wasser/Acetonitril 9:1  $\rightarrow$  1:9) aufgereinigt. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (117 mg, .267  $\mu$ mol, 83 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.51 (s, 1H, *H*-2), 8.24 (s, 1H, *H*-16), 8.16 (d,  $^3J_{20,22}$  = 7.8 Hz, 1H, *H*-20), 7.78 (d,  $^3J_{20,22}$  = 7.8 Hz, 1H, *H*-22), 7.70 (s, 1H, *H*-5), 7.56-7.51 (m, 2H, *H*-10, *H*-21), 7.43-7.25 (m, 3H, *H*-11, *H*-12, *H*-13), 5.44 (hept,  $^3J_{7,8}$  = 6.7 Hz, 1H, *H*-7), 2.58 (s, 3H, *H*-24), 2.48 (s, 3H, *H*-15), 1.66 (d,  $^3J_{7,8}$  = 6.7 Hz, 6H, *H*-8) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 198.1 (*C*-24), 163.9 (*C*-16), 158.9 (*C*-6), 158.6 (*C*-19), 149.9 (*C*-1), 139.2 (*C*-14), 137.9 (*C*-17), 137.8 (*C*-9), 131.4 (*C*-2), 129.9 (*C*-10), 129.6 (*C*-

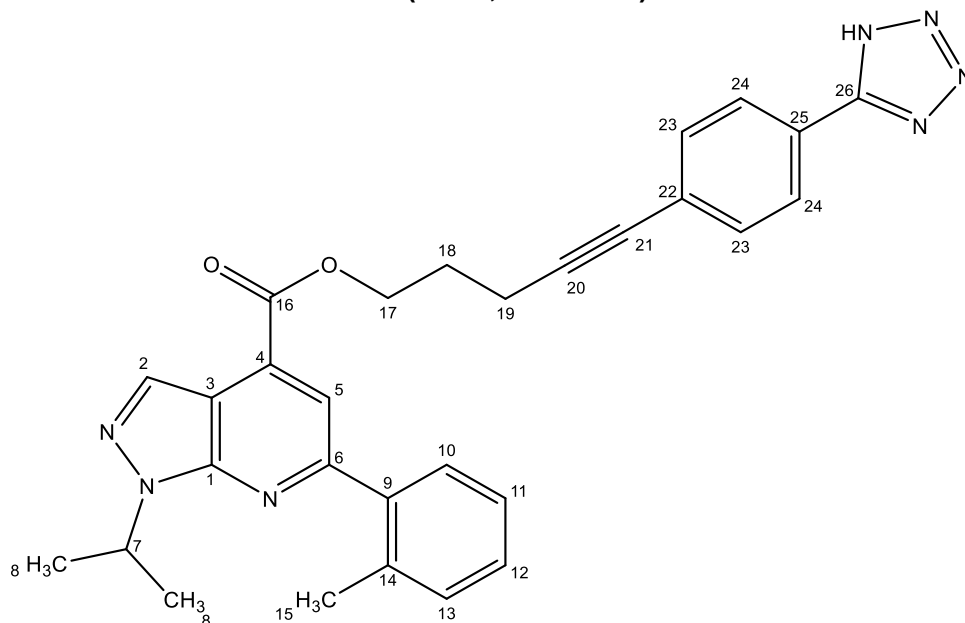
23), 131.3, 129.2, 126.1 (C-11, C-12, C-13), 128.3 (C-3), 125.2 (C-22), 125.2 (C-20) 119.9 (C-18), 115.9 (C-5), 111.1 (C-4), 49.3 (C-7), 26.6 (C-24), 22.1 (C-8), 20.7 (C-15) ppm;

**LCMS:**  $t_R = 10.937$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 411.10 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 435.1793$  [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 435.1791$  für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2979, 2924, 1653, 1569, 1488, 726$  cm<sup>-1</sup>.

**5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl-1-isopropyl-6-(*o*-tolyl)-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-4-carbonsäureester (I-160, KKS-064)**



**KKS-011 (I-157, 98.3 mg, 332  $\mu$ mol), KKS-023 (I-36, 83.6 mg, 366  $\mu$ mol), DMAP (44.7 mg, 371  $\mu$ mol) und DIC (52.0  $\mu$ L, 298  $\mu$ mol) wurden unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5 mL) gelöst und für 17 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/DCM/EtOH/AcOH 30:68:2:1) aufgereinigt. Es wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (116 mg, .231  $\mu$ mol, 69 %) erhalten.**

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta = 8.43$  (s, 1H, H-2), 7.92 (d,  $^3J_{23,24} = 7.5$  Hz, 2H, H-24), 7.82 (s, 1H, H-5), 7.54-7.39 (m, 3H, H-10, H-23), 7.39-7.28 (m, 3H, H-11, H-12, H-13), 5.23 (hept,  $^3J_{7,8} = 6.7$  Hz, 1H, H-7), 4.59 (t,  $^3J_{17,18} = 5.9$  Hz, 2H, H-17), 2.69 (t,  $^3J_{18,19} = 6.8$  Hz, 2H, H-19), 2.36 (s, 3H, H-15), 2.23-2.07 (m, 2H, H-118), 1.51 (d,  $^3J_{7,8} = 6.6$  Hz, 6H, H-8) ppm;

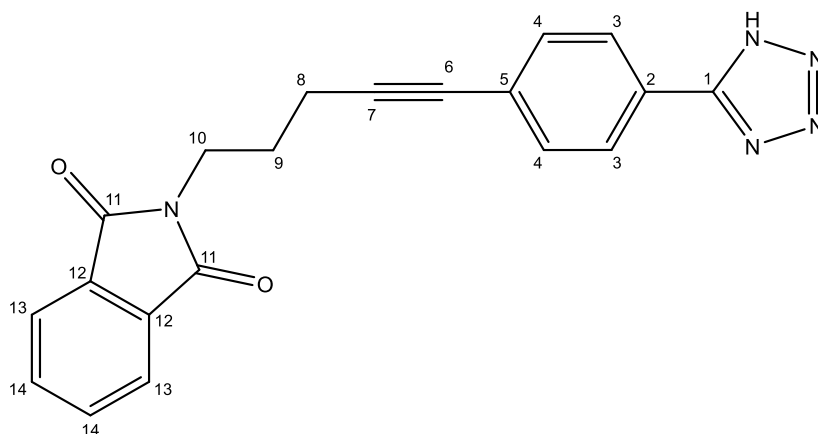
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 164.6 (C-16), 158.2 (C-6), 155.1 (C-26), 149.7 (C-1), 138.9 (C-9), 135.8 (C-14), 132.0 (C-23), 131.6 (C-2), 130.9, 128.8, 126.1 (C-11, C-12, C-13), 130.8 (C-3), 129.9 (C-10), 126.8 (C-24), 125.6 (C-22), 123.6 (C-25), 118.0 (C-5), 111.0 (C-4), 92.2 (C-20), 80.3 (C-21), 64.7 (C-17), 48.6 (C-7), 27.0 (C-18), 21.8 (C-8), 20.2 (C-15), 15.9 (C-19) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 11.0 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 506.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 506.2298  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 506.2299 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2979, 2924, 1653, 1569, 1488, 726  $\text{cm}^{-1}$ .

**2-(5-(4-(1H-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)-phthalimid (I-161, KKS-159)**



**KKS-023 (I-36, 900 mg, 3.94 mmol)** wurde unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre in trockenem DCM (10.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (826 mg, 4.34 mmol), DMAP (530 mg, 4.34 mmol) und DIPEA (800  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (2x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF (10 mL) gelöst und unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre nach 2 h bei RT zu einer Lösung von Kaliumphthalimid (1.02 g, 5.51 mmol) und [18]Krone-6 (1.56 g, 5.90 mmol) in trockenem DMF (10.0 mL) gegeben. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, danach mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Es wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgeld (Cyclohexan/EE 80:20) ein farblos-kristalliner Feststoff (857 mg, 2.40 mmol, 61 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.95-7.90 (m, 2H, *H*-3), 7.87-7.75 (m, 4H, *H*-13, *H*-14), 7.37-7.31 (m, 2H, *H*-4), 3.75 (d,  $^3J_{9,10}$  = 6.8 Hz, 2H, *H*-10), 3.11 (q,  $^3J_{\text{Triethylammonium}}$  = 7.3 Hz, 2H,  $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_3$ ), 2.56-2.51 (m, 2H, *H*-8), 1.92 (quin,  $^3J_{8,9} = ^3J_{9,10} = 6.8$  Hz, 2H, *H*-9), 1.18 (t,  $^3J_{\text{Triethylammonium}}$  = 7.3 Hz, 2H,  $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_3$ ) ppm;

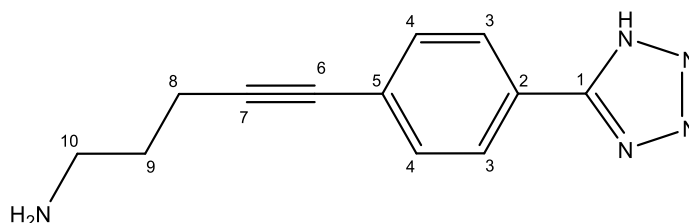
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 168.0 (C-11), 156.3 (C-1), 134.3 (C-13), 131.8 (C-4), 131.7 (C-12), 126.6 (C-3), 125.5 (C-2), 124.6 (C-5), 123.0 (C-14), 91.9 (C-7), 80.3 (C-6), 45.7 ( $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_3$ ), 36.9 (C-10), 26.6 (C-9), 16.6 (C-8), 8.6 ( $\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_3$ ) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 7.467 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 358.05 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 358.1296 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 358.1299 für [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1366, 1216, 841, 720  $\text{cm}^{-1}$ .

### 1-Amino-5-(4-(1*H*-tetrazol-5-yl)phenyl)-pent-4-in (I-162, KKS-196)



**KKS-159 (I-161)**, 61.0 mg, 171  $\mu\text{mol}$  wurde in EtOH (3 mL) suspendiert und mit Hydrazin Monohydrat (39.0  $\mu\text{l}$ , 855  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Lösung wurde 3 h bei Reflux gerührt, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entzogen. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an C18 ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  100 $\rightarrow$ 50:50) wurde ein farblos-kristalliner Feststoff (23.0 mg, 101  $\mu\text{mol}$ , 59 %) erhalten.

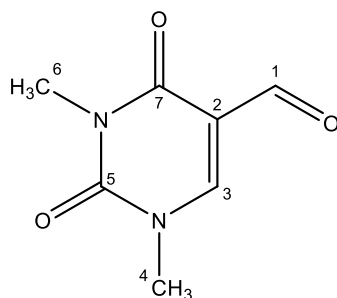
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.97 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.0 Hz, 2H, *H*-3), 7.41 (d,  $^3J_{3,4}$  = 8.1 Hz, 2H, *H*-4), 3.53 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.00 (t,  $^3J_{9,10}$  = 7.4 Hz, 2H, *H*-10), 2.57 (t,  $^3J_{8,9}$  = 6.9 Hz, 2H, *H*-8), 1.94-1.74 (m, 2H, *H*-9) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 160.0 (C-1), 132.0 (C-2), 131.4 (C-4), 125.8 (C-3), 121.3 (C-5), 89.1 (C-7), 81.5 (C-6), 38.2 (C-10), 26.2 (C-9), 16.0 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 1.576 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 228.05 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 228.1243 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 228.1244 für [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1546, 1445, 1366, 1216, 835, 761  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-Formyl-1,3-dimethyluracil (I-164, KKS-192)<sup>[185]</sup>**

1,3-Dimethyluracil (1.00 g, 7.13 mmol) wurde bei 0 °C zu einer Lösung aus Phosphorylchlorid (6.70 mL, 7.15 mmol) in trockenem DMF (5.0 mL) gegeben. Die Lösung wurde auf 90 °C erwärmt und nach 1 h das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in kaltem Wasser suspendiert und mit 5%iger NaOH-Lsg. neutralisiert. Die Suspension wurde filtriert und das Rohprodukt aus Petrolether kristallisiert, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (823 mg, 4.90 mmol, 69 %) erhalten wurde.

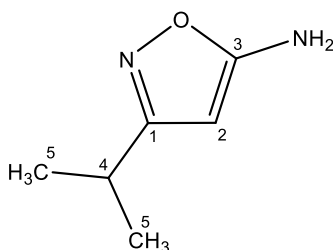
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.81 (s, 1H, *H*-1), 8.54 (s, 1H, *H*-3), 3.44 (s, 3H, *H*-6), 3.19 (s, 3H, *H*-4) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 186.5 (C-1), 161.6 (C-6), 150.8 (C-7), 109.4 (C-2), 37.3 (C-4), 27.3 (C-6) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 2.6 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 169.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 191.0429 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 191.0427 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1650, 1365, 1216, 756, 516 cm<sup>-1</sup>.

**3-Isopropylisoxazol-5-amin (I-166, KKS-197)<sup>[186]</sup>**

4-Methyl-3-oxopentannitril (1.00 g, 9.0 mmol) wurde in einer Wasser/Ethanol-Mischung (1:1, 5.00 mL) gelöst und mit NaOH (485 mg, 12.1 mmol) und Hydroxylamin Hydrochlorid (843 mg, 12.14 mmol) versetzt. Nach 15 h bei 80 °C wurde das LM i. Vak. entfernt, danach der Rückstand in DCM (50 mL) gelöst und mit Wasser (2x 50 mL) sowie ges. NaCl-Lsg. (2x 50 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat

getrocknet, filtriert und das LM i. Vak. entfernt. Es wurde ein oranger Feststoff (810 mg, 6.42 mmol, 71 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 4.91 (s, 1H, *H*-2), 4.13 (s, 1H, *NH*<sub>2</sub>), 2.70 (hept, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5</sub> = 6.9 Hz, 1H, *H*-4), 1.09 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5</sub> = 6.9 Hz, 6H, *H*-5) ppm;

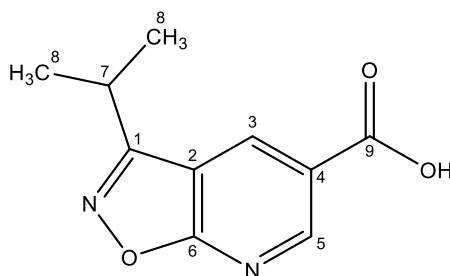
**<sup>13</sup>C-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 171.8 (C-1), 170.7 (C-3), 76.8 (C-2), 27.0 (C-4), 22.3 (C-5) ppm;

**LCMS:** *t*<sub>R</sub> = 3.111 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 127.10 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:** *m/z* = 127.0866 [M+H]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 127.0866 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2969, 1738, 1636, 1366, 1216, 757, 527 cm<sup>-1</sup>.

### 3-Isopropylisoxazolo[5,4-*b*]pyridine-5-carbonsäure (I-167, KKS-199)<sup>[186]</sup>



**KKS-197 (I-166,** 900 mg, 7.14 mmol) und **KKS-192 (I-164,** 1.00 g, 5.95 mmol) wurden in Essigsäure (20.0 mL) gelöst und für 2 h unter Reflux gerührt. Es wurde konz. HCl (8.00 mL) zugegeben und weitere 4 h unter Reflux gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde aus MeOH kristallisiert, wodurch ein gelb-kristalliner Feststoff (941 mg, 4.56 mmol, 77 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.14-9.11 (m, 1H, *H*-5), 8.93-8.90 (m, 1H, *H*-3), 3.59-3.41 (m, 1H, *H*-7), 1.41 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5</sub> = 7.0 Hz, 6H, *H*-8) ppm;

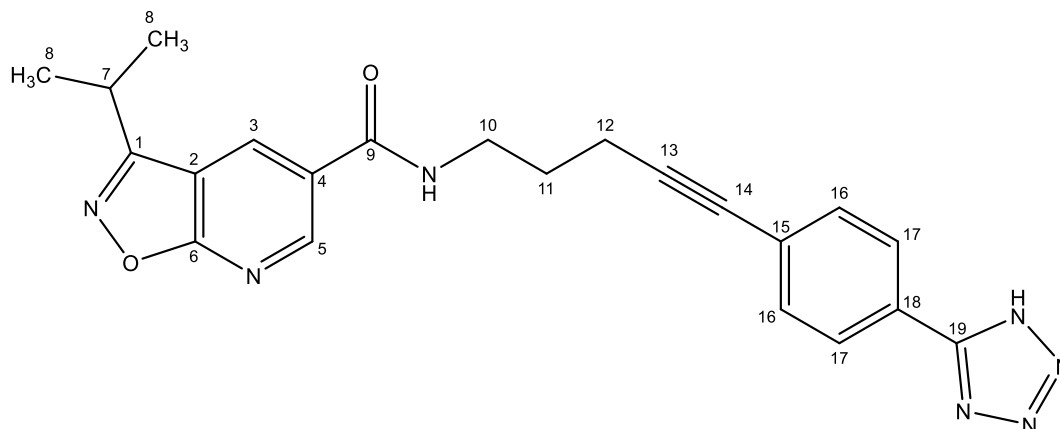
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 170.7 (C-9), 165.6 (C-6), 164.6 (C-1), 152.2 (C-5), 134.9 (C-3), 123.7 (C-2), 112.0 (C-4), 26.7 (C-7), 20.6 (C-8) ppm;

**LCMS:** *t*<sub>R</sub> = 5.243 min (Methode 1); *m/z* (% relative Intensität) = 205.00 [M-H]<sup>-</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** *m/z* = 205.0619 [M-H]<sup>-</sup> (ber. *m/z* = 205.0619 für [M-H]<sup>-</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1737, 1656, 1356, 1216, 769, 513  $\text{cm}^{-1}$ .

***N*-(5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)-3-isopropylisoxazolo-[5,4-*b*]-pyridin-5-carboxamid (I-168, KKS-201)**



**KKS-199 (I-167, 80.0 mg, 387  $\mu\text{mol}$ ), KKS-196 (I-162, 96.9 mg, 426  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (700  $\mu\text{L}$ ) und HATU (368 mg, 969  $\mu\text{mol}$ )** wurden unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (5 mL) gelöst und für 17 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/DCM/EtOH 65:32:3) aufgereinigt. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (85.5 mg, .204  $\mu\text{mol}$ , 53 %) erhalten.

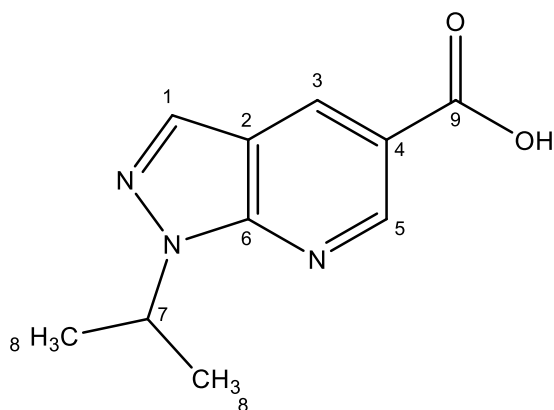
**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.11-9.08 (m, 1H, *H*-5), 8.90-8.87 (m, 1H, *H*-3), 8.00-7.96 (m, 2H, *H*-17), 7.60-7.55 (m, 2H, *H*-16), 3.52-3.40 (m, 3H, *H*-7, *H*-10), 2.59 (t,  $^3J_{11,12}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-12), 1.89 (quint,  $^3J_{10,11}$  =  $^3J_{11,12}$  = 6.9 Hz, 2H, *H*-11), 1.46-1.41 (m, 6H, *H*-8) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 170.0 (C-9), 164.4 (C-1), 164.0 (C-6), 155.1 (C-19), 150.7 (C-5), 132.3 (C-3), 132.1 (C-16), 127.0 (C-17), 126.6 (C-2), 125.9 (C-15), 123.5 (C-18), 111.3 (C-4), 93.0 (C-13), 80.2 (C-14), 38.7 (C-10), 28.0 (C-11), 26.8 (C-7), 20.5 (C-8), 16.6 (C-12) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 7.143 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 416.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 416.1831  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 416.1829 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3276, 2969, 2636, 1626, 1613, 1561, 1275, 751  $\text{cm}^{-1}$ .

**1-Isopropyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-carbonsäure (I-169, KKS-194)<sup>[186]</sup>**

**KKS-007 (I-153, 372 mg, 2.97 mmol)** und **KKS-192 (I-164, 500 mg, 2.97 mmol)** wurden in Essigsäure (20.0 mL) gelöst und für 2 h unter Reflux gerührt. Es wurde konz. HCl (8.00 mL) zugegeben und weitere 4 h unter Reflux gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde aus MeOH kristallisiert, wodurch ein gelb-kristalliner Feststoff (421 mg, 2.05 mmol, 69 %) erhalten wurde.

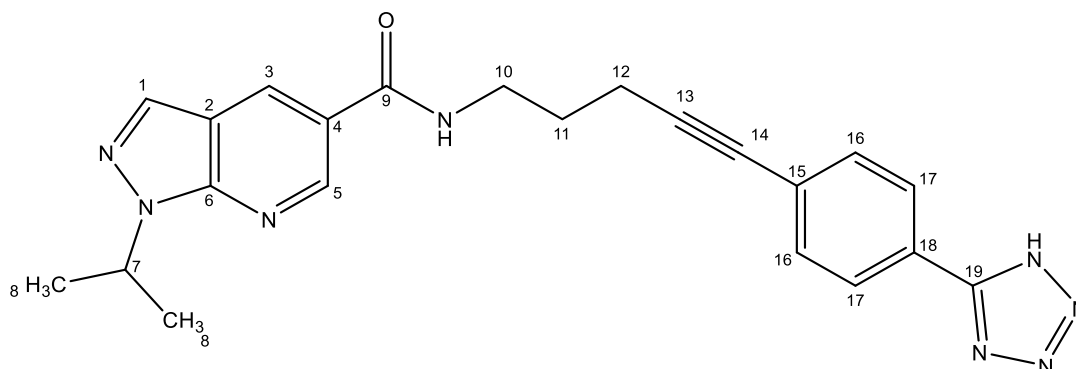
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.06-9.03 (m, 1H, *H*-5), 8.82-8.89 (m, 1H, *H*-3), 8.30 (s, 1H, *H*-1), 5.26-5.21 (m, 1H, *H*-7), 1.51-1.48 (m, 6H, *H*-8) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 167.1 (C-9), 150.5 (C-5), 150.0 (C-6), 134.1 (C-1), 133.3 (C-3), 120.5 (C-2), 115.2 (C-4), 48.9 (C-7), 22.3 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 5.015 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 206.05 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 206.0920 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 206.0924 für [M+H]<sup>+</sup>).

***N*-(5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)-1-isopropyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-5-carboxamide (I-170, KKS-198)**



**KKS-194 (I-169**, 20.0 mg, 487  $\mu\text{mol}$ ), **KKS-196 (I-162**, 30.0 mg, 132  $\mu\text{mol}$ ), DIPEA (700  $\mu\text{L}$ ) und HATU (370 mg, 974  $\mu\text{mol}$ ) wurden unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (5 mL) gelöst und für 17 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/DCM/EtOH 65:32:3) aufgereinigt. Es wurde ein gelb-kristalliner Feststoff (84.8 mg, .204  $\mu\text{mol}$ , 42 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$** : (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.03-8.98 (m, 1H, *H*-5), 8.78-8.66 (m, 1H, *H*-3), 8.28 (s, 1H, *H*-1), 8.02-7.92 (m, 2H, *H*-17), 7.63-7.50 (m, 2H, *H*-16), 5.23 (hept,  $^3J_{7,8}$  = 6.7 Hz, 1H, *H*-7), 3.53-3.44 (m, 2H, *H*-10), 2.58 (t,  $^3J_{11,12}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-12), 1.94-1.81 (m, 2H, *H*-11), 1.50 (d,  $^3J_{7,8}$  = 6.7 Hz, 6H, *H*-8) ppm;

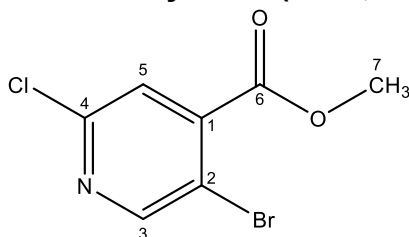
**$^{13}\text{C-NMR}$** : (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 165.2 (C-9), 149.5 (C-6), 148.1 (C-5), 138.3 (C-2), 133.1 (C-1), 132.1 (C-16), 130.0 (C-3), 127.0 (C-17), 125.9 (C-15), 123.7 (C-18), 114.3 (C-4), 93.1 (C-13), 80.1 (C-14), 48.3 (C-7), 38.6 (C-10), 28.0 (C-11), 21.8 (C-8), 16.6 (C-12) ppm;

**LCMS**:  $t_{\text{R}}$  = 6.661 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 413.05 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (100);

**HR-ESI-MS**:  $m/z$  = 437.1808 [ $\text{M+Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 437.1809 für [ $\text{M+Na}$ ] $^+$ );

**IR (ATR)**:  $\tilde{\nu}$  = 3277, 2970, 1738, 1614, 1544, 1496, 1261, 750, 535  $\text{cm}^{-1}$ .

## 9.2.1.6 MRTX0902 Analogon

5-Bromo-2-chloroisonicotinsäuremethylester (I-177, KKS-202)<sup>[187]</sup>

5-Bromo-2-chloroisonicotinsäure (5.00 g, 21.2 mmol) wurde in trockenem MeOH (30.0 mL) gelöst und  $\text{SOCl}_2$  (2.00 mL, 26.9 mmol) langsam zugetropft. Die Lösung wurde 4 h bei Reflux gerührt, danach das LM i. Vak. entfernt und mit Ethylacetat verdünnt. Die org. Phase wurde mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (3x 50 mL) und ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. (3x 100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das LM i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 80:20) aufgereinigt, wodurch ein farbloses Öl (5.15 g, 20.6 mmol, 97 %) erhalten wurde.

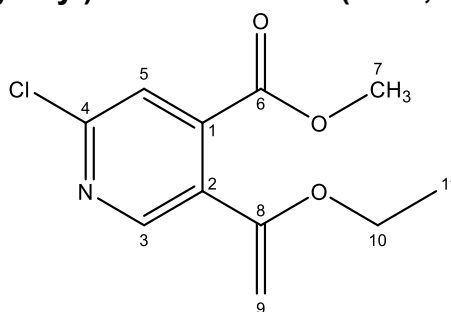
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta = 8.86\text{-}8.70$  (m, 1H, *H*-3), 7.91-7.74 (m, 1H, *H*-5), 3.91 (s, 3H, *H*-7), ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta = 163.5$  (C-6), 152.9 (C-3), 149.7 (C-4), 142.3 (C-1), 124.7 (C-5), 116.6 (C-2), 53.3 (C-7) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}} = 6.826$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 251.85  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z = 249.9265$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z = 249.9265$  für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

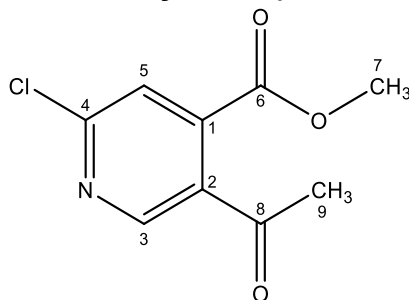
**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2953, 1739, 1571, 1432, 1336, 1265, 1109, 961, 780$   $\text{cm}^{-1}$ .

Methyl-2-chlor-5-(1-ethoxyvinyl)isonicotinsäure (I-178, KKS-203)<sup>[187]</sup>

**KKS-202 (I-177,** 1.45 g, 5.79 mmol), Tributyl(1-ethoxyvinyl)zinn (2.05 mL, 6.08 mmol) und  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  wurden in entgastem Dioxan (10.0 mL) gelöst und für 17 h bei 80 °C gerührt. Danach wurde mit Ethylacetat verdünnt und über Celite filtriert. Es wurde nacheinander mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (3x 50 mL) und ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. (3x 50 mL) gewaschen. Die wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert, die

vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das LM i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 10:0 → 5:1) aufgereinigt und der farblose Feststoff (1.34 g, 5.55 mmol, 96 %) direkt weiter umgesetzt.

### 5-Acetyl-2-chloroisonicotinsäuremethylester (I-179, KKS-204)<sup>[187]</sup>



Das Rohprodukt wurde in THF (10.0 mL) gelöst und mit konz. HCl (12.5 mL) versetzt. Es wurde 17 h bei RT gerührt, danach mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. (3x 50 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 100 mL) gewaschen. Die wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert, die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das LM i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 80:20) aufgereinigt, wodurch ein farbloser Feststoff (997 mg, 4.67 mmol, 84 % über zwei Schritte) erhalten wurde.

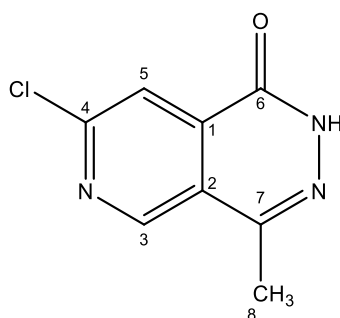
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 8.98 (m, 1H, *H*-3), 7.91-7.68 (m, 1H, *H*-5), 3.86 (s, 3H, *H*-7), 2.63 (s, 3H, *H*-9) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 197.5 (C-8), 165.5 (C-6), 153.3 (C-4), 150.5 (C-3), 142.3 (C-1), 131.3 (C-2), 122.7 (C-5), 53.0 (C-7), 28.5 (C-9) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 5.115 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 213.95 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-APCI-MS:**  $m/z$  = 214.0268 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 214.0265 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1732, 1685, 1530, 1430, 1366, 1230, 1114, 959, 766 cm<sup>-1</sup>.

**7-Chloro-4-methylpyrido[3,4-*d*]pyridazin-1(2*H*)-on (I-180, KKS-205)<sup>[187]</sup>**

**KKS-204 (I-179)**, 1.87 g, 8.75 mmol) wurde in Ethanol gelöst und mit Hydrazin Monohydrat (651  $\mu$ L, 13.1 mmol) versetzt. 20 min bei Reflux wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 30 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  7:3) aufgereinigt, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (1.30 g, 6.67 mmol, 76 %) erhalten wurde.

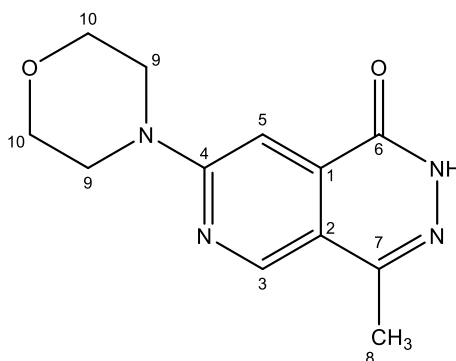
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.69 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, H-3), 8.07 (s, 1H, H-5), 2.58 (s, 3H, H-8) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 157.3 (C-6), 151.4 (C-4), 150.4 (C-3), 142.2 (C-7), 135.3 (C-1), 123.5 (C-2), 118.5 (C-5), 17.9 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 3.686 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 195.95 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 194.0130 [M-H]<sup>-</sup> (ber.  $m/z$  = 194.0127 für [M-H]<sup>-</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1670, 1548, 1447, 1374, 1216, 772  $\text{cm}^{-1}$ .

**7-Morpholino-4-methylpyrido[3,4-*d*]pyridazin-1(2*H*)-on (I-181, KKS-208)<sup>[187]</sup>**

**KKS-205 (I-180)**, 833 mg, 4.26 mmol), Morpholin (557  $\mu$ L, 6.39 mmol) und DIPEA (870  $\mu$ L) wurden in Ethanol gelöst und bei Reflux für 20 min gerührt. Danach wurde die

Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 30 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1 → 7:3) aufgereinigt, wodurch ein gelblich-kristalliner Feststoff (970 mg, 3.92 mmol, 92 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 12.26 (s, 1H, NH), 8.88 (s, 1H, H-3), 7.22 (s, 1H, H-5), 3.87-3.60 (m, 8H, H-9, H-10), 2.47 (s, 3H, H-8) ppm;

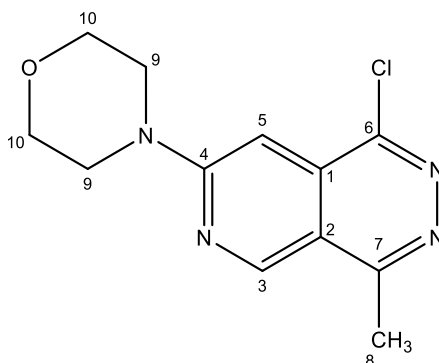
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.4 (C-4), 158.6 (C-6), 148.8 (C-3), 142.6 (C-7), 134.7 (C-1), 115.6 (C-2), 100.0 (C-5), 65.8, 44.9 (C-9, C-10), 17.6 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 4.623 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 247.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 269.1009 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 269.1009 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1738, 1662, 1544, 1435, 1366, 777 cm<sup>-1</sup>.

### 7-Morpholino-1-chloro-4-methylpyrido[3,4-d]pyridazin (I-182, KKS-209)<sup>[187]</sup>



**KKS-208 (I-181,** 770 mg, 3.16 mmol) wurde für 3 h in Phosphorylchlorid (5,70 mL, 6.25 mmol) bei 110 °C gerührt und danach auf RT abgekühlt. Die Lösung wurde auf Eis (50 mL) gegeben und mit NaCO<sub>3</sub> auf pH = 8 eingestellt. Die wässr. Phase wurden mit Ethylacetat (5x 30 mL) extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1 → 7:3) aufgereinigt, wodurch ein gelb-kristalliner Feststoff (708 mg, 2.67 mmol, 86 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.26 (s, 1H, H-3), 6.86 (s, 1H, H-5), 3.92-3.63 (m, 8H, H-9, H-10), 2.81 (s, 3H, H-8) ppm;

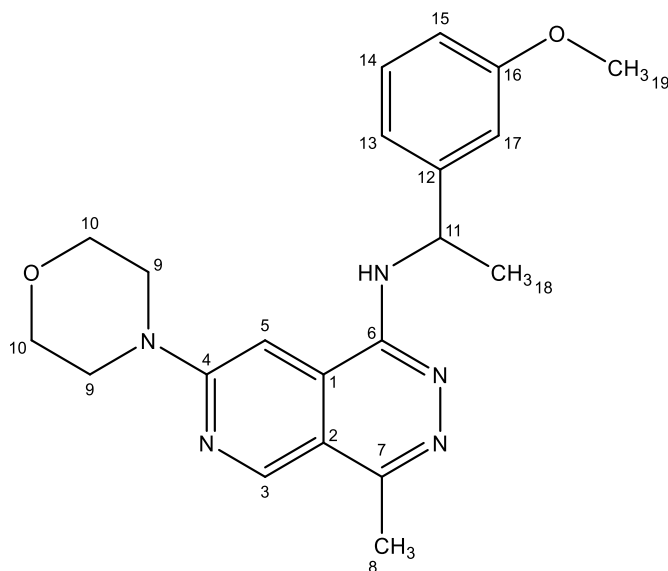
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.5 (C-4), 156.9 (C-7), 152.0 (C-6), 151.0 (C-3), 130.8 (C-1), 114.2 (C-2), 92.8 (C-5), 65.7, 44.6 (C-9, C-10), 18.2 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_R = 4.610$  min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 265.00  $[M+H]^+$  (100);

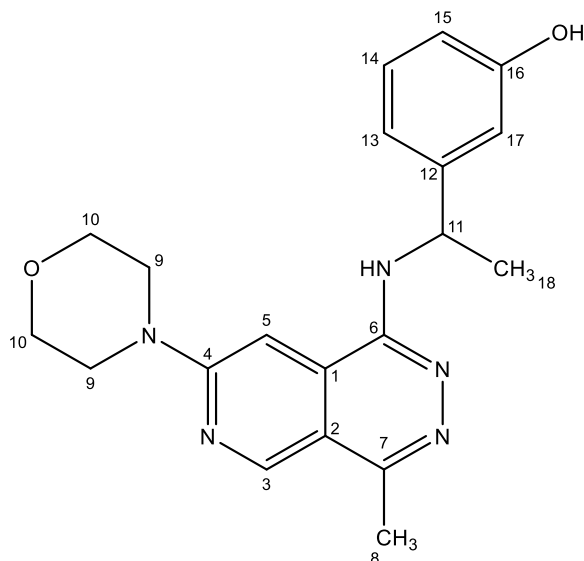
**HR-ESI-MS:**  $m/z = 265.0852$   $[M+H]^+$  (ber.  $m/z = 265.0851$  für  $[M+H]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 2970, 1738, 1602, 1367, 1215, 1117, 829$   $\text{cm}^{-1}$ .

***N*-(1-(3-Methoxyphenyl)ethyl)-4-methyl-7-morpholinopyrido[3,4-*d*]pyridazin-1-amin (I-183, KKS-230)**



**KKS-209 (I-182,** 170 mg, 642  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter Ar-Atmosphäre mit 3-(1-Aminoethyl)phenol (124  $\mu\text{L}$ , 770  $\mu\text{mol}$ ), Palladiumacetat (10.1 mg, 45.0  $\mu\text{mol}$ ), RuPhos (29.9 mg, 64.2  $\mu\text{mol}$ ) und Caesiumcarbonat (627 mg, 1.93 mmol) in entgastem 1,4-Dioxan (10 mL) gelöst und für 17 h bei Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  7:3) aufgereinigt und der gelb-kristalline Feststoff (198 mg, 522  $\mu\text{mol}$ , 81 %) direkt weiter umgesetzt.

**3-(1-((4-Methyl-7-morpholinopyrido[3,4-d]pyridazin-1-yl)amino)ethyl)phenol (I-184, KKS-249)**


**KKS-230 (I-183, 100 mg, 264  $\mu$ mol)** wurde in DCM (2 mL) gelöst und bei RT mit 1 M Bortribromid in DCM (30.0  $\mu$ l, 316  $\mu$ mol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 17 h bei RT gerührt und danach mit Ethylacetat verdünnt. Die org. Phase wurde nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 5 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (82.0 mg, 224  $\mu$ mol, 85 %) erhalten.

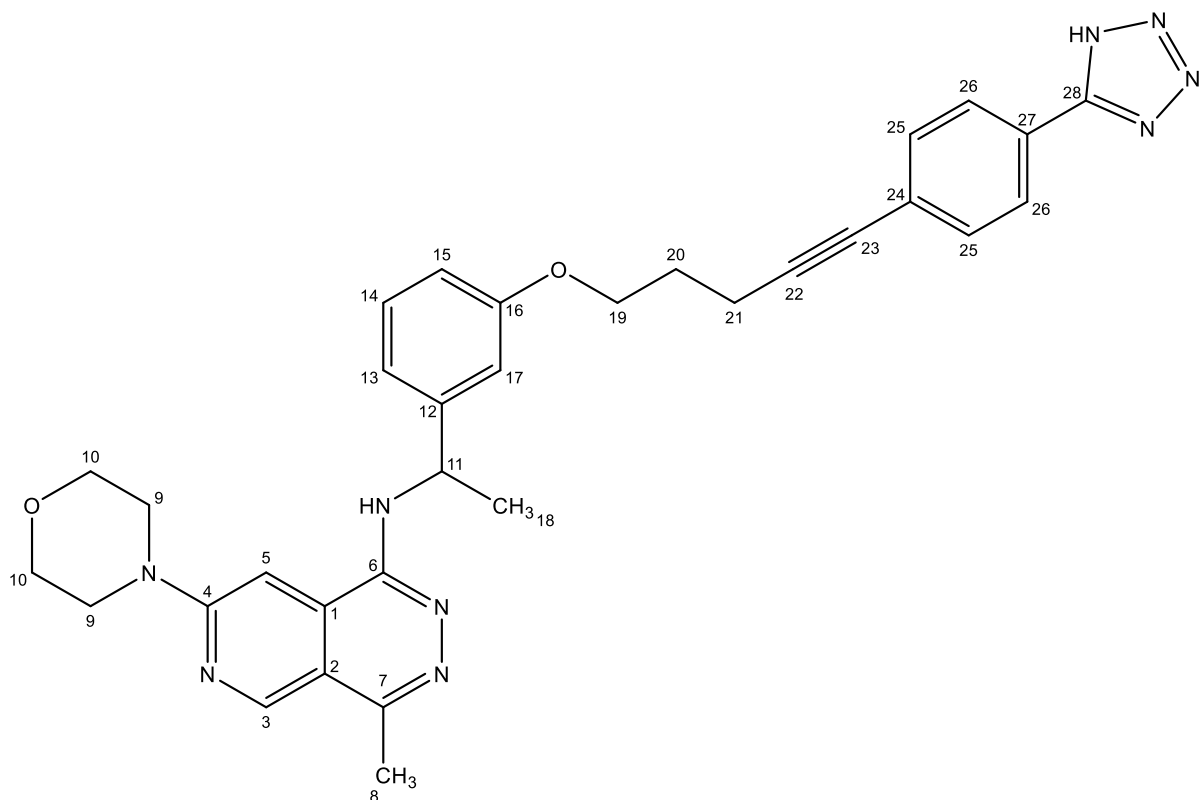
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.02 (s, 1H, *H*-3), 8.18 (s, 1H, *OH*), 7.42 (s, 1H, *H*-5), 7.08 (t,  $^3J_{13,14} = ^3J_{14,15} = 7.8$  Hz, 1H, *H*-14), 6.88-6.74 (m, 2H, *H*-13, *H*-17), 6.63-6.54 (m, 1H, *H*-15), 5.41 (q,  $^3J_{11,18} = 6.8$  Hz, 1H, *H*-11), 3.83-3.65 (m, 8H, *H*-9, *H*-10), 2.59 (s, 3H, *H*-8), 1.56 (d,  $^3J_{11,18} = 7.0$  Hz, 3H, *H*-18) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz, DMSO):  $\delta$  = 159.3 (C-4), 157.2 (C-16), 151.1 (C-6), 148.9 (C-3), 147.1 (C-12), 146.7 (C-2), 129.0 (C-14), 124.8 (C-1), 116.7 (C-13), 114.0 (C-7), 113.2 (C-15), 112.9 (C-17), 93.2 (C-5), 65.8, 45.1 (C-9, C-10), 49.3 (C-11), 22.8 (C-18), 17.9 (C-8) ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}} = 7.4$  min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 366.1877 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 366.1926$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 366.1925$  für [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3380, 1607, 1415, 1236, 1023, 962, 698, 467$   $\text{cm}^{-1}$ .

***N*-(1-(3-((5-(4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl)pent-4-in-1-yl)oxy)phenyl)ethyl)-4-methyl-7-morpholinopyrido[3,4-*d*]pyridazin-1-amin (I-175, KKS-252)**

**KKS-023 (I-36, 45.0 mg, 175  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (5.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (36.8 mg, 193  $\mu$ mol), DMAP (23.6 mg, 192  $\mu$ mol) und DIPEA (30.0  $\mu$ L) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. **KKS-249 (I-184, 57.6 mg, 158  $\mu$ mol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (1 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (7.01 mg, 175  $\mu$ mol) versetzt. Nach 2 h bei RT wurde das Tosylat in DMF (2 mL) gelöst und langsam zu der Lösung getropft. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt und ein farblos-kristalliner Feststoff (47.4 mg, 82.4  $\mu$ mol, 52 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 9.14 (s, 1H, *H*-3), 7.95 (d,  $^3J_{25,26}$  = 8.4 Hz, 2H, *H*-26), 7.51 (s, 1H, *H*-5), 7.44 (d,  $^3J_{25,26}$  = 8.4 Hz, 2H, *H*-25), 7.24 (t,  $^3J_{13,14}$  =  $^3J_{14,15}$  = 7.9 Hz, 1H, *H*-14), 7.06-6.96 (m, 2H, *H*-13, *H*-17), 6.87-6.80 (m, 1H, *H*-15), 5.39-5.26 (m, 1H, *H*-11), 4.10 (t,  $^3J_{19,20}$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-19), 3.81-3.74 (m, 8H, *H*-9, *H*-10), 2.67 (s, 3H, *H*-8), 2.61 (t,  $^3J_{20,21}$  = 7.0 Hz, 2H, *H*-21), 1.99 (quin,  $^3J_{19,20}$  =  $^3J_{20,21}$  = 6.6 Hz, 2H, *H*-20), 1.59 (d,  $^3J_{11,18}$  = 7.0 Hz, 3H, *H*-18) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 160.1 (C-4), 158.6 (C-16), 157.4 (C-28), 151.7 (C-6), 151.2 (C-3), 147.9 (C-2), 146.3 (C-12), 131.7 (C-25), 129.4 (C-14), 127.9 (C-27), 126.3 (C-26), 126.1 (C-1), 123.5 (C-24), 118.2 (C-13), 113.0 (C-7), 112.7 (C-17), 112.1 (C-15), 93.7 (C-5), 90.0 (C-22), 80.8 (C-23), 65.9 (C-19), 65.8, 45.0 (C-9, C-10), 50.1 (C-11), 27.8 (C-20), 22.8 (C-18), 16.2 (C-8), 15.5 (C-21) ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 7.7 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 576.2771 [M+H]<sup>+</sup> (100);

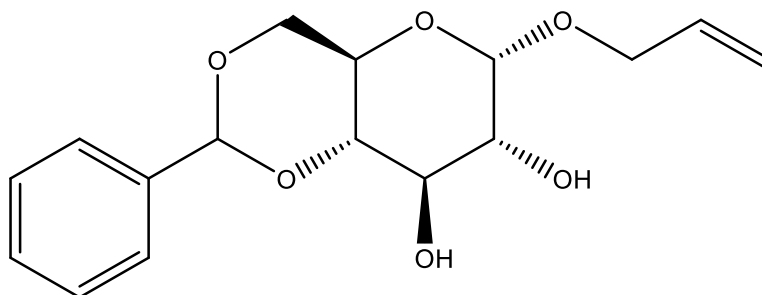
**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 576.2832 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 576.2830 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2853, 1604, 1438, 1237, 1023, 845, 697 cm<sup>-1</sup>.

## 9.2.2 Projekt B: Synthese von trisubstituierten Kohlenhydraten für die SII-Bindestelle

### 9.2.2.1 Orthogonal-geschützte Glucosederivate

#### Allyl-4,6-O-benzyliden- $\alpha$ -D-glucopyranosid (II-21, KKS-218)<sup>[231]</sup>



Allylalkohol (75.0 mL, 1.10 mol) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 0 °C mit frisch destilliertem Acetylchlorid (15.8 mL, 222 mmol) versetzt und 10 min bei gleicher Temperatur rühren lassen. D-Glucose (10.0 g, 55.1 mmol) wurden zu der Lösung gegeben und 90 min bei Reflux gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden Benzaldehyddimethylacetal (20.0 mL, 133 mmol) und Camphersulfonsäure (515 mg, 2.22 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung bei

60 °C unter reduziertem Druck (~100 mbar) für 4 h rühren lassen. Die Reaktionslösung wurde mit Triethylamin neutralisiert, mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit ges. NH<sub>4</sub>Cl (2x 100 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 100 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 100 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat/Triethylamin, 99:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (13.2 g, 42.9 mmol, 39 % über zwei Schritte) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.55-7.50 (m, 2H), 7.43-7.36 (m, 3H), 6.00-5.92 (m, 1H), 5.56 (s, 1H), 5.39-5.33 (m, 1H), 5.30-5.26 (m, 1H), 4.98 (d, <sup>3</sup>J = 3.9 Hz, 1H), 4.33-4.50 (m, 2H), 4.11-4.07 (m, 1H), 3.99 (t, <sup>3</sup>J = 9.5 Hz, 1H), 3.91-3.85 (m, 1H), 3.76 (t, <sup>3</sup>J = 9.9 Hz, 1H), 3.66 (dd, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, <sup>3</sup>J = 3.8 Hz, 1H), 3.52 (t, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz, 1H), ppm;

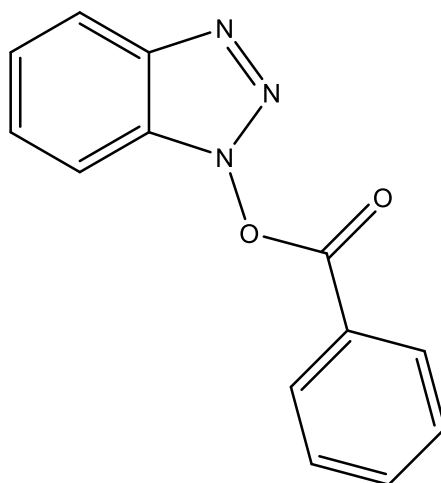
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 137.0, 133.3, 129.2, 128.3, 126.3, 118.3, 101.9, 97.9, 80.9, 72.9, 71.8, 68.9, 62.6 ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 8.032 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 308.95 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** m/z = 331.1152 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. m/z = 331.1152 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3377, 1738, 1372, 1073, 996, 749 cm<sup>-1</sup>.

### 1-Benzoyloxybenzotriazol (KKS-223)<sup>[231]</sup>



Zu einer Lösung aus 1-Hydroxybenzotriazol Monohydrat (20.0 g, 131 mmol) und Triethylamin (20.0 mL, 144 mmol) in Dichlormethan (50 mL) wurde bei 0 °C langsam Benzoylchlorid (15.2 mL, 131 mmol) zugetropft. Nach 4 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit ges. NHCO<sub>3</sub> (2x 100 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 100 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen

wurden mit Dichlormethan (3x 100 mL) extrahiert, die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel i. Vak. Entfernt und das Rohprodukt danach aus Dichlormethan und Petrolether kristallisiert, wodurch ein farblos-kristalliner Feststoff (25.6 g, 107 mmol, 82 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.27 (d, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H), 8.10 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H), 7.77 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (t, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 2H), 7.54 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 1H), 7.49-7.41 (m, 2H) ppm;

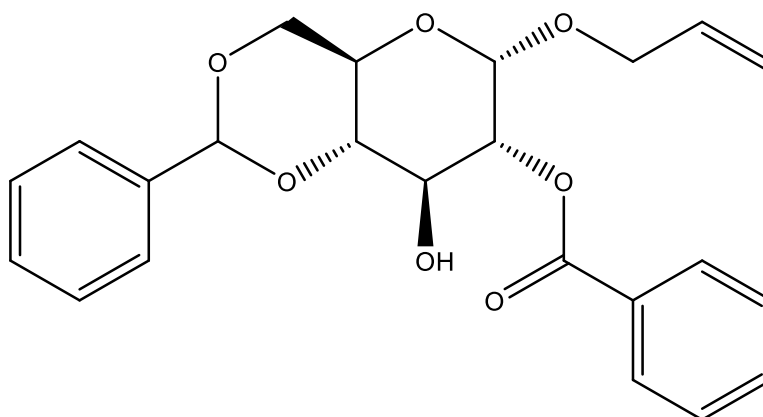
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 162.7, 143.6, 135.5, 130.7, 129.2, 128.8, 128.7, 124.8, 124.8, 120.5, 108.3 ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 10.4 min (Methode 2); m/z (% relative Intensität) = 240.0832 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:** m/z = 262.0588 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. m/z = 262.0587 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2922, 1717, 1451, 1315, 1090, 983, 697 cm<sup>-1</sup>.

#### Allyl-2-O-benzoyl-4,6-O-benzyliden- $\alpha$ -D-glucopyranosid (II-22, KKS-224)



Zu einer Lösung aus **KKS-218 (II-21, 1.53 g, 4.98 mmol)** und **KKS-223 (1.20 g, 5.03 mmol)** in Dichlormethan wurde bei -20 °C Triethylamin (1.50 mL, 10.95 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde 4 h bei RT rühren lassen und danach mit Dichlormethan verdünnt. Die Reaktionslösung wurde nacheinander mit ges. NHCO<sub>3</sub> (2x 50 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 50 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Dichlormethan (3x 100 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 → 4:1) aufgereinigt. Es wurde ein farbloser Schaum (1.51 g, 3.67 mmol, 74 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.13-8.07 (m, 2H), 7.61-7.56 (m, 1H), 7.54-7.50 (m, 2H), 7.49-7.43 (m, 2H), 7.42-7.36 (m, 3H), 5.88-5.77 (m, 1H), 5.58 (s, 1H), 5.32-5.25 (m, 1H),

5.21 (d,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H), 5.17-5.12 (m, 1H), 5.07 (dd,  $^3J = 9.8$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H), 4.40 (t,  $^3J = 9.5$  Hz, 1H), 4.32 (dd,  $^3J = 9.5$  Hz,  $^3J = 5.1$  Hz, 1H), 4.25-4.18 (m, 1H), 4.04-3.94 (m, 2H), 3.79 (t,  $^3J = 9.9$  Hz, 1H), 3.64 (t,  $^3J = 9.4$  Hz, 1H) ppm;

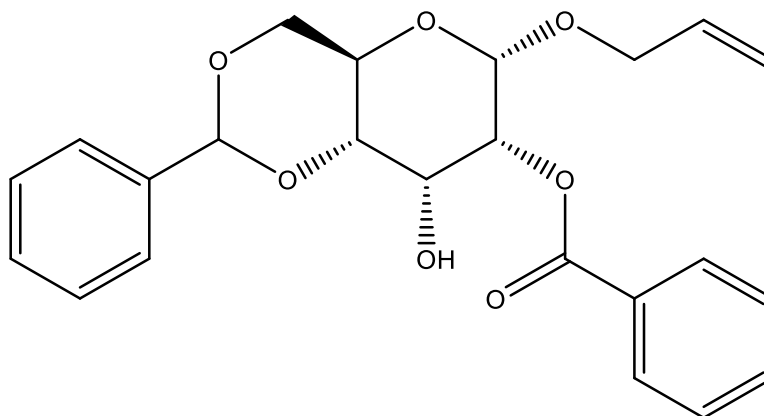
$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 166.3, 137.1, 133.5, 133.5, 130.0, 129.7, 129.4, 128.6, 128.5, 126.5, 117.8, 102.2, 96.1, 81.6, 74.1, 69.0, 69.0, 68.9, 62.5$  ppm;

**LCMS**:  $t_{\text{R}} = 11.9$  min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 413.1579  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (65);

**HR-ESI-MS**:  $m/z = 435.1416$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 435.1414$  für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR)**:  $\tilde{\nu} = 3476, 2922, 1717, 1315, 1090, 983, 652$   $\text{cm}^{-1}$ .

**Allyl-2-O-benzoyl-4,6-O-benzyliden- $\alpha$ -D-allopyranosid (II-24, KKS-226)**



**KKS-224 (II-22)**, 1.28 g, 3.11 mmol) wurde in trockenem DCM (15.0 mL) gelöst und bei RT mit Dess-Martin-Periodinan (2.64 g, 6.22 mmol) und  $\text{NaHCO}_3$  (2.62 g, 31.2 mmol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 30 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und bei  $-20$  °C wurde Natriumborhydrid (170 mg, 4.49 mmol) über einen Zeitraum von 10 min zugegeben. Über Nacht wurde die Reaktionslösung langsam auf RT erwärmt und anschließend mit Ethylacetat verdünnt. Die Lösung wurde nacheinander mit 1 M HCl (2x 50 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 50 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 5:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (969 mg, 2.35 mmol, 76 % über zwei Schritte) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.18-8.10 (m, 2H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.59-7.46 (m, 4H), 7.42-7.36 (m, 3H), 5.95-5.83 (m, 1H), 5.65 (s, 1H), 5.38-5.30 (m, 1H), 5.26-5.20 (m, 2H), 5.13 (t, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.47-4.41 (m, 1H), 4.36-4.28 (m, 2H), 4.16-4.08 (m, 1H), 3.85 (t, <sup>3</sup>J = 10.4 Hz, 1H), 3.71 (dd, <sup>3</sup>J = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz, 1H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 165.6, 137.0, 133.5, 132.9, 130.0, 129.3, 129.1, 128.5, 128.3, 126.3, 118.4, 102.0, 96.8, 78.7, 69.6, 69.3, 69.1, 68.3, 58.2 ppm;

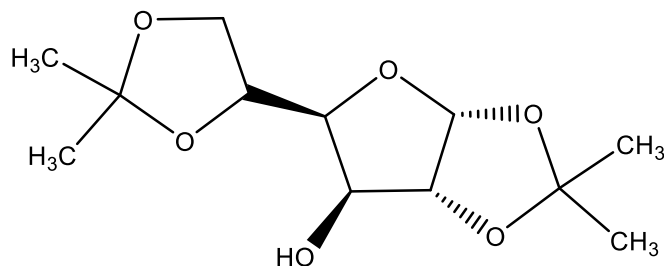
**LCMS:** t<sub>R</sub> = 15.5 min (Methode 2); m/z (% relative Intensität) = 413.1660 [M+H]<sup>+</sup> (12);

**HR-ESI-MS:** m/z = 435.1414 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. m/z = 435.1414 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2970, 1737, 1366, 1216, 1024, 754, 696 cm<sup>-1</sup>.

### 9.2.2.2 Acetyl-geschützte Glucosederivate

#### 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-glucofuranose (II-26, KKS-232)<sup>[241]</sup>



D-Glucose (5.00 g, 27.8 mmol) wurde in trockenem Aceton (50.0 mL) suspendiert und mit wasserfreiem ZnCl<sub>2</sub> (4.00 g, 29.4 mmol) und Camphersulfonsäure (967 mg, 4.16 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 17 h bei RT rühren lassen, danach über Celite filtriert und mit 10%iger NaOH-Lsg. ein pH-Wert von 7 eingestellt. Das Lösungswurde unter vermindertem Druck eingeeengt und mit Dichlormethan (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1) aufgereinigt, wodurch ein farbloser Schaum (5.27 g, 20.3 mmol, 73 %) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.96 (d, <sup>3</sup>J = 3.7 Hz, 1H), 4.54 (d, <sup>3</sup>J = 3.5 Hz, 1H), 4.37-4.32 (m, 2H), 4.20-4.17 (m, 1H), 4.09 (dd, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J = 2.9 Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 1H), 2.68 (s, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.33 (s, 3H) ppm;

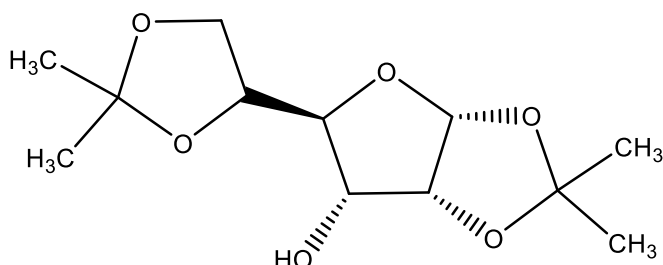
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 111.8, 109.6, 105.3, 85.1, 81.2, 75.1, 73.4, 67.6, 26.8, 26.7, 26.2, 25.1 ppm;

**LCMS:**  $t_R = 5.7$  min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 261.1628  $[M+H]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 283.1153$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 283.1152$  für  $[M+Na]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3425, 2983, 1371, 1219, 1160, 1118, 1029, 844, 525$   $\text{cm}^{-1}$ .

**1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-allofuranose (II-27, KKS-238)**<sup>[243]</sup>



**KKS-232 (II-26)**, 1.00 g, 3.84 mmol) wurde in trockenem DCM (15.0 mL) gelöst und bei RT mit Dess-Martin-Periodinan (3.26 g, 7.68 mmol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 50 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 50 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und bei  $-20$  °C wurde Natriumborhydrid (283 mg, 7.68 mmol) über einen Zeitraum von 10 min zugegeben. Über Nacht wurde die Reaktionslösung langsam auf RT erwärmt, mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 30 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 5:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (732 mg, 2.81 mmol, 73 % über zwei Schritte) erhalten.

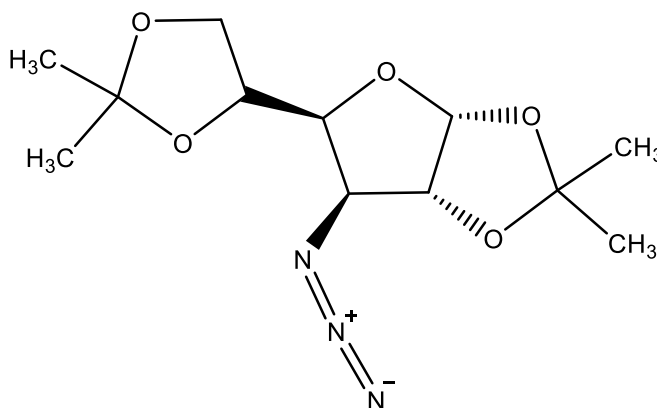
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta = 5.77$  (d,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H), 4.60 (t,  $^3J = 3.9$  Hz, 1H), 4.32-4.29 (m, 1H), 4.04-4.00 (m, 1H), 3.97-3.92 (m, 3H), 3.78-3.74 (m, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.32 (s, 3H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ):  $\delta = 112.8, 109.8, 104.9, 80.5, 80.2, 76.6, 73.3, 65.6, 27.0, 26.9, 26.7, 25.8$  ppm;

**LCMS:**  $t_R = 5.1$  min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 283.1198  $[M+Na]^+$  (20);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 283.1152$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 283.1152$  für  $[M+Na]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3471, 2992, 1408, 1213, 1160, 1128, 1049, 870, 529$   $\text{cm}^{-1}$ .

**3-Azido-1,2:5,6-di-O-isopropyliden-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucofuranose (II-28, KKS-239)<sup>[241]</sup>**

**KKS-238 (II-27, 900 mg, 3.45 mmol)** wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DCM (10.0 mL) gelöst und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Pyridin (558  $\mu\text{L}$ , 6.92 mmol) und Trifluormethansulfonsäureanhydrid (873  $\mu\text{L}$ , 3.46 mmol) versetzt. Nach 2 h bei gleicher Temperatur wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem DMF (3 mL) gelöst, mit Natriumazid (449 mg, 6.92 mmol) versetzt und 17 h bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, danach filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 5:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (933 mg, 3.27 mmol, 95 % über zwei Schritte) erhalten.

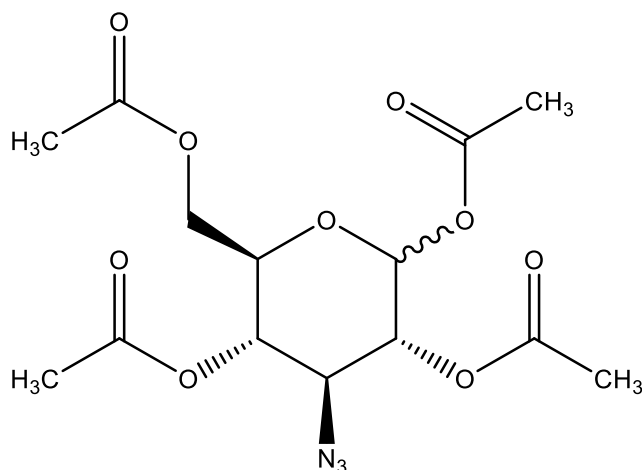
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 5.86 (d,  $^3J$  = 3.6 Hz, 1H), 4.62 (d,  $^3J$  = 3.7 Hz, 1H), 4.27-4.22 (m, 1H), 4.16-4.12 (m, 1H), 4.21-4.08 (m, 2H), 4.00-3.96 (m, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.33 (s, 3H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 112.3, 109.5, 105.0, 83.4, 80.5, 73.0, 67.6, 66.4, 26.8, 26.6, 26.2, 25.1 ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.0 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 286.1805  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 308.1217  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 308.1217 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2988, 2104, 1373, 1212, 1166, 1068, 1014, 843, 520  $\text{cm}^{-1}$ .

**1,2,4,6-Tetra-O-acetyl-3-azido-3-deoxy- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranose (II-30, KKS-244)<sup>[243]</sup>**

**KKS-239 (II-28)**, 3.14 g, 11.0 mmol) wurden in Wasser (20.0 mL) suspendiert und mit Trifluoressigsäure (7.50 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde in trockenem Pyridin (22.0 mL) gelöst, mit Essigsäureanhydrid (16.6 mL, 176 mmol) versetzt und 17 h bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1M HCl (3x 30 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 30 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt und ein orangenes Öl (3.83 g, 10.3 mmol, 93 % über zwei Schritte) erhalten.

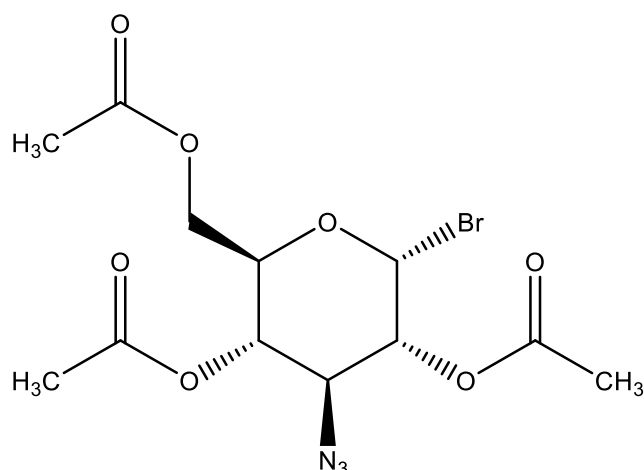
**<sup>1</sup>H-NMR ( $\alpha$ -Anomer):** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 6.31 (d,  $^3J$  = 3.7 Hz, 1H), 5.03 (t,  $^3J$  = 10.2 Hz, 1H), 4.97 (dd,  $^3J$  = 10.7 Hz,  $^3J$  = 3.6 Hz, 1H), 4.23-4.20 (m, 1H), 4.09-4.03 (m, 2H), 3.97 (t,  $^3J$  = 10.3 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 170.7, 169.2, 168.9, 168.5, 88.6, 69.9, 69.9, 67.8, 61.5, 60.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 9.6 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 391.1414  $[M+NH_4]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 396.1014  $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z$  = 396.1013 für  $[M+Na]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2106, 1744, 1370, 1205, 1033, 599  $cm^{-1}$ .

**2,4,6-Tri-O-acetyl-3-azido-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid (II-31, KKS-257)<sup>[261]</sup>**

**KKS-244 (II-30, 1.50 g, 4.02 mmol)** wurde in Dichlormethan/Ethylacetat (10 mL, 100:1) gelöst und mit Titan(IV)bromid (3.69 g, 10.0 mmol) versetzt. Nach 17 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit Wasser (3x 50 mL) und ges. NaCl-Lsg. (2x 50 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (2x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt, wodurch ein farbloses Öl (1.35 g, 3.42 mmol, 85 %) erhalten wurde.

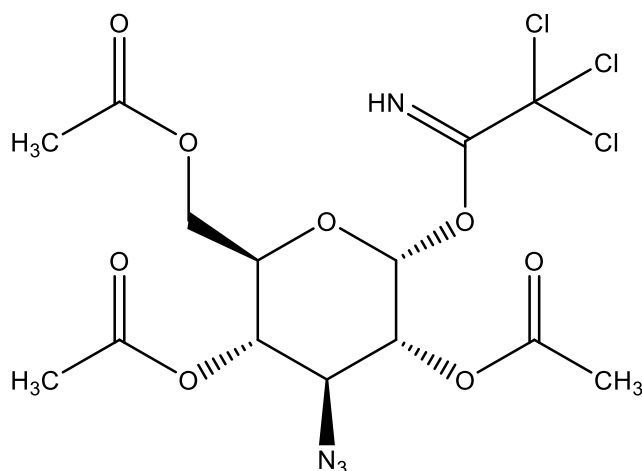
**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 6.60 (d,  $^3J$  = 3.9 Hz, 1H), 5.02 (t,  $^3J$  = 10.1 Hz, 1H), 4.65 (dd,  $^3J$  = 10.3 Hz,  $^3J$  = 3.9 Hz, 1H), 4.28-4.22 (m, 1H), 4.20-4.15 (m, 1H), 4.10-4.03 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 170.6, 169.6, 169.2, 87.2, 72.3, 71.6, 67.0, 61.4, 61.0, 20.7, 20.7, 20.7 ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 10.2 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 411.06 [ $M+NH_4$ ]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 416.0065 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 416.0064 für [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2108, 1707, 1239, 1029  $cm^{-1}$ .

**O-[-2,4,6-Tri-O-acetyl-3-azido-3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl]-trichloracetimidat (II-32, KKS-247)<sup>[261]</sup>**

**KKS-244 (II-30**, 900 mg, 2.41 mmol) wurde in DMF (5 mL) vorgelegt und mit Ammoniumacetat (743 mg, 9.64 mmol) versetzt. Nach 17 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit 1 M HCl (3x 10 mL) und ges. NaCl-Lsg. (2x 50 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (2x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde in DCM (5 mL) gelöst und bei 0 °C nacheinander wurden Trichloracetonitril (3.0 mL, 29.6 mmol) und DBU (108  $\mu$ L, 723  $\mu$ mol) versetzt. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach 4 h bei wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (3x 10 mL) und ges. NaCl-Lsg. (2x 50 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (2x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt, wodurch ein farbloses Öl (924 mg, 1.94 mmol, 79 % über zwei Schritte) erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.75 (s, 1H), 6.45 (d, <sup>3</sup>J = 3.5 Hz, 1H), 5.09 (t, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, 1H), 4.99 (dd, <sup>3</sup>J = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J = 3.5 Hz, 1H), 4.26-4.21 (m, 1H), 4.16-4.06 (m, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.09 (s, 3H) ppm;

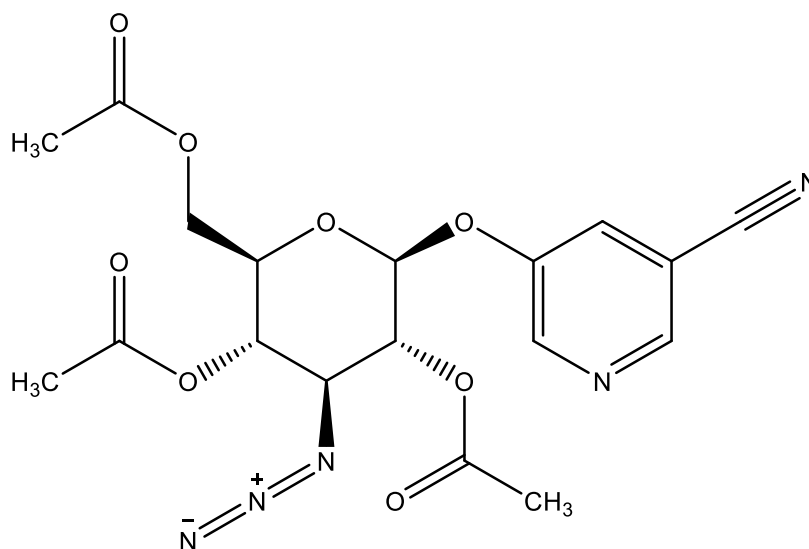
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 171.1, 170.5, 169.5, 169.1, 92.49, 70.5, 70.2, 67.6, 61.4, 60.9, 20.6, 20.5, 20.4 ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 11.5 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 314.0992 [M-OCNHCCl<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 497.0004 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 497.0004 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2107, 1741, 1369, 1213, 1031, 828, 601  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-azido-3-deoxy- $\beta$ -D-glucosyl)-oxy-nicotinonitril (II-48, KKS-288)**



Das Bromid **KKS-257 (II-31)**, 750 mg, 1.90 mmol), 3-Cyano-5-hydroxypyridin (342 mg, 1.50 mmol) und aktiviertes Molekularsieb (3 Å, 1.00 g) wurde unter Ar-Atmosphäre in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.00 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde unter Rühren Silbertriflat (513 mg, 1.05 mmol) innerhalb von 1 min zugegeben. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung auf 35 °C erwärmt und für weitere 17 h bei gleicher Temperatur gerührt. Anschließend wurde ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (10.0 mL) zugegeben und 15 min stark gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (20 mL) wurde über Celite filtriert. Danach wurde nacheinander mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (470 mg, 1.08 mmol, 57 %) erhalten.

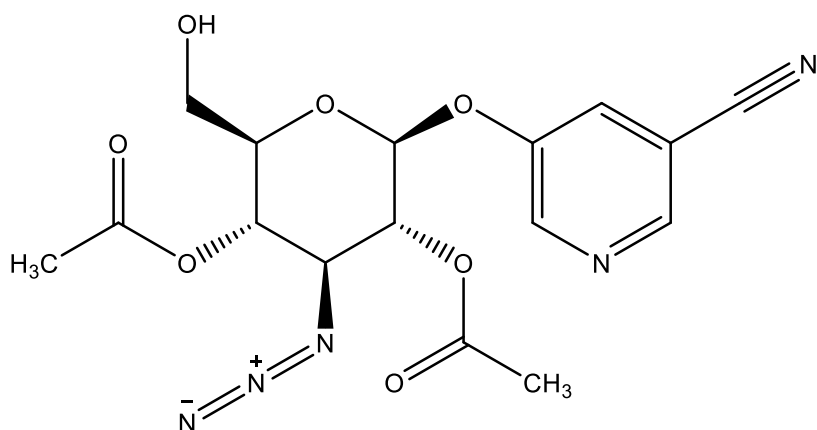
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  = 8.68-8.57 (m, 2H), 7.64-7.60 (m, 1H), 5.28-5.23 (m, 1H), 5.17-5.05 (m, 2H), 4.25-4.21 (m, 2H), 3.96-3.88 (m, 1H), 3.83-3.75 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.20 (s, 1H), 2.15 (s, 3H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  = 170.5, 169.1, 169.8, 152.2, 146.7, 143.7, 126.3, 115.9, 110.2, 98.8, 73.5, 70.5, 68.1, 63.9, 61.9, 20.7, 20.6, 20.5 ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 7.987 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 434.05  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (85);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 456.1125  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 456.1126 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2106, 1738, 1216, 1034, 883, 697  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(2,4-Di-O-acetyl-3-azido-3-deoxy- $\beta$ -D-glucosyl-)oxy-nicotinonitril (II-49, KKS-290)**

Das Glykosid **KKS-288 (II-48)**, 55.0 mg, 127  $\mu$ mol) und Iod (96.6 mg, 381  $\mu$ mol) wurden in MeOH (10.0 mL) gelöst und bei 70 °C gekühlt für 17 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 50.0 mL eingengt und mit ges. Natriumthiosulfat-Lsg. (50.0 mL) verdünnt. Die wässr. Lsg. wurde mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen danach mit ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (38.0 mg, 97.2  $\mu$ mol, 77 %) erhalten.

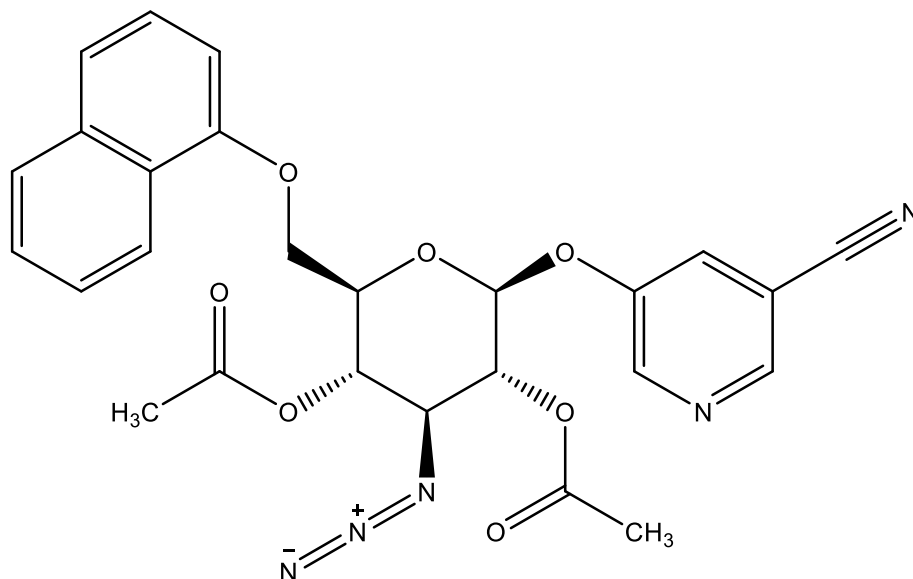
**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  = 8.65-8.57 (m, 2H), 7.83-7.80 (m, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.30 (d,  $^3J$  = 8.2 Hz, 1H), 5.17-5.02 (m, 2H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.85-3.82 (m, 1H), 3.73-3.68 (m, 1H), 3.59-3.55 (m, 1H), 2.15 (s, 1H), 2.14 (s, 3H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  = 170.7, 170.3, 153.4, 147.7, 144.6, 127.6, 110.9, 99.5, 76.5, 71.5, 69.2, 64.9, 61.3, 21.0, 20.8 ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 6.555 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 392.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 414.1020  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 414.1020 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3348, 2923, 2106, 1747, 1266, 1033, 734  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(2,4-Di-O-acetyl-3-azido-3-deoxy-6-O-naphthyl- $\beta$ -D-glucosyl)-oxy-nicotinonitril  
(II-50, KKS-293)**

Das Glykosid **KKS-290 (II-49)**, 80.0 mg, 204  $\mu$ mol) wurde unter  $N_2$ -Atmosphäre in trockenem DCM (3.00 mL) gelöst und bei RT mit Tosylchlorid (77.9 mg, 410  $\mu$ mol) und DMAP (49.9 mg, 409  $\mu$ mol) versetzt. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Naphthol wurde in DMF (3 mL) gelöst und bei 0 °C mit NaH versetzt. Nach 1 h wurde das Tosylat in DMF gelöst bei 0 °C zu der Reaktionslösung geben und diese auf RT erwärmen lassen. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 5:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (20.0 mg, 38.6  $\mu$ mol, 19 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR:** (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8.24-8.20 (m, 1H), 7.85-7.79 (m, 22H), 7.64-7.58 (m, 3H), 7.56-7.51 (m, 1H), 7.50-7.46 (m, 1H), 7.37-7.33 (m, 1H), 6.77-6.73 (m, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.30 (d,  $^3J$  = 8.2 Hz, 1H), 5.32-5.20 (m, 3H), 4.34-4.21 (m, 3H), 3.94-3.87 (m, 1H), 2.22 (s, 1H), 2.18 (s, 3H) ppm;

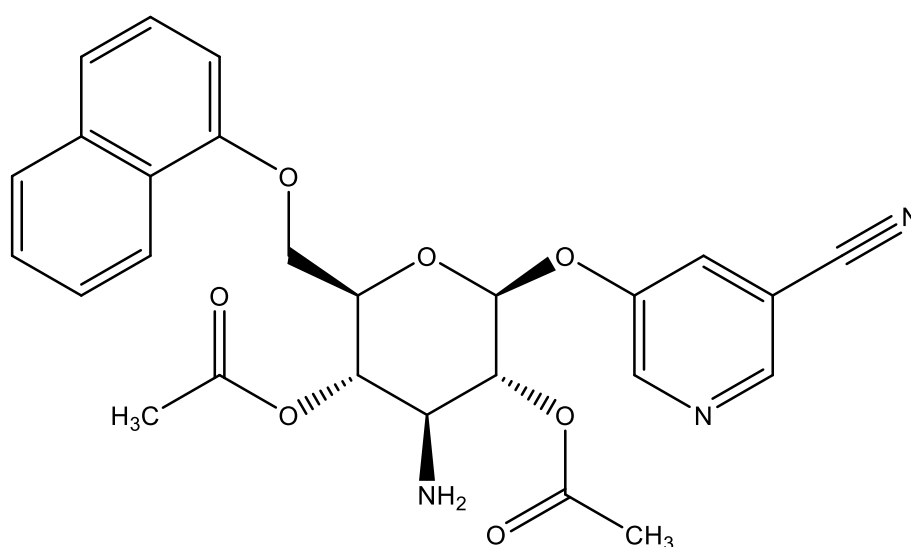
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 169.4, 168.8, 153.6, 146.7, 143.4, 134.5, 127.5, 126.7, 126.0, 125.9, 125.7, 125.5, 125.3, 121.5, 121.3, 115.8, 104.7, 98.7, 74.4, 70.6, 69.1, 67.0, 63.9, 53.4, 20.7, 20.7 ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.674 min (Methode 1);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 540.1490  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 540.1490 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2106, 1750, 1580, 1371, 1266, 1211, 1065, 890, 694  $\text{cm}^{-1}$ .

**5-(2,4-Di-O-acetyl-3-amino-3-deoxy-6-O-naphthyl- $\beta$ -D-glucosyl)-oxy-nicotinonitril  
(II-51, KKS-298)**



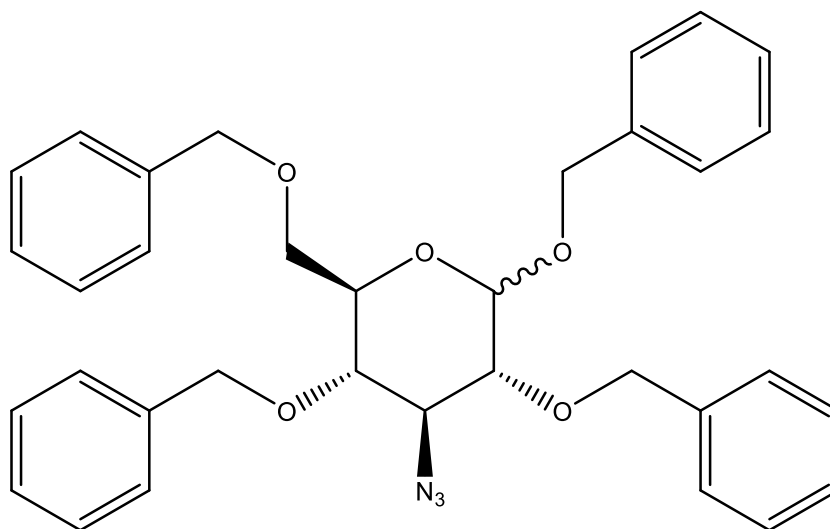
Das Azid **KKS-293 (II-50)**, 9.00 mg, 17.4  $\mu\text{mol}$  wurde in THF (1.00 mL) gelöst und mit 1 M Trimethylphosphan-Lsg. in THF (20.9  $\mu\text{L}$ , 20.9  $\mu\text{mol}$ ) sowie Wasser (500  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei 50  $^{\circ}\text{C}$  gerührt, abgekühlt und mit Ethylacetat verdünnt. Anschließend wurde nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an  $\text{C}_{18}$  (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , 95:5  $\rightarrow$  5:95) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (7.04 mg, 14.3  $\mu\text{mol}$ , 82 %) erhalten.

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 6.151 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 492.20  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100); 84% Reinheit

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 492.1765  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z$  = 492.1765 für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3258, 3055, 2955, 1748, 1273, 1219, 1064, 1034, 695  $\text{cm}^{-1}$ .

## 9.2.2.3 Benzyl-geschützte Glucosederivate

3-Azido-1,2,4,6-tetra-O-benzyl-3-deoxy- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranose (II-36, KKS-265)<sup>[261]</sup>

Die Furanose **KKS-239** (**II-28**, 1.00 g, 3.51 mmol) wurde in Wasser (10.0 mL) suspendiert und mit Trifluoressigsäure (4.80 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in trockenem DMF (10 mL) gelöst und bei 0 °C mit Natriumhydrid (911 mg, 22.8 mmol) versetzt. Nach 1 h bei 0 °C wurde Benzylbromid (2.30 mL, 19.3 mmol) langsam zu der Lösung getropft und 17 h bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit 1M HCl (3x 100 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 100 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 6:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (1.84 g, 3.26 mmol, 93 % über zwei Schritte) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\alpha/\beta$ -Verhältnis 1:1):  $\delta$  = 7.49-7.23 (m, 40H), 5.07-4.95 (m, 2H), 4.91-4.66 (m, 9H), 4.65-4.45 (m, 7H), 4.08-3.99 (m, 1H), 3.86-3.71 (m, 4H), 3.65-3.38 (m, 7H) ppm;

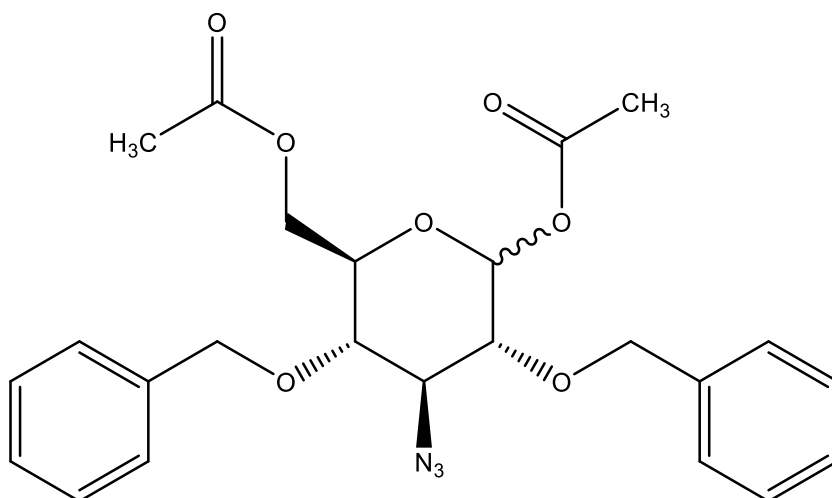
**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 128.5-127.6 (40C), 102.5, 94.9, 79.9, 76.7, 76.3, 75.4, 74.9, 74.8, 74.7, 74.6, 73.4, 73.5, 72.7, 71.1, 70.0, 69.2, 68.5, 68.4, 68.0, 65.4 ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 15.7 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 583.29 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 588.2468 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 588.2468 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3029, 2862, 2103, 1496, 1066, 1026, 732, 694  $\text{cm}^{-1}$ .

**1,6-Di-O-acetyl-3-azido-2,4-di-O-benzyl-3-deoxy- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranose (II-37, KKS-266)**<sup>[261]</sup>



Die perbenzoylierte Pyranose **KKS-265 (II-36)**, 7.20 g, 12.7 mmol) wurde in Essigsäureanhydrid (25.0 mL, 264 mmol) gelöst und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit konz. Schwefelsäure (1.50 mL, 28.1 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und danach langsam auf Eis (500 mL) gegeben. Die wässr. Phase wurde mit Ethylacetat (5x 100 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen mit ges. NaCl-Lsg. (3x 100 mL) gewaschen. Anschließend wurden die org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (3.55 g, 7.56 mmol, 59 %) erhalten.

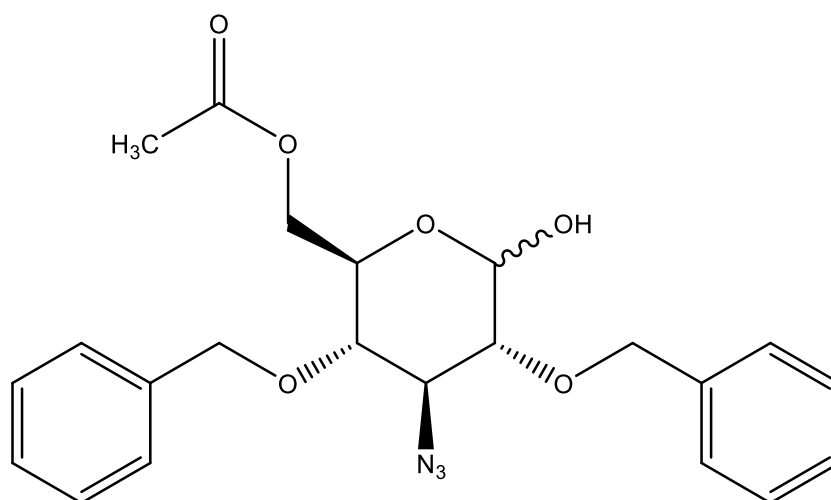
**$^1\text{H-NMR}$  ( $\beta$ -Anomer):** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\alpha/\beta$ -Verhältnis 0.42:1):  $\delta$  = 7.45-7.32 (m, 10H), 5.63 (d,  $^3J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.92-4.78 (m, 1H), 4.73-4.68 (m, 1H), 4.63-4.58 (m, 2H), 4.31-4.26 (m, 2H), 3.97-3.91 (m, 1H), 3.73-3.67 (m, 1H), 3.48-3.37 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.5, 168.8, 137.3, 136.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 93.8, 78.9, 75.5, 75.0, 74.9, 74.3, 68.4, 62.4, 20.9, 20.8 ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 12.8 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 487.22  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 492.1741  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 492.1741 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 2916, 2104, 1740, 1365, 1214, 1069, 697  $\text{cm}^{-1}$ .

**6-O-Acetyl-3-azido-2,4-di-O-benzyl-3-deoxy- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranose (II-38, KKS-273)<sup>[261]</sup>**

Die diacetylgeschützte Hexose **KKS-266 (II-37, 400 mg, 850  $\mu$ mol)** wurde in DMF (5 mL) vorgelegt und mit Ammoniumacetat (144 mg, 1.87 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit 1 M HCl (3x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (2x 50 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (260 mg, 608  $\mu$ mol, 71 %) erhalten.

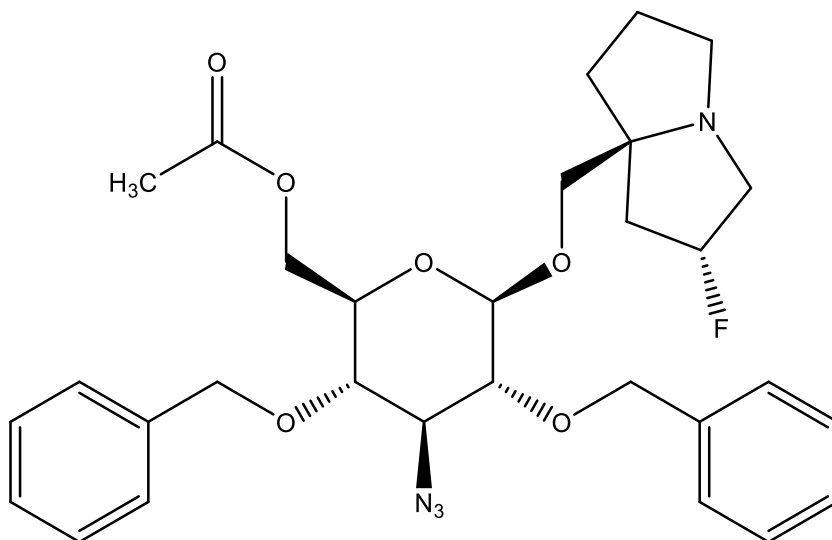
**$^1\text{H-NMR}$  ( $\alpha$ -Anomer):** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\alpha/\beta$ -Verhältnis 1:0.41):  $\delta$  = 7.48-7.34 (m, 10H), 5.20 (d,  $^3J$  = 3.4 Hz, 1H), 4.93-4.88 (m, 1H), 4.84-4.79 (m, 1H), 4.76-4.71 (m, 1H), 4.63-4.58 (m, 1H), 4.33-4.25 (m, 2H), 4.00-3.94 (m, 1H), 3.45-3.41 (m, 1H), 3.37-3.30 (m, 2H), 2.07 (s, 3H) ppm;

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.5, 137.1, 137.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 90.3, 78.1, 75.7, 74.8, 73.1, 68.4, 65.0, 62.8, 20.8 ppm;

**LCMS:**  $t_{\text{R}}$  = 10.0 min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 877.36  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 450.1636  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 450.1636 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3411, 2928, 2104, 1738, 1364, 1230, 1065, 1028, 696  $\text{cm}^{-1}$ .

**(2*R*,7*aS*)-2-Fluoro-7*a*-(6-*O*-acetyl-3-azido-2,4-di-*O*-benzyl-3-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyloxymethyl)hexahydro-1*H*-pyrrolizidin (II-40, KKS-269)**

Der reduzierende Zucker **KKS-273** (**II-38**, 800 mg, 1.87 mmol) wurde unter  $N_2$ -Atmosphäre in trockenem DCM (5 mL) gelöst. Bei 0 °C wurden DBU (84.0  $\mu$ L, 561  $\mu$ mol) und Trichloracetonitril (1.87 mL, 1.87 mmol) zu der Lösung gegeben und weitere 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit ges. NaCl-Lsg. (2x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde zusammen mit dem Alkohol (**II-20**, 595 mg, 3.74 mmol) und aktiviertem Molekularsieb (3 Å, 1.00 g) unter Ar-Atmosphäre in trockenem  $CH_2Cl_2$  (3.00 mL) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Anschließend wurde unter Rühren  $BF_3 \cdot EtO_2$  (1.19 mL, 9.36 mmol) innerhalb von 5 min zugegeben. Nach 2 h wurde auf RT erwärmt und für weitere 17 h gerührt. Ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (10.0 mL) wurde zu der Reaktionslösung gegeben und 15 min stark gerührt. Die Emulsion wurde mit Ethylacetat verdünnt und über Celite filtriert. Danach wurde mit ges. NaCl-Lsg. (3x 20 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, es wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (610 mg, 1.08 mmol, 57 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR:** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 7.47-7.33 (m, 10H), 5.30-5.11 (m, 1H), 4.90 (d,  $^3J$  = 10.8 Hz, 1H), 4.80-4.72 (m, 2H), 4.58 (d,  $^3J$  = 10.8 Hz, 1H), 4.28-4.25 (m, 2H),

3.95-3.82 (m, 2H), 3.50 (d,  $^3J = 9.5$  Hz, 1H), 3.43-3.38 (m, 1H), 3.30 (m,  $^3J = 9.8$  Hz, 1H), 3.26-2.90 (m, 6H), 2.08 (s, 3H), 2.06-1.76 (m, 6H) ppm;

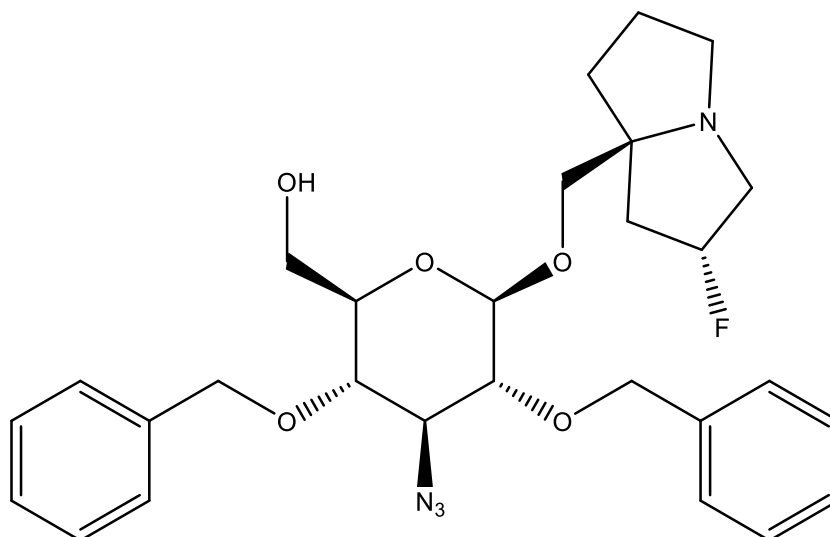
$^{13}\text{C-NMR}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.6, 137.6, 137.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 96.5, 78.1, 77.3, 77.0, 76.7, 76.0, 74.9, 72.7, 68.6, 65.3, 62.8, 60.3, 56.9, 42.2, 35.9, 25.3, 20.8$  ppm;

**LCMS**:  $t_R = 12.5$  min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 569.29  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS**:  $m/z = 569.2770$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.  $m/z = 569.2770$  für  $[\text{M}+\text{NH}]^+$ );

**IR (ATR)**:  $\tilde{\nu} = 2925, 2106, 1738, 1232, 1065, 1028, 733, 698$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(2*R*,7*aS*)-2-Fluoro-7*a*-(3-azido-2,4-di-*O*-benzyl-3-deoxy- $\beta$ -*D*-glucopyranosyloxy-methyl)hexahydro-1*H*-pyrrolizidin (II-41, KKS-275)**



Natrium (24.3 mg, 1.06 mmol) wurde in trockenem MeOH (2.00 mL) gelöst und zu einer Lösung des Glykosids **KKS-269 (II-40)**, 546 mg, 960  $\mu\text{mol}$  in trockenem MeOH (2.00 mL) gegeben. Die Reaktion wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit Amberlite neutralisiert, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. Entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/Cyclohexan/EtOH, 6:3:1) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (452 mg, 858  $\mu\text{mol}$ , 89 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.59-7.31$  (m, 10H), 5.33-5.20 (m, 1H), 4.89 (d,  $^3J = 10.8$  Hz, 1H), 4.78-4.73 (m, 2H), 4.67-4.53 (m, 1H), 3.88-3.57 (m, 7H), 3.52-3.33 (m, 4H), 3.13-3.00 (m, 2H), 2.20-1.90 (m, 6H) ppm;

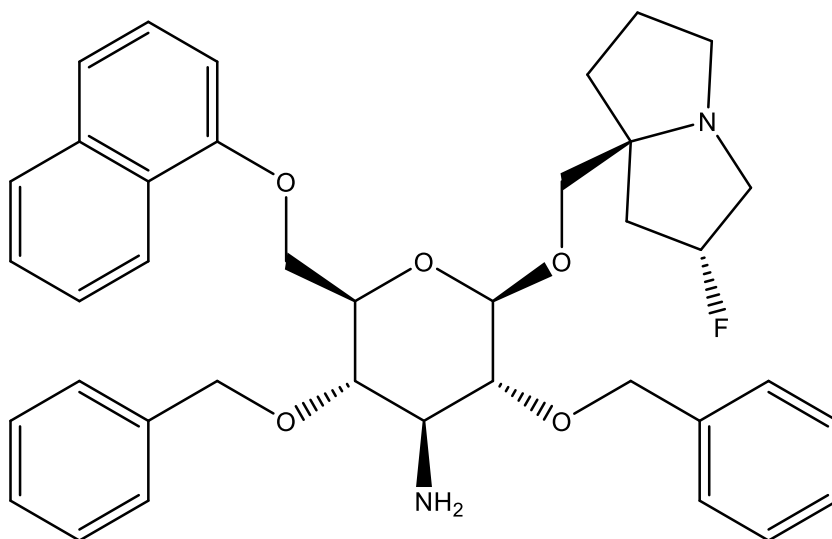
$^{13}\text{C-NMR}$ : (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 137.6, 137.4, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 96.1, 80.4, 78.0, 76.2, 76.0, 75.1, 74.7, 72.7, 68.2, 65.5, 61.8, 59.9, 57.3, 41.7, 35.5, 25.8$  ppm;

**LCMS:**  $t_R = 11.2$  min (Methode 2);  $m/z$  (% relative Intensität) = 527.26  $[M+H]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 527.2664$   $[M+H]^+$  (ber.  $m/z = 527.2664$  für  $[M+H]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3449, 2922, 2104, 1682, 1545, 1260, 1066, 1027, 736, 696$   $\text{cm}^{-1}$ .

**(2*R*,7*aS*)-2-Fluoro-7*a*-(3-amino-2,4-di-*O*-benzyl-3-deoxy-6-*O*-naphthyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-oxymethyl)hexahydro-1*H*-pyrrolizidin (II-43, KKS-295)**



Das Glykosid **KKS-275 (II-49)**, 100 mg, 189  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre in trockenem DCM (3.00 mL) gelöst und bei  $0^\circ\text{C}$  mit  $\text{Tf}_2\text{O}$  (48.0  $\mu\text{L}$ , 284  $\mu\text{mol}$ ) und Pyridin (23.0  $\mu\text{L}$ , 284  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt, nacheinander mit ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lsg. (2x 5 mL) und ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. (2x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Naphthol (125 mg, 189  $\mu\text{mol}$ ) wurde in DMF (2 mL) gelöst und bei  $0^\circ\text{C}$  mit  $\text{NaH}$  (8.00 mg, 200  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Nach 1 h wurde das Tosylat in DMF gelöst bei  $0^\circ\text{C}$  zu der Reaktionslösung geben und diese auf RT erwärmen lassen. Nach 17 h bei RT wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 1 M  $\text{HCl}$  (2x 5 mL) und ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten org. Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1) aufgereinigt und direkt weiter umgesetzt.

Das Azid (46.5 mg) wurde in THF (1.00 mL) gelöst und mit 1 M Trimethylphosphan-Lsg. in THF (85.5  $\mu\text{L}$ , 85.5  $\mu\text{mol}$ ) sowie Wasser (750  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Die Lösung wurde für 1 h

bei 50 °C gerührt, abgekühlt und mit Ethylacetat verdünnt. Anschließend wurde nacheinander mit 1 M HCl (2x 5 mL) und ges. NaCl-Lsg. (3x 10 mL) gewaschen und die vereinten wässr. Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an C<sub>18</sub> (ACN/H<sub>2</sub>O, 95:5 → 5:95) aufgereinigt und ein farbloser Schaum (37.1 mg, 59.3 μmol, 31 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.26-8.22 (m, 1H), 7.85-7.81 (m, 1H), 7.57-7.23 (m, 14H), 6.81-6.76 (m, 1H), 5.35-5.22 (m, 1H), 4.94-4.73 (m, 2H), 4.64-4.51 (m, 2H), 4.43-4.24 (m, 2H), 4.00-3.98 (m, 1H), 3.95-3.74 (m, 2H), 3.72-3.45 (m, 6H), 3.18-3.04 (m, 2H), 2.18-1.87 (m, 6H) ppm;

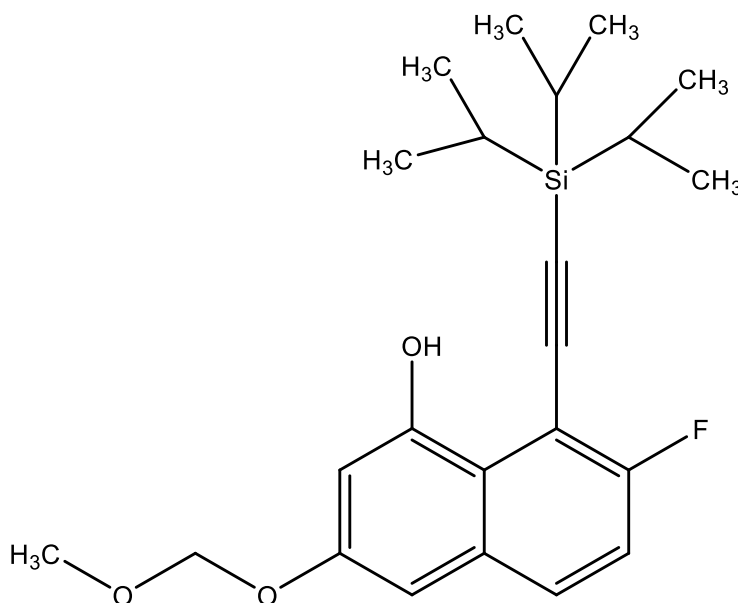
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 153.7, 137.6, 137.4, 134.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 126.5, 121.9, 121.9, 120.8, 120.7, 105.2, 105.2, 103.5, 96.1, 80.1, 77.9, 77.2, 76.4, 76.3, 74.5, 72.7, 68.7, 65.9, 59.9, 57.2, 50.8, 41.5, 35.3, 24.5 ppm;

**LCMS:** t<sub>R</sub> = 7.137 min (Methode 1); m/z (% relative Intensität) = 628.05 [M+H]<sup>+</sup> (18);

**HR-ESI-MS:** m/z = 627.3230 [M+H]<sup>+</sup> (ber. m/z = 627.3229 für [M+H]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):** ν̄ = 2922, 2868, 1579, 1454, 1268, 1027, 736, 699 cm<sup>-1</sup>.

**7-Fluor-3-(methoxymethoxy)-8-((triisopropylsilyl)ethynyl)naphthalen-1-ol (II-45, KKS-280)<sup>[266]</sup>**



Das Diol (890 mg, 2.48 mmol) wurde in trockenem DCM gelöst und bei 0 °C nacheinander mit MOM-Cl (189 μL, 2.48 mmol) und DIPEA (422 μL, 2.48 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die

Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lsg. (3x 20 mL) und ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. (2x 30 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EE, 99:1) aufgereinigt und ein farbloser Feststoff (703 mg, 1.75 mmol, 70 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 9.12 (s, 1H), 7.71-7.66 (m, 1H), 7.25-7.18 (m, 1H), 7.01-6.98 (m, 1H), 6.84-6.83 (m, 1H), 5.27 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 1.22 (s, 13H) ppm;

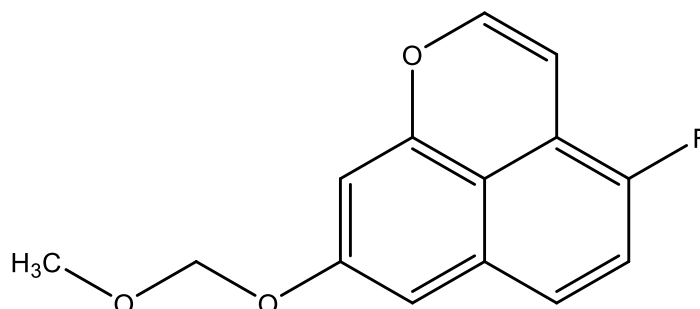
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 162.0, 155.7, 154.9, 132.5, 130.9, 118.9, 115.8, 106.9, 105.2, 103.6, 101.4, 99.4, 94.4, 56.1, 15.4, 11.5 ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 12.461 min (Methode 1);  $m/z$  (% relative Intensität) = 403.15  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 425.1919.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 425.1919 für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ );

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3408, 2940, 2136, 1634, 1376, 1149, 1021, 843, 663  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4-Fluor-8-(methoxymethoxy)benzo[de]chromen (II-47, KKS-292)



Das Phenol **KKS-280** (**II-45**, 290 mg, 720  $\mu\text{mol}$ ) wurde in DMF gelöst und mit KF (50.2 mg, 864  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit ges.  $\text{NaCO}_3$ -Lsg. (3x 20 mL) und ges.  $\text{NaCl}$ -Lsg. (2x 30 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EE, 95:5  $\rightarrow$  50:50) aufgereinigt und ein farbloser Feststoff (127 mg, 516  $\mu\text{mol}$ , 72 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 7.37-7.32 (m, 1H), 7.22 (t,  $^3J$  = 9.6 Hz, 1H), 7.02 (d,  $^3J$  = 5.8 Hz, 1H), 6.92-6.89 (m, 1H), 6.57-6.54 (m, 1H), 6.14 (d,  $^3J$  = 5.7 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.41-3.38 (m, 3H) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR:** (100 MHz, DMSO):  $\delta$  = 155.7, 152.0, 149.6, 148.0, 145.3, 132.1, 124.4, 118.6, 112.8, 103.4, 100.2, 99.2, 93.9, 55.7 ppm;

**LCMS:**  $t_R$  = 10.173 min (Methode 1, 89% Reinheit);  $m/z$  (% relative Intensität) = 247.00 [M+H]<sup>+</sup> (100);

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  = 269.0584 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 269.0584 für [M+Na]<sup>+</sup>);

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 1617, 1509, 1349, 1218, 1143, 1106, 1018, 833, 756 cm<sup>-1</sup>.

### 9.3 *In silico*-Methoden

#### Rigid Receptor Docking

Nachfolgend sind für die durchgeführten Berechnungen alle Einstellungen aufgeführt, die von den Standardkonfigurationen abweichen. Die chemischen Strukturen der zu berechnenden Substanzen wurden als sd-files in Maestro geladen und mit der LigPrep-Funktion bearbeitet. Die Proteinstrukturen wurden über die ProteinPrep-Funktion aus der pdb-Datenbank geladen und bearbeitet.

**Tab. 23:** Veränderten Einstellungen der Maestro Glide Funktionen

Funktion	Gewählte Einstellungen
<b>LigPrep</b>	Generate possible states at target pH: 7.0 ± 2 Determine chiralities from 3D-structure Fill in missing side chains using Prime. Fill in missing loops using Prime.
<b>ProteinPrep</b>	Delete water beyond 4Å from het groups. Generate het states using Epic: pH: 7.0 ± 2.0. Commit all alternate AA positions. Remove water with less than 3H-bonds to non-waters.
<b>Receptor Grid Generation</b>	Crystallised ligand picked. Rotatable groups: All groups selected.

#### SiteMap

Der *SiteMap*-Algorithmus unterteilt das Protein zunächst in ein 3D-Raster, in dem die Punkte einen Abstand von 1 Å besitzen. Auf Grundlage der Van-der-Waals-Radien der beteiligten Atome erfolgt eine Einteilung der Rasterpunkte in solche innerhalb und außerhalb der Proteinoberfläche. Liegt ein Rasterpunkt innerhalb des Van-der-Waals-Radius eines Atoms des Proteins, wird dieser verworfen. Anschließend werden alle übrigen Punkte durch verschiedene Deskriptoren erfasst. Diese beinhalten elektrostatische Potenziale, die Hydro- und Lipophilie der Umgebung sowie die Lage zu Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren. Basierend auf diesen Eigenschaften

erfolgt eine systematische Gruppierung der Punkte zu Clustern, die potenzielle Bindungstaschen repräsentieren.<sup>[272]</sup> Dafür wurden folgende Einstellungen gewählt:  
 Identify top-ranked potential receptor binding sites;  
 Require at least 15 site points per reported site  
 Report up to 5 sites

### Moleküldynamiksimulation

Für die Moleküldynamiksimulation der Verbindung **I-21** wurde das OPLS3 Kraftfeld und folgende Einstellungen verwendet (Tab. 24).

**Tab. 24:** Einstellungen der Moleküldynamiksimulation.

Funktion	Gewählte Einstellungen
<b>System Builder</b>	Solvation: Minimize Volume. Show boundary box. Use custom charges + Do not use. Ions: Recalculate + Neutralize by adding x Na <sup>+</sup> ions Add salt (NaCl, 0.15 nM)
<b>Molecular Dynamics</b>	Simulation time (ns): total 500 Recording interval (ps): trajectory 500 Approximate number of frames: 1000

Die Interaktionen zwischen dem Liganden und Protein wurden über das „Simulation Interaction Diagram“ analysiert. Die MM/GBSA-Rechnung der einzelnen Frames wurden mit dem Skript `$SCHRODINGER/run thermal_mmgbsa.py xx-out.cms -HOST'localhost:16' -step_size 1 -NJOBS 16 -lig_asl "ASL"` durchgeführt.

### 9.4 Biologische Assays

Die biologischen Assays wurden allesamt von Lead Discovery Center (LDC) in Dortmund durchgeführt. Die Protokolle wurden aus der Publikation von BENARY *et al.* entnommen.<sup>[152]</sup>

#### Austausch-Assay:

Inaktives, GDP-gebundenes K-Ras (Wildtyp, G12D oder G12V) wurde in Assay-Puffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 0,01 % Brij-35, 1 mM TCEP) verdünnt. Je 5 µL dieser K-Ras-Arbeitslösung wurden in eine weiße 384-Well-Mikrotiterplatte (z. B. Greiner Bio-One, Kat.-Nr. 784075) überführt. Die Testverbindungen wurden mittels eines akustischen Dispensers (Echo, Beckman Coulter) in einem Konzentrationsbereich von 3 mM bis 3 µM (achtstufige 1:3-Verdünnungsreihe)

zugegeben. Das Endvolumen vor Reaktionsstart betrug 5  $\mu\text{L}$ . Zur Initiierung der Nukleotidaustauschreaktion wurden 5  $\mu\text{L}$  eines SOS1/GTP-Gemisches in Assay-Puffer zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert, um die durch SOS1 vermittelte Aktivierung von K-Ras (GDP/GTP-Austausch) sowie die intrinsische GTP-Hydrolyse zu ermöglichen. Anschließend wurden 10  $\mu\text{L}$  GDP-Glo™-Reagenz (Promega Corporation, Madison, WI, USA) zugegeben und die Ansätze 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem gekoppelten lumineszenzbasierten Nachweis wird gebildetes GDP enzymatisch in ATP umgewandelt, das in einer Luciferase/Luciferin-Reaktion detektiert wird. Die Lumineszenz wurde mit einem EnVision-Multimode Plattenleser (PerkinElmer) gemessen. Die Auswertung der Konzentrations-Wirkungskurven erfolgte durch nichtlineare Regression (vierparametrische logistische Anpassung).  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden aus den sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven mit Quattro Workflow (Quattro Research GmbH) berechnet.

### **ERK-Assay:**

SNU-1-Zellen mit K-RAS<sup>G12D</sup>-Mutation (primäres Magenkarzinom) wurden in RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 1% L-Glutamin, bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für den Assay wurden die Zellen in weiße 384-Well-Mikrotiterplatten mit geringem Volumen (Greiner Bio-One) mit einer Dichte von 5 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well in 6  $\mu\text{L}$  serumfreiem RPMI-Medium (1% L-Glutamin) ausgesät. Die Platten wurden vor Zugabe der Testverbindungen 3 h in einem Inkubator mit hoher Luftfeuchtigkeit (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, ca. 90% rel. Luftfeuchtigkeit) inkubiert, um Verdunstung zu minimieren. Die Testsubstanzen wurden mittels eines akustischen Liquid-Handlers (Echo 520, Beckman Coulter) als dreifache achtstufige Verdünnungsreihe zugegeben. Die maximale Endkonzentration betrug 330  $\mu\text{M}$  bei einem konstanten DMSO-Endgehalt von 1% (v/v). Nach Substanzzugabe erfolgte eine weitere Inkubation über 1 h unter den genannten Bedingungen. Zur Stimulation wurden 3  $\mu\text{L}$  einer 9 nM EGF-Lösung (in serumfreiem Medium) zugegeben, sodass sich eine finale EGF-Konzentration von 3 nM im Well ergab. Nach 15 min Inkubation wurde die Lyse durch Zugabe von 3  $\mu\text{L}$  vierfach konzentriertem Lysepuffer aus dem Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)- sowie dem Total-ERK1/2 LANCE® Ultra TR-FRET Cellular Detection Kit (PerkinElmer) eingeleitet. Die Platten wurden 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Während dieser Inkubation wurde die Antikörper-Detektionsmischung gemäß Herstellerangaben hergestellt. Anschließend wurden 3  $\mu\text{L}$  der Detektionsmischung pro Well zugegeben. Die Platten wurden mit Aluminium-Klebefolie versiegelt und 20 h bei

Raumtemperatur inkubiert. Die TR-FRET-Signale wurden mit einem EnVision 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer) gemessen.

### **Nano-BRET:**

Der NanoBRET<sup>®</sup> TE Intracellular RAS Assay basiert auf der NanoBiT<sup>®</sup>-Technologie (Promega Corporation), einem strukturellen Komplementationssystem aus einer großen Luciferase-Untereinheit (LgBiT) und einem komplementären Peptid (SmBiT). HEK293T-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für LgBiT-K-Ras2B (G12D) und SmBiT-K-Ras2B (G12D) kotransfiziert (TransIT-LT1, Mirus Bio) gemäß Herstellerprotokoll. Nach der Transfektion wurden 9 µL Zell-Suspension (2160 Zellen pro Well) in weiße 384-Well-Mikrotiterplatten (z. B. Greiner Bio-One, Kat.-Nr. 784080) überführt und 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Testverbindungen wurden mittels eines akustischen Dispensers (Echo, Beckman Coulter) unter Verwendung der Echo Dose Response-Software als achtstufige Verdünnungsreihe (z. B. 100 µM bis 0,025 µM) zugegeben. Nach kurzem Mischen (1 min) und 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 1 µL NanoBRET<sup>®</sup> TE Ras Tracer 01 (Endkonzentration 1 µM) zugesetzt, gefolgt von erneutem Mischen. Die Platten wurden 2 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Danach wurden 5 µL NanoBRET<sup>™</sup> Nano-Glo<sup>®</sup>-Substrat (Promega Corporation) zugegeben. Nach max. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das BRET-Signal mit einem EnVision-Multimode-Plattenleser (Revvity, Waltham, MA, USA) bei Emissionswellenlängen von 460 nm (Donor) und 645 nm (Akzeptor) gemessen. Die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regression der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurven; IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit der Software Analyse (Scigilian) bestimmt.

### **HTRF-PPI-Assay:**

Der Assay basiert auf rekombinanten, markierten humanen Proteinen (K-Ras<sup>WT</sup> und SOS1) sowie fluoreszenzmarkierten Anti-Tag-Antikörpern für die HTRF-Detektion. GTP-beladenes K-Ras<sup>WT</sup> bindet in Abwesenheit eines Inhibitors an SOS1. Die simultane Bindung der Terbium-Kryptat-markierten Anti-Tag2- und der XL665-markierten Anti-Tag1-Antikörper an die jeweiligen Fusionsproteine führt zur Ausbildung eines HTRF-Signals. In Anwesenheit von Inhibitoren der K-Ras/SOS1-Interaktion oder von GTP-kompetitiven Substanzen kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des HTRF-Signals. Für jede Probe wurden 1,5 µL Assaypuffer und 3 µL Tag2-SOS1-Protein in eine geeignete 384-Well-Mikrotiterplatte (z. B. Corning Incorporated, Kat.-Nr. 4513) vorgelegt. Die Testverbindungen wurden mittels eines akustischen Dispensers (Echo, Beckman

Coulter) als achtstufige Verdünnungsreihe (z. B. 50  $\mu\text{M}$  bis 0,115  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 3  $\mu\text{L}$  Tag1-K-Ras-Protein zugesetzt. Anschließend wurden 7,5  $\mu\text{L}$  einer Detektionsmischung, bestehend aus Terbium-Kryptat-markiertem Anti-Tag2-Antikörper und XL665-markiertem Anti-Tag1-Antikörper, hinzugefügt. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das HTRF-Signal mit einem EnVision-Multimode-Plattenleser (Revvity) bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm sowie Emissionswellenlängen von 615 nm (Donor) und 665 nm (Akzeptor) gemessen. Die Auswertung erfolgte über das Verhältnis der Emissionssignale (665/615 nm).  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden durch nichtlineare Regression der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurven mit der Software Analyze (Scigilian) bestimmt.

### **Cell-Titer-Glow**

Der CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassays (Promega Corporation) basiert auf der Quantifizierung von intrazellulärem ATP als Maß für metabolisch aktive Zellen. Pro Well wurden 2,5  $\mu\text{L}$  einer Zellsuspension in einer zuvor optimierten Zelldichte ausgesät, die eine lineare Korrelation zwischen Zellzahl und Lumineszenzsignal gewährleistete. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  wurden die in DMSO gelösten Testverbindungen mittels akustischer Liquid-Handling-Technologie (Echo-System) in den gewünschten Konzentrationen zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 72 h bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  in humidifizierter Atmosphäre inkubiert. Mit DMSO behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle (100% Viabilität), während mit 10  $\mu\text{M}$  Staurosporin behandelte Zellen als Negativkontrolle (minimale Viabilität) eingesetzt wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit (insgesamt 96 h bzw. wie angegeben 5–72 h nach Substanzzugabe) wurden die Platten auf Raumtemperatur äquilibriert. Das CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Reagenz wurde gemäß Herstellerangaben rekonstituiert und in einem dem Zellmedium entsprechenden Volumen zugegeben. Die Platten wurden 2 min bei ca. 300 rpm orbital geschüttelt, um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten, und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Stabilisierung des Lumineszenzsignals zu erreichen. Die Lumineszenz wurde mit einem Victor<sup>™</sup> Multilabel Microplate Reader (PerkinElmer) bei einer Integrationszeit von 200 ms gemessen. Die Auswertung erfolgte durch Anpassung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve (Fit 205) unter Verwendung der XLfit-Software;  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden aus den resultierenden Kurven bestimmt. Zur Qualitätssicherung wurde der Z'-Faktor auf Basis von jeweils 16 Replikaten der Positiv- und Negativkontrollen berechnet. Ausschließlich Experimente mit einem Z'-Faktor  $\geq 0,5$  wurden für die weitere Analyse berücksichtigt.



## 10. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
pABN	<i>p</i> -Aminobenzonitril ( <i>p</i> Abn)
AcOH	Essigsäure
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Adba	4-Amino- <i>N,N</i> -dimethylbenzylamin (Adba)
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase
allo	allosterisch
AlMe <sub>3</sub>	Trimethylaluminium
pAPT	<i>p</i> -Aminophenyltetrazol
mAPT	<i>m</i> -Aminophenyltetrazol
pAp	<i>p</i> -Aminophenol
Äq.	Äquivalente
AtP	Adenosintriphosphat
BzCl	Benzoylchlorid
CSA	Camphersulfonsäure
CTG	Cell Titer Glow
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMP	Dess-Martin-Periodan
DS	Docking Score
EE	Ethylacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxid hexafluorophosphat
HBA	H-Brückenakzeptoren
HBD	H-Brückendonoren
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i>
H-Ras	<i>Harvey Rat Sarcoma Virus</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HVR	Hypervariable Region

## 10. Abkürzungsverzeichnis

---

<b>IC<sub>50</sub></b>	Halbmaximale Inhibitorkonzentration
<b>iPPI</b>	Protein-Protein-Wechselwirkungsinhibitoren
<b>J</b>	Kopplungskonstante
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissoziationskonstante
<b>K-Ras</b>	<i>Kirsten Rat Sarcoma Virus</i>
<b>LDA</b>	Lithiumdiisopropylamin
<b>M</b>	mol/L
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MDS</b>	Moleküldynamiksimulation
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MEK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>min</b>	Minuten
<b>MM/GBSA</b>	Molecular mechanics generalized born surface area
<b>MOM-Cl</b>	Chlormethyl-methylether
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>NaH</b>	Natriumhydrid
<b>N-Ras</b>	Neuroblastoma Ras
<b>μM</b>	mikromolar
<b>R<sub>f</sub></b>	Retentionsfaktor
<b>K-Ras</b>	<i>Kirsten Rat Sarcoma Virus</i>
<b>pERK</b>	Phosphoryliertes ERK
<b>p-loop</b>	Phosphat-bindende Loop
<b>PPI</b>	Protein-Protein-Wechselwirkung
<b>QSAR</b>	<i>Quantitative structure activity relationship</i>
<b>R<sub>f</sub></b>	Retentionsfaktor
<b>Rem</b>	<i>Ras exchange Motif</i>
<b>Rho</b>	Ras Homolog
<b>RO4</b>	<i>Rule of four</i>
<b>RO5</b>	<i>Lipinski rule of five</i>
<b>SAR</b>	Struktur-Wirkungs-Beziehung
<b>SOS</b>	<i>Son of Sevenless</i>
<b>TBAF</b>	Tetrabutylammoniumfluorid
<b>TEA</b>	Triethylamin
<b>Tf</b>	Triflat
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>TMU</b>	Tetramethylharnstoff
<b>TsCl</b>	Tosylchlorid
<b>t-SNE</b>	<i>t-Distributed stochastic neighbour embedding</i>
<b>Verb.</b>	Verbindung

## 11. Literaturverzeichnis

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209-249.
- [2] F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, I. Soerjomataram, A. Jemal, "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 229-263.
- [3] I. B. Weinstein, "Addiction to Oncogenes-the Achilles Heal of Cancer", *Science* **2002**, *297*, 63-64.
- [4] S. V. Sharma, M. A. Fischbach, D. A. Haber, J. Settleman, T. Eisen, B. Johnson, D. Johnson, "Oncogenic Shock": Explaining Oncogene Addiction through Differential Signal Attenuation", *Clin. Cancer Res.* **2006**, *14*, 4392-4395.
- [5] K. Garber, "Research Retreat: Pfizer Eliminates Sugen, Shrinks Cancer Infrastructure", *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 1036-1038.
- [6] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashij, Y. Kate, M. Morimoto, F. Tomita, "Staurosporine, a Potent Inhibitor of Phospholipid/Ca<sup>++</sup>Dependent Protein Kinase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *135*, 397-402.
- [7] O. A. B. S. M. Gani, R. A. Engh, "Protein kinase inhibition of clinically important staurosporine analogues", *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 489-498.
- [8] M. W. Karaman, S. Herrgard, D. K. Treiber, P. Gallant, C. E. Atteridge, B. T. Campbell, K. W. Chan, P. Ciceri, M. I. Davis, P. T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J. P. Hunt, D. J. Lockhart, Z. V. Milanov, M. J. Morrison, G. Pallares, H. K. Patel, S. Pritchard, L. M. Wodicka, P. P. Zarrinkar, "A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity", *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127-132.
- [9] H. Kantarjian, C. Sawyers, A. Hochhaus, F. Guilhot, C. Schiffer, C. Gambacorti-Passerini, D. Niederwieser, D. Resta, R. Capdeville, U. Zoellner, M. Talpaz, B. Druker, "Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia", *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 645-652.
- [10] J. M. Goldman, J. V. Melo, "Targeting the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia", *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1084-1086.
- [11] A. L. Hopkins, C. R. Groom, "The druggable genome", *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727-730.
- [12] P. Amaral, S. Carbonell-Sala, F. M. De La Vega, T. Faial, A. Frankish, T. Gingeras, R. Guigo, J. L. Harrow, A. G. Hatzigeorgiou, R. Johnson, T. D. Murphy, M. Pertea, K. D. Pruitt, S. Pujar, H. Takahashi, I. Ulitsky, A. Varabyou, C. A. Wells, M. Yandell, P. Carninci, S. L. Salzberg, "The status of the human gene catalogue", *Nature* **2023**, *622*, 41-47.
- [13] M. D. Smith, L. Darryl Quarles, O. Demerdash, J. C. Smith, "Drugging the entire human proteome: Are we there yet?", *Drug Discov. Today* **2024**, *29*, 103891.

- [14] J. J. Harvey, "An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice", *Nature* **1964**, *204*, 1104-1105.
- [15] K. Shimizu, M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Feramisco, E. Stavnezer, J. Fogh, M. H. Wigler, "Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2112-2116.
- [16] W. H. Kirsten, L. A. Mayer, "Morphologic Responses to a Murine Erythroblastosis Virus<sup>2</sup>", *J. Natl. Cancer Inst.* **1967**, *39*, 311-335.
- [17] M. J. Whitley, T. H. Tran, M. Rigby, M. Yi, S. Dharmiah, T. J. Waybright, N. Ramakrishnan, S. Perkins, T. Taylor, S. Messing, D. Esposito, D. V Nissley, F. McCormick, A. G. Stephen, T. Turbyville, G. Cornilescu, D. K. Simanshu, "Comparative analysis of KRAS4a and KRAS4b splice variants reveals distinctive structural and functional properties", *Sci. Adv.* **2024**, *10*, 4137.
- [18] J. Abubaker, P. Bavi, W. Al-Haqawi, M. Sultana, S. Al-Harbi, N. Al-Sanea, A. Abduljabbar, L. H. Ashari, S. Alhomoud, F. Al-Dayel, S. Uddin, K. S. Al-Kuraya, "Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma", *J. Pathol.* **2009**, *219*, 435-445.
- [19] K. Wennerberg, K. L. Rossman, C. J. Der, "The Ras superfamily at a glance", *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 843-846.
- [20] I. Ahearn, M. Zhou, M. R. Philips, "Posttranslational Modifications of RAS Proteins", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a031484.
- [21] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane", *Cell* **1990**, *63*, 133-139.
- [22] R. Nussinov, C. J. Tsai, H. Jang, "Oncogenic Ras isoforms signaling specificity at the membrane", *Cancer Res.* **2018**, *78*, 593-602.
- [23] M. Schmick, N. Vartak, B. Papke, M. Kovacevic, D. C. Truxius, L. Rossmannek, P. I. H. Bastiaens, "KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport", *Cell* **2014**, *157*, 459-471.
- [24] Y. Zhou, P. Prakash, A. A. Gorfe, J. F. Hancock, "Ras and the Plasma Membrane: A Complicated Relationship", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a031831.
- [25] R. S. Goody, M. P. Müller, D. Rauh, "Mutant-Specific Targeting of Ras G12C Activity by Covalently Reacting Small Molecules", *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 1338-1348.
- [26] J. P. O'Bryan, "Pharmacological targeting of RAS: Recent success with direct inhibitors" *Pharmacol. Res.* **2019**, *139*, 503-511.
- [27] R. Spencer-Smith, J. P. O'Bryan, "Direct inhibition of RAS: Quest for the Holy Grail?", *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *54*, 138-148.

- [28] D. N. Shalaeva, D. A. Cherepanov, M. Y. Galperin, A. V. Golovin, A. Y. Mulikidjanian, "Evolution of cation binding in the active sites of P-loop nucleoside triphosphatases in relation to the basic catalytic mechanism", *eLife* **2018**, 7, e37373.
- [29] D. Mann, C. Teuber, S. A. Tennigkeit, G. Schröter, K. Gerwert, C. Kötting, E. F. Pai, "Mechanism of the intrinsic arginine finger in heterotrimeric G proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, 113, E8041-E8050.
- [30] J. C. Hunter, A. Manandhar, M. A. Carrasco, D. Gurbani, S. Gondi, K. D. Westover, "Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations", *Mol. Cancer Res.* **2015**, 13, 1325-1335.
- [31] H. Resat, T. P. Straatsma, D. A. Dixon, J. H. Miller, "The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 6033-6038.
- [32] G. Buhrman, G. Holzapfel, S. Fetics, C. Mattos, "Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 4931-4936.
- [33] R. S. Goody, M. Frech, A. Wittinghofer, "Affinity of guanine nucleotide binding proteins for their ligands: facts and artefacts", *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 327-328.
- [34] P. Bandaru, Y. Kondo, J. Kuriyan, "The Interdependent Activation of Son-of-Sevenless and Ras", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2019**, 9, a031534.
- [35] A. Nimnual, D. Bar-Sagi, "The Two Hats of SOS", *Science's STKE* **2002**, 2002, pe36-pe36.
- [36] S. S. Yang, L. Van Aelst, D. Bar-Sagi, "Differential interactions of human Sos1 and Sos2 with Grb2", *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18212-18215.
- [37] F. C. Baltanás, N. Zarich, J. M. Rojas-Cabañeros, E. Santos, "SOS GEFs in health and disease", *BBA Rev. Cancer* **2020**, 1874, 188445.
- [38] K. R. D. S. Corbalan-Garcia S.-S. Yang, D. Bar-Sagi, "Identification of the Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Sites on Human Sos1 That Regulate Interaction with Grb2", *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 5674-5682.
- [39] A. R. Moore, S. C. Rosenberg, F. McCormick, S. Malek, "RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged?", *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, 19, 533-552.
- [40] P. A. Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "The structural basis of the activation of Ras by Sos", *Nature* **1998**, 394, 337-343.
- [41] C. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer, R. S. Goody, "The Kinetic Mechanism of Ran-Nucleotide Exchange Catalyzed by RCC1", *Biochem.* **1995**, 34, 12543-12552.
- [42] C. Lenzen, R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, "Kinetic Analysis by Fluorescence of the Interaction between Ras and the Catalytic Domain of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cdc25Mm", *Biochem.* **1998**, 37, 7420-7430.

- [43] B. D. Bennett, E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J. Van Dien, J. D. Rabinowitz, "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*", *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 593-599.
- [44] S. M. Margarit, H. Sondermann, B. E. Hall, B. Nagar, A. Hoelz, M. Pirruccello, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "Structural Evidence for Feedback Activation by Ras·GTP of the Ras-Specific Nucleotide Exchange Factor SOS", *Cell* **2003**, *112*, 685-695.
- [45] Z. Moghadamchargari, M. Shirzadeh, C. Liu, S. Schrecke, C. Packianathan, D. H. Russell, M. Zhao, A. Laganowsky, "Molecular assemblies of the catalytic domain of SOS with KRas and oncogenic mutants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2022403118.
- [46] T. S. Freedman, H. Sondermann, O. Kuchment, G. D. Friedland, T. Kortemme, J. Kuriyan, "Differences in Flexibility Underlie Functional Differences in the Ras Activators Son of Sevenless and Ras Guanine Nucleotide Releasing Factor 1", *Structure* **2009**, *17*, 41-53.
- [47] M. E. Bahar, H. J. Kim, D. R. Kim, "Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies", *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 455.
- [48] I. A. Prior, F. E. Hood, J. L. Hartley, "The frequency of ras mutations in cancer", *Cancer Res.* **2020**, *80*, 2669-2974.
- [49] L. Herdeis, D. Gerlach, D. B. McConnell, D. Kessler, "Stopping the beating heart of cancer: KRAS reviewed", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *71*, 136-147.
- [50] S. Pudewell, C. Wittich, N. S. Kazemineh, F. Bazgir, M. R. Ahmadian, "Accessory proteins of the RAS-MAPK pathway: moving from the side line to the front line", *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 696.
- [51] S. Nakhaei-Rad, F. Haghghi, P. Nouri, S. Rezaei Adariani, J. Lissy, N. S. Kazemineh, R. Dvorsky, M. R. Ahmadian, "Structural fingerprints, interactions, and signaling networks of RAS family proteins beyond RAS isoforms", *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **2018**, *53*, 130-156.
- [52] O. Blaževič, Y. G. Mideksa, M. Šolman, A. Ligabue, N. Ariotti, H. Nakhaeizadeh, E. K. Fansa, A. C. Papageorgiou, A. Wittinghofer, M. R. Ahmadian, D. Abankwa, "Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering", *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24165.
- [53] H. Lavoie, M. Therrien, "Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 281-298.
- [54] T. A. Leonard, J. H. Hurley, "Regulation of protein kinases by lipids", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 785-791.
- [55] Z. Luo, B. Diaz, M. S. Marshall, J. Avruch, "An Intact Raf Zinc Finger Is Required for Optimal Binding to Processed Ras and for Ras-Dependent Raf Activation *In Situ*", *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 46-53.
- [56] L. K. Rushworth, A. D. Hindley, E. O'Neill, W. Kolch, "Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization", *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 2262-2272.

- [57] C. K. Weber, J. R. Slupsky, H. A. Kalmes, U. R. Rapp, "Active Ras Induces Heterodimerization of cRaf and BRaf 1", *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3595-3598.
- [58] C. S. Mason, C. J. Springer, R. G. Cooper, G. Superti-Furga, C. J. Marshall, R. Marais, "Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation", *EMBO J.* **1999**, *18*, 2137-2148.
- [59] M. Drosten, M. Barbacid, "Targeting the MAPK pathway in KRAS-driven tumors", *Cancer Cell* **2020**, *37*, 543-550.
- [60] H. Lavoie, J. Gagnon, M. Therrien, "ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 607-632.
- [61] Y. Kamioka, S. Yasuda, Y. Fujita, K. Aoki, M. Matsuda, "Multiple decisive phosphorylation sites for the negative feedback regulation of SOS1 via ERK", *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 33540-33548.
- [62] M. S. Lawrence, P. Stojanov, C. H. Mermel, J. T. Robinson, L. A. Garraway, T. R. Golub, M. Meyerson, S. B. Gabriel, E. S. Lander, G. Getz, "Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types", *Nature* **2014**, *505*, 495-501.
- [63] G. Hoxhaj, B. D. Manning, "The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism", *Nat. Rev. Cancer*, **2020**, *20*, 74-78.
- [64] L. M. Thorpe, H. Yuzugullu, J. J. Zhao, "PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting", *Nat. Rev. Cancer*, **2015**, *15*, 7-24.
- [65] B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu, G. B. Mills, "Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery", *Nat. Rev. Drug Disc.* **2005**, *4*, 988,1004.
- [66] D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini, "Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex", *Science* **2005**, *307*, 1098-1101.
- [67] M. Andjelkovic, "Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B", *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31515-31524.
- [68] T. W. Traut, "Physiological concentrations of purines and pyrimidines", *Mol. Cell. Biochem.*, **1994**, *140*, 1-22.
- [69] L. A. Smyth, I. Collins, "Measuring and interpreting the selectivity of protein kinase inhibitors", *J. Chem. Biol.* **2009**, *2*, 131-151.
- [70] Y. Xiong, J. Lu, J. Hunter, L. Li, D. Scott, H. G. Choi, S. M. Lim, A. Manandhar, S. Gondi, T. Sim, K. D. Westover, N. S. Gray, "Covalent guanosine mimetic inhibitors of G12C KRAS", *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 61-66.
- [71] S. Jeganathan, M. P. Müller, I. Ali, R. S. Goody, "Assays for Nucleotide Competitive Reversible and Irreversible Inhibitors of Ras GTPases", *Biochem.* **2018**, *57*, 4690-4699.
- [72] M. P. Müller, S. Jeganathan, A. Heidrich, J. Campos, R. S. Goody, "Nucleotide based covalent inhibitors of KRas can only be efficient in vivo if they bind reversibly with GTP-like affinity", *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3687.

- [73] D. Wiegandt, S. Vieweg, F. Hofmann, D. Koch, F. Li, Y.-W. Wu, A. Itzen, M. P. Müller, R. S. Goody, "Locking GTPases covalently in their functional states", *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7773.
- [74] D. E. Scott, A. R. Bayly, C. Abell, J. Skidmore, "Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein-protein interaction challenge", *Nat. Rev. Drug Disc.* **2016**, *15*, 533-550.
- [75] N. Berndt, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, "Targeting protein prenylation for cancer therapy", *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 775-791.
- [76] F. Tamanoi, J. Lu, "Inhibitors of the Ras Superfamily G-Proteins, Part B", **1. Aufl.** *Academic Press*, **2013**, *San Diego*.
- [77] C. A. Rowell, J. J. Kowalczyk, M. D. Lewis, A. M. Garcia, "Direct Demonstration of Geranylgeranylation and Farnesylation of Ki-Ras *in vivo*", *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14093-14097.
- [78] R. Streeper, D. Campos, G. Carrizales, T. C. Stephens, E. Izbiccka, "Regulation of Tumor Signaling Pathways by AZD3409 In Vitro", *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 4185-4189.
- [79] P. M. Düppe, T. Tran Thi Phuong, J. Autzen, M. Schöpel, K. T. Yip, R. Stoll, J. Scherkenbeck, "Sequence-Selective Molecular Recognition of the C-Terminal CaaX-Boxes of Rheb and Related Ras-Proteins by Synthetic Receptors", *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1755-1763.
- [80] C. Schmuck, "Carboxylate Binding by 2-(Guanidiniocarbonyl)pyrrole Receptors in Aqueous Solvents: Improving the Binding Properties of Guanidinium Cations through Additional Hydrogen Bonds", *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 709-718.
- [81] C. Schmuck, L. Geiger, "Dipeptide Binding in Water by a de Novo Designed Guanidiniocarbonylpyrrole Receptor" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8898-8899.
- [82] T. Gersthagen, C. Schmuck, T. Schrader, "Artificial RGD receptor molecules", *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 853-861.
- [83] M. Franz, B. Mörchen, C. Degenhart, D. Gülden, O. Shkura, D. Wolters, U. Koch, B. Klebl, R. Stoll, I. Helfrich, J. Scherkenbeck, "Sequence-Selective Covalent CaaX-Box Receptors Prevent Farnesylation of Oncogenic Ras Proteins and Impact MAPK/PI3K Signaling", *Chem. Med. Chem.* **2021**, *16*, 2504-2514.
- [84] A. Chandra, H. E. Grecco, V. Pisupati, D. Perera, L. Cassidy, F. Skoulidis, S. A. Ismail, C. Hedberg, M. Hanzal-Bayer, A. R. Venkitaraman, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, "The GDI-like solubilizing factor PDE $\delta$  sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins", *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 148-158.
- [85] P. Martín-Gago, E. K. Fansa, C. H. Klein, S. Murarka, P. Janning, M. Schürmann, M. Metz, S. Ismail, C. Schultz-Fademrecht, M. Baumann, P. I. H. Bastiaens, A. Wittinghofer, H. Waldmann, "A PDE $\delta$ -KRas Inhibitor Chemotype with up to Seven H-Bonds and Picomolar Affinity that Prevents Efficient Inhibitor Release by Arl2", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2423-2428.

- [86] S. Murarka, P. Martín-Gago, C. Schultz-Fademrecht, A. Al Saabi, M. Baumann, E. K. Fansa, S. Ismail, P. Nussbaumer, A. Wittinghofer, H. Waldmann, "Development of Pyridazinone Chemotypes Targeting the PDE $\delta$  Prenyl Binding Site", *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 6083-6093.
- [87] P. Martín-Gago, E. K. Fansa, A. Wittinghofer, H. Waldmann, "Structure-based development of PDE $\delta$  inhibitors", *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 535-545.
- [88] K. Parikh, G. Banna, S. V. Liu, A. Friedlaender, A. Desai, V. Subbiah, A. Addeo, "Drugging KRAS: current perspectives and state-of-art review", *J. Hematol. Oncol.* **2022**, *15*, 152.
- [89] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, K. M. Shokat, "K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions", *Nature* **2013**, *503*, 548-551.
- [90] M. P. Patricelli, M. R. Janes, L. S. Li, R. Hansen, U. Peters, L. V. Kessler, Y. Chen, J. M. Kucharski, J. Feng, T. Ely, J. H. Chen, S. J. Firdaus, A. Babbar, P. Ren, Y. Liu, "Selective inhibition of oncogenic KRAS output with small molecules targeting the inactive state", *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 316-329.
- [91] B. A. Lanman, J. R. Allen, J. G. Allen, A. K. Amegadzie, K. S. Ashton, S. K. Booker, J. J. Chen, N. Chen, M. J. Frohn, G. Goodman, D. J. Kopecky, L. Liu, P. Lopez, J. D. Low, V. Ma, A. E. Minatti, T. T. Nguyen, N. Nishimura, A. J. Pickrell, A. B. Reed, Y. Shin, A. C. Siegmund, N. A. Tamayo, C. M. Tegley, M. C. Walton, H. L. Wang, R. P. Wurz, M. Xue, K. C. Yang, P. Achanta, M. D. Bartberger, J. Canon, L. S. Hollis, J. D. McCarter, C. Mohr, K. Rex, A. Y. Saiki, T. San Miguel, L. P. Volak, K. H. Wang, D. A. Whittington, S. G. Zech, J. R. Lipford, V. J. Cee, "Discovery of a Covalent Inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors", *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 52-65.
- [92] A. Lee, "Sotorasib: A Review in KRAS G12C Mutation-Positive Non-small Cell Lung Cancer", *Target Oncol.* **2022**, *17*, 727-733.
- [93] M. Molina-Arcas, J. Downward, "Exploiting the therapeutic implications of KRAS inhibition on tumor immunity", *Cancer Cell*, **2024**, *42*, 338-357.
- [94] J. B. Fell, J. P. Fischer, B. R. Baer, J. F. Blake, K. Bouhana, D. M. Briere, K. D. Brown, L. E. Burgess, A. C. Burns, M. R. Burkard, H. Chiang, M. J. Chicarelli, A. W. Cook, J. J. Gaudino, J. Hallin, L. Hanson, D. P. Hartley, E. J. Hicken, G. P. Hingorani, R. J. Hinklin, M. J. Mejia, P. Olson, J. N. Otten, S. P. Rhodes, M. E. Rodriguez, P. Savechenkov, D. J. Smith, N. Sudhakar, F. X. Sullivan, T. P. Tang, G. P. Vigers, L. Wollenberg, J. G. Christensen, M. A. Marx, "Identification of the Clinical Development Candidate MRTX849, a Covalent KRASG12C Inhibitor for the Treatment of Cancer" *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6679-6693.
- [95] Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, "Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140-6143.
- [96] T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. Wu, A. M. Giannetti, M. A. Starovasnik,

- I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. Wang, G. Fang, "Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5299-5304.
- [97] S. Vajda, D. Beglov, A. E. Wakefield, M. Egbert, A. Whitty, "Cryptic binding sites on proteins: definition, detection, and druggability" *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *44*, 1-8.
- [98] D. Kessler, M. Gmachl, A. Mantoulidis, L. J. Martin, A. Zoepfel, M. Mayer, A. Gollner, D. Covini, S. Fischer, T. Gerstberger, T. Gmaschitz, C. Goodwin, P. Greb, D. Häring, W. Hela, J. Hoffmann, J. Karolyi-Oezguer, P. Knesl, S. Kornigg, M. Koegl, R. Kousek, L. Lamarre, F. Moser, S. Munico-Martinez, C. Peinsipp, J. Phan, J. Rinnenthal, J. Sai, C. Salamon, Y. Scherbantini, K. Schipany, R. Schnitzer, A. Schrenk, B. Sharps, G. Siszler, Q. Sun, A. Waterson, B. Wolkerstorfer, M. Zeeb, M. Pearson, S. W. Fesik, D. B. McConnell, "Drugging an undruggable pocket on KRAS", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 15823-15829.
- [99] M. Schöpel, K. F. G. Jockers, P. M. Düppe, J. Autzen, V. N. Potheraveedu, S. Ince, K. T. Yip, R. Heumann, C. Herrmann, J. Scherckenbeck, R. Stoll, "Bisphenol A binds to Ras proteins and competes with guanine nucleotide exchange: Implications for GTPase-selective antagonists", *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9664-9672.
- [100] M. Schöpel, C. Herrmann, J. Scherckenbeck, R. Stoll, "The Bisphenol A analogue Bisphenol S binds to K-Ras4B - Implications for 'BPA-free' plastics", *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 369-375.
- [101] M. Schöpel, O. Shkura, J. Seidel, K. Kock, X. Zhong, S. Löffek, I. Helfrich, H. S. Bachmann, J. Scherckenbeck, C. Herrmann, R. Stoll, "Allosteric activation of GDP-bound ras isoforms by bisphenol derivative plasticisers", *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1133.
- [102] S. Jeuken, O. Shkura, M. Röger, V. Brickau, A. Choidas, C. Degenhart, D. Gülден, B. Klebl, U. Koch, R. Stoll, J. Scherckenbeck, "Synthesis, Biological Evaluation, and Binding Mode of a New Class of Oncogenic K-Ras4b Inhibitors", *Chem. Med. Chem.* **2022**, *17*, e202200392.
- [103] A. Cruz-Migoni, P. Canning, C. E. Quevedo, C. J. R. Bataille, N. Bery, A. Miller, A. J. Russell, S. E. V. Phillips, S. B. Carr, T. H. Rabbitts, "Structure-based development of new RAS-effector inhibitors from a combination of active and inactive RAS-binding compounds", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 2545-2550.
- [104] C. E. Quevedo, A. Cruz-Migoni, N. Bery, A. Miller, T. Tanaka, D. Petch, C. J. R. Bataille, L. Y. W. Lee, P. S. Fallon, H. Tulmin, M. T. Ehebauer, N. Fernandez-Fuentes, A. J. Russell, S. B. Carr, S. E. V. Phillips, T. H. Rabbitts, "Small molecule inhibitors of RAS-effector protein interactions derived using an intracellular antibody fragment" *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3169.
- [105] M. Holderfield, B. J. Lee, J. Jiang, A. Tomlinson, K. J. Seamon, A. Mira, E. Patrucco, G. Goodhart, J. Dilly, Y. Gindin, N. Dinglasan, Y. Wang, L. P. Lai, S. Cai, L. Jiang, N. Nasholm, N. Shifrin, C. Blaj, H. Shah, J. W. Evans, N. Montazer, O. Lai, J. Shi, E. Ahler, E. Quintana, S. Chang, A. Salvador, A. Marquez, J. Cregg, Y. Liu, A. Milin, A. Chen, T. B. Ziv, D. Parsons, J. E. Knox, J. E. Klomp, J. Roth, M. Rees, M. Ronan, A. Cuevas-Navarro, F. Hu, P. Lito, D.

- Santamaria, A. J. Aguirre, A. M. Waters, C. J. Der, C. Ambrogio, Z. Wang, A. L. Gill, E. S. Koltun, J. A. M. Smith, D. Wildes, M. Singh, "Concurrent inhibition of oncogenic and wild-type RAS-GTP for cancer therapy", *Nature* **2024**, 629, 919-926.
- [106] Y. Q. Song, Q. Li, C. Sheng, "RMC-7977, a highly selective inhibitor of the active RAS-GTP to treat pancreatic cancer" *Acta Pharm. Sin. B* **2024**, 14, 4622.
- [107] P. Filis, D. Salgkamis, A. Matikas, I. Zerdes, "Breakthrough in RAS targeting with pan-RAS (ON) inhibitors RMC-7977 and RMC-6236" *Drug Disc. Today* **2025**, 30, 104250.
- [108] X. Wang, S. Allen, J. F. Blake, V. Bowcut, D. M. Briere, A. Calinisan, J. R. Dahlke, J. B. Fell, J. P. Fischer, R. J. Gunn, J. Hallin, J. Laguer, J. D. Lawson, J. Medwid, B. Newhouse, P. Nguyen, J. M. O'Leary, P. Olson, S. Pajk, L. Rahbaek, M. Rodriguez, C. R. Smith, T. P. Tang, N. C. Thomas, D. Vanderpool, G. P. Vigers, J. G. Christensen, M. A. Marx, "Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor", *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 3123-3133.
- [109] "Study of MRTX1133 in Patients With Advanced Solid Tumors Harboring a KRAS G12D Mutation", NCT05737706, Phase 1/2 Interventional Clinical Trial, Mirati Therapeutics Inc. ClinicalTrials.gov, **06.03.2023-10.03.2025**, KRAS G12D-mutant advanced solid tumors, treatment with MRTX1133 (63 patients).
- [110] G. Tu, Y. Gong, X. Yao, Q. Liu, W. Xue, R. Zhang, "Pathways and mechanism of MRTX1133 binding to KRAS G12D elucidated by molecular dynamics simulations and Markov state models" *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, 274, 133374.
- [111] B. A. Müller, "Imatinib and Its Successors-How Modern Chemistry has Changed Drug Development", *Curr. Pharm. Des.* **2009**, 15, 120-133.
- [112] X. Song, Z. Zhou, A. Elmezayen, R. Wu, C. Yu, B. Gao, J. D. Minna, K. D. Westover, H. J. Zeh, G. Kroemer, L. E. Heasley, R. Kang, D. Tang, "SRC kinase drives multidrug resistance induced by KRAS-G12C inhibition", *Sci. Adv.* **2024**, 10, eadq4274.
- [113] N. Hondo, M. Kitazawa, M. Koyama, S. Nakamura, S. Tokumaru, S. Miyazaki, M. Kataoka, K. Seharada, Y. Soejima, "MEK inhibitor and anti-EGFR antibody overcome sotorasib resistance signals and enhance its antitumor effect in colorectal cancer cells", *Cancer Lett.* **2023**, 567, 216264.
- [114] C. Xu, W. Lin, Q. Zhang, Y. Ma, X. Wang, A. Guo, G. Zhu, Z. Zhou, W. Song, Z. Zhao, Y. Jiao, X. Wang, C. Du, "MGST1 facilitates novel KRASG12D inhibitor resistance in KRASG12D-mutated pancreatic ductal adenocarcinoma by inhibiting ferroptosis", *Mol. Med.* **2024**, 30, 199.
- [115] C. Li, Y. Liu, C. Liu, F. Chen, Y. Xie, H. J. Zeh, C. Yu, J. Liu, D. Tang, R. Kang, "AGER-dependent macropinocytosis drives resistance to KRAS-G12D-targeted therapy in advanced pancreatic cancer", *Sci. Transl. Med.* **2025**, 17, eadq4986.
- [116] J. Singh, D. Sharma, R. Bansal, "Pyridazinone: an attractive lead for anti-inflammatory and analgesic drug discovery", *Fut. Med. Chem.* **2017**, 9, 95-127.

- [117] J. Wang, H. Tan, Q. Sun, Z. Ge, X. Wang, Y. Wang, R. Li, "Design, synthesis and biological evaluation of pyridazino[3,4,5-de]quinazolin-3(2H)-one as a new class of PARP-1 inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2340-2344.
- [118] M. Tao, L. D. Aimone, J. A. Gruner, J. R. Mathiasen, Z. Huang, J. Lyons, R. Raddatz, R. L. Hudkins, "Synthesis and structure-activity relationship of 5-pyridazin-3-one phenoxy piperidines as potent, selective histamine H3 receptor inverse agonists", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1073-1077.
- [119] O. Ebenezer, M. A. Jordaan, G. Carena, T. Bono, M. Shapi, J. A. Tuszynski, "An overview of the biological evaluation of selected nitrogen-containing heterocycle medicinal chemistry compounds", *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8117.
- [120] E. Vitaku, D. T. Smith, J. T. Njardarson, "Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals", *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257-10274.
- [121] P. C. Mitter, J. N. Sen, "Cl.-Action of phenylhydrazine on phthalaldehydic and phthalonic acids: phenyl-hydrazo- and azo-phthalide", *J. Chem. Soc. Trans.* **1919**, *115*, 1145-1148.
- [122] B. L. Mylari, E. R. Larson, T. A. Beyer, W. J. Zembrowski, C. E. Aldinger, M. F. Dee, T. W. Siegel, D. H. Singleton, "Novel, Potent Aldose Reductase Inhibitors: 3,4-Dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazoly]methyl]-1-phthalazine-acetic Acid (Zopolrestat) and Congeners", *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 108-122.
- [123] G. F. Elmasry, E. E. Aly, F. M. Awadallah, S. M. El-Moghazy, "Design and synthesis of novel PARP-1 inhibitors based on pyridopyridazinone scaffold", *Bioorg. Chem.* **2019**, *87*, 655-666.
- [124] V. Dal Piaz, M. P. Giovannoni, C. Castellana, J. M. Palacios, J. Beleta, T. Doménech, V. Segarra, "Novel heterocyclic-fused pyridazinones as potent and selective phosphodiesterase IV inhibitors", *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1417-1421.
- [125] M. Van der Mey, A. Hatzelmann, G. P. M. Van Klink, I. J. Van der Laan, G. J. Sterk, U. Thibaut, W. R. Ulrich, H. Timmerman, "Novel selective PDE4 inhibitors. 2. Synthesis and structure-activity relationships of 4-aryl-substituted cis-tetra- and cis-hexahydrophthalazinones", *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2523-2535.
- [126] J. Veerman, T. Van Den Bergh, K. M. Orrling, C. Jansen, P. Cos, L. Maes, E. Chatelain, J. R. Ioset, E. E. Edink, H. Tenor, T. Seebeck, I. De Esch, R. Leurs, G. J. Sterk, "Synthesis and evaluation of analogs of the phenylpyridazinone NPD-001 as potent trypanosomal TbrPDEB1 phosphodiesterase inhibitors and in vitro trypanocidals", *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 1573-1581.
- [127] N. Dhiman, K. Kaur, V. Jaitak, "Tetrazoles as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies", *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115599.
- [128] L. Huff, R. A. Henry, "Alkylation of 5-substituted tetrazoles", *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 777-779.

- [129] J. Roh, K. Vávrová, A. Hrabálek, "Synthesis and functionalization of 5-substituted tetrazoles", *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 6101-6118.
- [130] A. Sarvary, A. Maleki, "A review of syntheses of 1, 5-disubstituted tetrazole derivatives", *Mol. Div.* **2015**, 19, 189-212.
- [131] C. Cheng, X. Zuo, D. Tu, B. Wan, Y. Zhang, "Synthesis of 3,4-Fused Tricyclic Indoles through Cascade Carbopalladation and C-H Amination: Development and Total Synthesis of Rucaparib", *Org. Lett.* **2020**, 22, 4985-4989.
- [132] R. Guo, X. Qi, H. Xiang, P. Geaneotes, R. Wang, P. Liu, Y.-M. Wang, "Stereodivergent Alkyne Hydrofluorination Using Protic Tetrafluoroborates as Tunable Reagents", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 16651-16660.
- [133] Y. B. Chen, L. G. Liu, Z. Q. Wang, R. Chang, X. Lu, B. Zhou, L. W. Ye, "Enantioselective functionalization of unactivated C(sp<sup>3</sup>)-H bonds through copper-catalyzed diyne cyclization by kinetic resolution", *Nat. Commun.* **2024**, 15, 2232.
- [134] S. Glang, T. Rieth, D. Borchmann, I. Fortunati, R. Signorini, H. Detert, "Arylethynyl-substituted triazolotriazines: Synthesis, optical properties, and thermotropic behavior", *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 3116-3126.
- [135] J. R. Robinson, N. E. Good, "Synthesis of indoleacetic acids", *Can. J. Chem.* **1957**, 35, 1578-1581.
- [136] F. Csende, Z. Szabó, "Partial dehydrogenation of saturated 4-phenyl-1(2H)-phthalazinone derivatives by thionyl chloride", *Synth. Commun.* **1993**, 23, 2957-2964.
- [137] F. S. Csende, Z. Bernáth, G. Stájer, "Copper(II) chloride as an efficient reagent for the dehydrogenation of pyridazinone derivatives", *Synthesis* **1995**, 1995, 1240-1242.
- [138] L. Huang, W. Shan, Q. Zhou, J. Xie, K. Lai, X. Li, "Design, synthesis and evaluation of dual pharmacology  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists and PDE4 inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 249-253.
- [139] W. J. Shan, L. Huang, Q. Zhou, H. L. Jiang, Z. H. Luo, K. F. Lai, X. S. Li, "Dual  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists-PDE4 inhibitors for the treatment of asthma and COPD", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 1523-1526.
- [140] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, "Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction", *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-3108.
- [141] S. J. Irudayam, R. H. Henchman, "Entropic Cost of Protein-Ligand Binding and Its Dependence on the Entropy in Solution" *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 5871-5884.
- [142] G. G. Ferenczy, G. M. Keseru, "Thermodynamics guided lead discovery and optimization", *Drug Disc. Today* **2010**, 15, 919-932.

- [143] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings", *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [144] A. Köllhofer, T. Pullmann, H. Plenio, "Pd-catalyzed cross-coupling: A versatile catalyst for the Sonogashira coupling of aryl chlorides", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1056-1058.
- [145] H. L. Wang, J. Katon, C. Balan, A. W. Bannon, C. Bernard, E. M. Doherty, C. Dominguez, N. R. Gavva, V. Gore, V. Ma, N. Nishimura, S. Surapaneni, P. Tang, R. Tamir, O. Thiel, J. J. S. Treanor, M. H. Norman, "Novel vanilloid receptor-1 antagonists: 3. The identification of a second-generation clinical candidate with improved physicochemical and pharmacokinetic properties", *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3528-3539.
- [146] A. V Sadybekov, V. Katritch, "Computational approaches streamlining drug discovery", *Nature* **2023**, *616*, 673-685.
- [147] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy", *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.
- [148] D. Gülden, "Design und Synthese neuer Liganden für die SI/II- und SII-Bindestellen des onkogenen K-Ras4B Proteins", *Dissertation (Universität Wuppertal)* **2025**
- [149] M. C. Burns, Q. Sun, R. N. Daniels, D. Camper, J. P. Kennedy, J. Phan, E. T. Olejniczak, T. Lee, A. G. Waterson, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, "Approach for targeting Ras with small molecules that activate SOS-mediated nucleotide exchange", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3401-3406.
- [150] J. J. G. Winter, M. Anderson, K. Blades, C. Brassington, A. L. Breeze, C. Chresta, K. Embrey, G. Fairley, P. Faulder, M. R. V. Finlay, J. G. Kettle, T. Nowak, R. Overman, S. J. Patel, P. Perkins, L. Spadola, J. Tart, J. A. Tucker, G. Wrigley, "Small molecule binding sites on the Ras:SOS complex can be exploited for inhibition of Ras activation", *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2265-2274.
- [151] A. S. Ben Geoffrey, D. Agrawal, N. M. Kulkarni, M. Gunasekaran, "Molecular Glue-Design-Evaluator (MOLDE): An advanced method for in-silico molecular glue design", *ACS Omega* **2025**, *10*, 6650-6662.
- [152] G. E. Benary, F. Kilgenstein, S. Koller, J. Scherkenbeck, "Monophthalates of betulinic acid and related pentacyclic triterpenes inhibit efficiently the SOS-mediated nucleotide exchange and impact PI3K/AKT signaling in oncogenic K-RAS4B proteins", *RSC Adv.* **2025**, *15*, 883-895.
- [153] H. Sondermann, S. M. Soisson, S. Boykevisch, S.-S. Yang, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, "Structural Analysis of Autoinhibition in the Ras Activator Son of Sevenless", *Cell* **2004**, *119*, 393-405.

- [154] J. Gureasko, W. J. Galush, S. Boykevisch, H. Sondermann, D. Bar-Sagi, J. T. Groves, J. Kuriyan, "Membrane-dependent signal integration by the Ras activator Son of Sevenless", *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 452-461.
- [155] Z. Moghadamchargari, M. Shirzadeh, C. Liu, S. Schrecke, C. Packianathan, D. H. Russell, M. Zhao, A. Laganowsky, "Molecular assemblies of the catalytic domain of SOS with KRas and oncogenic mutants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2022403118.
- [156] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings", *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 4-17.
- [157] H. Pajouhesh, G. R. Lenz, "Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs", *NeuroRX* **2005**, *2*, 541-553.
- [158] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules", *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
- [159] T. Cheng, Y. Zhao, X. Li, F. Lin, Y. Xu, X. Zhang, Y. Li, R. Wang, L. Lai, "Computation of Octanol-Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge", *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2140-2148.
- [160] J. S. Delaney, "ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1000-1005.
- [161] J. Ali, P. Camilleri, M. B. Brown, A. J. Hutt, S. B. Kirton, "Revisiting the General Solubility Equation: In Silico Prediction of Aqueous Solubility Incorporating the Effect of Topographical Polar Surface Area", *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 420-428.
- [162] Z. Donders, I. J. Skorupska, E. Willems, F. Mussen, J. Van Broeckhoven, A. Carlier, M. Schepers, T. Vanmierlo, "Beyond PDE4 inhibition: A comprehensive review on downstream cAMP signaling in the central nervous system" *Biomed. Pharmacother.* **2024**, *177*, 117009.
- [163] G. S. Baillie, S. J. MacKenzie, I. McPhee, M. D. Houslay, "Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases", *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *131*, 811-819.
- [164] A. R. Blaazer, A. K. Singh, E. De Heuvel, E. Edink, K. M. Orrling, J. J. N. Veerman, T. Van Den Bergh, C. Jansen, E. Balasubramaniam, W. J. Mooij, H. Custers, M. Sijm, D. N. A. Tagoe, T. D. Kalejaiye, J. C. Munday, H. Tenor, A. Matheeussen, M. Wijtmans, M. Siderius, C. De Graaf, L. Maes, H. P. De Koning, D. S. Bailey, G. J. Sterk, I. J. P. De Esch, D. G. Brown, R. Leurs, "Targeting a Subpocket in *Trypanosoma brucei* Phosphodiesterase B1 (TbrPDEB1) Enables the Structure-Based Discovery of Selective Inhibitors with Trypanocidal Activity", *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3870-3888.

- [165] J. Liu, X. Zhang, G. Chen, Q. Shao, Y. Zou, Z. Li, H. Su, M. Li, Y. Xu, "Drug repurposing and structure-based discovery of new PDE4 and PDE5 inhibitors", *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *262*, 115893.
- [166] G. L. Card, B. P. England, Y. Suzuki, D. Fong, B. Powell, B. Lee, C. Luu, M. Tabrizad, S. Gillette, P. N. Ibrahim, D. R. Artis, G. Bollag, M. V. Milburn, S.-H. Kim, J. Schlessinger, K. Y. J. Zhang, "Structural Basis for the Activity of Drugs that Inhibit Phosphodiesterases", *Struct.* **2004**, *12*, 2233-2247.
- [167] D. S. Wishart, C. Knox, A. C. Guo, S. Shrivastava, M. Hassanali, P. Stothard, Z. Chang, J. Woolsey, "DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration", *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D668-D672.
- [168] C. G. Neochoritis, T. Zhao, A. Dömling, "Tetrazoles via multicomponent reactions", *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1970-2042.
- [169] U. Bhatt, "Modern heterocyclic chemistry", *J. Heterocycl. Chem.* **2011**, 1401-1430.
- [170] N. Sadlej-Sosnowska, "Application of natural bond orbital analysis to delocalization and aromaticity in C-substituted tetrazoles", *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8737-8743.
- [171] C. F. Matta, A. A. Arabi, D. F. Weaver, "The bioisosteric similarity of the tetrazole and carboxylate anions: Clues from the topologies of the electrostatic potential and of the electron density", *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1868-1872.
- [172] C. Liljebris, S. D. Larsen, D. Ogg, B. J. Palazuk, J. E. Bleasdale, "Investigation of potential bioisosteric replacements for the carboxyl groups of peptidomimetic inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: Identification of a tetrazole-containing inhibitor with cellular activity", *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1785-1798.
- [173] A. Liu, L. Huang, Z. Wang, Z. Luo, F. Mao, W. Shan, J. Xie, K. Lai, X. Li, "Hybrids consisting of the pharmacophores of salmeterol and roflumilast or phthalazinone: Dual  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists-PDE4 inhibitors for the treatment of COPD", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1548-1552.
- [174] M. M. Heravi, V. Zadsirjan, M. Malmir, L. Mohammadi, "Buchwald-Hartwig reaction: An update", *Monatsh. Chem.* **2021**, *152*, 1127-1171.
- [175] T. Upadhyay, E. C. Woods, S. Dela Ahator, K. Julin, F. F. Faucher, M. J. Uddin, M. J. Hollander, N. J. Pedowitz, D. Abegg, I. Hammond, I. E. Eke, S. Wang, S. Chen, J. M. Bennett, J. Jo, C. S. Lentz, A. Adibekian, M. Fellner, M. Bogyo, "Identification of covalent inhibitors of *Staphylococcus aureus* serine hydrolases important for virulence and biofilm formation", *Nat. Commun.* **2025**, *16*, 5046.
- [176] D. A. Dickman, Y.-Y. Ku, H. E. Morton, S. R. Chemburkar, H. H. Patel, A. Thomas, D. J. Plata, D. P. Sawick, "Synthesis of A-79175: A second-generation 5-lipoxygenase inhibitor", *Tetrahedron Asym.* **1997**, *8*, 1791-1795.

- [177] Y.-Y. Ku, R. Patel, D. Sawick, "Cleavage of geminal diacetates using various phenoxides", *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8037-8040.
- [178] J. Saetang, M. Yamabhai, K. Rangnoi, N. Prompat, T. Haewphet, S. Sangkhathat, V. Tipmanee, S. Benjakul, "Identification and characterization of oncogenic KRAS G12V inhibitory peptides by phage display, molecular docking and molecular dynamic simulation", *Comput. Biol. Med.* **2025**, *192*, 110272.
- [179] L. J. Stanland, H. P. Huggins, S. S. Sahoo, A. Porrello, Y. Chareddy, S. H. Azam, J. L. Perry, P. S. Pallan, K. Whately, L. Edatt, W. D. Green, M. C. Fleming, J. Im, C. Gutierrez-Ford, I. Simmons, A. Dawoud, K. I. Zhou, V. Jayaprakash, R. S. Sellers, G. de la Cruz, A. Wielgus, J. Milner, M. Egli, A. A. Bowers, C. V. Pecot, "A first-in-class EGFR-directed KRAS G12V selective inhibitor", *Cancer Cell* **2025**, *43*, 1815-1832.
- [180] B. T. Nava Höer, "QSAR-guided design and synthesis of novel inhibitors targeting KRAS protein-protein interactions", *Dissertation (Universität Wuppertal)* **2025**.
- [181] R. C. Hillig, B. Sautier, J. Schroeder, D. Moosmayer, A. Hilpmann, C. M. Stegmann, N. D. Werbeck, H. Briem, U. Boemer, J. Weiske, V. Badock, J. Mastouri, K. Petersen, G. Siemeister, J. D. Kahmann, D. Wegener, N. Böhnke, K. Eis, K. Graham, L. Wortmann, F. von Nussbaum, B. Bader, "Discovery of potent SOS1 inhibitors that block RAS activation via disruption of the RAS-SOS1 interaction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 2551-2560.
- [182] J. Ramharter, D. Kessler, P. Etmayer, M. H. Hofmann, T. Gerstberger, M. Gmachl, T. Wunberg, C. Kofink, M. Sanderson, H. Arnhof, G. Bader, K. Rumpel, A. Zöphel, R. Schnitzer, J. Böttcher, J. C. O'Connell, R. L. Mendes, D. Richard, N. Pototschnig, I. Weiner, W. Hela, K. Hauer, D. Haering, L. Lamarre, B. Wolkerstorfer, C. Salamon, P. Werni, S. Munico-Martinez, R. Meyer, M. D. Kennedy, N. Kraut, D. B. McConnell, "One Atom Makes All the Difference: Getting a Foot in the Door between SOS1 and KRAS", *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 6569-6580.
- [183] Y. Xing, J. Zuo, P. Krogstad, M. E. Jung, "Synthesis and Structure-Activity Relationship (SAR) Studies of Novel Pyrazolopyridine Derivatives as Inhibitors of Enterovirus Replication", *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1688-1703.
- [184] B. Stanovnik, J. Svete, "Product class 1: Pyrazoles", *Sci. Synth.* **2002**, *13*, 1508-1516.
- [185] M. Botta, F. De Angelis, F. Corelli, M. Menichincheri, R. Nicoletti, M. E. Marongiu, A. Pani, P. La Colla, "Antiviral agents: Synthesis of furylpyrimidinones and evaluation of their cytostatic and antiviral activity", *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, *324*, 203-207.
- [186] A. P. Mityuk, D. M. Volochnyuk, S. V. Ryabukhin, A. S. Plaskon, A. Shivanyuk, A. A. Tolmachev, "Recyclization reactions of 5-formyl-1,3-dimethyluracil with electron-rich amino heterocycles", *Synth.* **2009**, *2009*, 1858-1864.
- [187] J. M. Ketcham, J. Haling, S. Khare, V. Bowcut, D. M. Briere, A. C. Burns, R. J. Gunn, A. Ivetac, J. Kuehler, S. Kulyk, J. Laguer, J. D. Lawson, K. Moya, N. Nguyen, L. Rahbaek, B. Saechao, C. R. Smith, N. Sudhakar, N. C. Thomas, L. Vegar, D. Vanderpool, X. Wang, L. Yan, P. Olson,

- J. G. Christensen, M. A. Marx, "Design and discovery of MRTX0902, a potent, selective, brain-penetrant, and orally bioavailable inhibitor of the SOS1:KRAS protein-protein interaction", *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 9678-9690.
- [188] T. Focken, S. Chowdhury, A. Zenova, M. E. Grimwood, C. Chabot, T. Sheng, I. Hemeon, S. M. Decker, M. Wilson, P. Bichler, Q. Jia, S. Sun, C. Young, S. Lin, S. J. Goodchild, N. G. Stuart, E. Chang, Z. Xie, B. Li, K. Khakh, G. Bankar, M. Waldbrook, R. Kwan, K. Nelkenbrecher, P. Karimi Tari, N. Chahal, L. Sojo, C. L. Robinette, A. D. White, C.-A. Chen, Y. Zhang, J. Pang, J. H. Chang, D. H. Hackos, J. P. Johnson Jr., C. J. Cohen, D. F. Ortwine, D. P. Sutherlin, C. M. Dehnhardt, B. S. Safina, "Design of conformationally constrained acyl sulfonamide isosteres: Identification of N-([1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3-yl)methanesulfonamides as potent and selective hNav1.7 inhibitors for the treatment of pain", *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4810-4831.
- [189] A. G. Taveras, S. W. Remiszewski, R. J. Doll, D. Cesarz, E. C. Huang, P. Kirschmeier, B. N. Pramanik, M. E. Snow, Y.-S. Wang, J. D. Del Rosario, B. Vibulbhan, B. B. Bauer, J. E. Brown, D. Carr, J. Catino, C. A. Evans, V. Girijavallabhan, L. Heimark, L. James, S. Liberles, C. Nash, L. Perkins, M. M. Senior, A. Tsarbopoulos, A. K. Ganguly, R. Aust, E. Brown, D. Delisle, S. Fuhrman, T. Hendrickson, C. Kissinger, R. Love, W. Sisson, E. Villafranca, S. E. Webber, "Ras Oncoprotein Inhibitors: The Discovery of Potent Ras Nucleotide Exchange Inhibitors and the Structural Determination of a Drug-Protein Complex", *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 125-133.
- [190] A. K. Ganguly, B. N. Pramanik, E. C. Huang, S. Liberles, L. Heimark, Y. H. Liu, A. Tsarbopoulos, R. J. Doll, A. G. Taveras, S. Remiszewski, M. E. Snow, Y. S. Wang, B. Vibulbhan, D. Cesarz, J. E. Brown, J. Del Rosario, L. James, P. Kirschmeier, V. Girijavallabhan, "Detection and Structural Characterization of Ras Oncoprotein-Inhibitor Complexes by Electrospray Mass Spectrometry", *Bioorg. Med. Chem.* **1197**, *5*, 817-820.
- [191] A. K. Ganguly, Y. Sen Wang, B. N. Pramanik, R. J. Doll, M. E. Snow, A. G. Taveras, S. Remiszewski, D. Cesarz, J. Del Rosario, B. Vibulbhan, J. E. Brown, P. Kirschmeier, E. C. Huang, L. Heimark, A. Tsarbopoulos, V. M. Girijavallabhan, R. M. Aust, E. L. Brown, D. M. DeLisle, S. A. Fuhrman, T. F. Hendrickson, C. R. Kissinger, R. A. Love, W. A. Sisson, J. Ernest Villafranca, S. E. Webber, "Interaction of a novel GDP exchange inhibitor with the Ras protein", *Biochem.* **1998**, *37*, 15631-15637.
- [192] E. Sacco, S. J. Abraham, A. Palmioli, G. Damore, A. Bargna, E. Mazzoleni, V. Gaponenko, M. Vanoni, F. Peri, "Binding Properties and Biological Characterization of New Sugar-Derived Ras Ligands", *Med. Chem. Comm.* **2011**, *2*, 396-401.
- [193] F. Peri, C. Airoidi, S. Colombo, E. Martegani, A. S. Van Neuren, M. Stein, C. Marinzi, F. Nicotra, "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Sugar-Derived Ras Inhibitors", *Chem. Bio. Chem.* **2005**, *6*, 1839-1848.

- [194] A. Di Domizio, F. Peri, "Sugar-Based Inhibitors of Ras Activation: Biological Activity and Identification of Ras-Inhibitor Binding Interface", *The Enzymes* **2013**, 33, 95-116.
- [195] H. Jiang, X. Qin, Q. Wang, Q. Xu, J. Wang, Y. Wu, W. Chen, C. Wang, T. Zhang, D. Xing, R. Zhang, **2021**, Elsevier Masson s.r.l. preprint, DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113633.
- [196] W. Meutermans, G. T. Le, B. Becker, "Carbohydrates as scaffolds in drug discovery", *Chem. Med. Chem.* **2006**, 1, 1164-1194.
- [197] K. Beaumont, S. Guzzetti, P. Morentin-Gutierrez, R. D. Jones, K. Grime, C. Martins, A. Koers, A. Peter, S. T. Barry, S. Critchlow, M. Moschetta, M. Niedbala, "The Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of AZD0022", *Cancer Res.* **2025**, 85, 841.
- [198] C. P. Martins, A. Koers, S. Mitra, A. Peter, K. Young, C. Chambers, Z. Underwood, K. Beaumont, S. Guzzetti, C. Stubbs, D. Barratt, B. Phillips, E. Wigmore, M. Chapman, M. Moschetta, S. Barry, S. Critchlow, M. Niedbala, "AZD0022: A Potent Oral KRASG12D-Selective Inhibitor", *Cancer Res.* **2025**, 85, ND11-ND11.
- [199] A. A. Flores-Gómez, M. Drosten, "HRS-4642: The next piece of the puzzle to keep KRAS in check", *Cancer Cell* **2024**, 42, 1157-1159.
- [200] Q. Leng, J. Zhou, X. Wang, P. Zhang, H. Xu, D. Cao, "HRS-4642 Combined with Nimotuzumab in Recurrent or Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma", *Front. Pharmacol.* **2025**, 16, 1562481.
- [201] T. Nagashima, T. Yoshinari, Y. Nishizono, M. Tasaki, K. Inamura, H. Ishioka, A. Suzuki, F. Osaki, Y. Yamanaka, M. Hayakawa, "Abstract 5735: Novel KRAS G12D degrader ASP3082 demonstrates in vivo, dose-dependent KRAS degradation, KRAS pathway inhibition, and antitumor efficacy in multiple KRAS G12D-mutated cancer models", *Cancer Res.* **2023**, 83, 5735.
- [202] T. Yoshinari, T. Nagashima, H. Ishioka, K. Inamura, Y. Nishizono, M. Tasaki, K. Iguchi, A. Suzuki, C. Sato, A. Nakayama, Y. Amano, Y. Tateishi, Y. Yamanaka, F. Osaki, M. Yoshino, K. Kuramoto, T. Imaizumi, M. Hayakawa, "Discovery of KRAS(G12D) selective degrader ASP3082", *Commun. Chem.* **2025**, 8, 254.
- [203] D. O'Donovan, D. Hillebrand, "Fused Pyrimidines as KRAS Inhibitors", U.S. Patent Appl. US20250154170A1, **2023**.
- [204] X. Morelli, R. Bourgeas, P. Roche, "Chemical and structural lessons from recent successes in protein-protein interaction inhibition (2P2I)", *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 475-481.
- [205] C. L. Mellor, R. L. Marchese Robinson, R. Benigni, D. Ebbrell, S. J. Enoch, J. W. Firman, J. C. Madden, G. Pawar, C. Yang, M. T. D. Cronin, "Molecular Fingerprint-Derived Similarity Measures for Toxicological Read-Across", *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2019**, 101, 121-134.
- [206] S. Ahmadi, J. J. M. Ketabi, "QSPR/QSAR Analysis Using SMILES and Quasi-SMILES", **1. Aufl.** Springer International Publishing, **2023**, Cham.

- [207] V. Consonni, R. Todeschini, "Molecular Descriptors, in Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications", **1. Aufl. Springer Netherlands 2010, Dordrecht.**
- [208] D. E. Patterson, R. D. Cramer, A. M. Ferguson, R. D. Clark, L. E. Weinberger, "Neighborhood Behavior: A Useful Concept for Validation of Molecular Diversity Descriptors", *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3049-3059.
- [209] T. B. Dunn, G. M. Seabra, T. D. Kim, K. E. Juárez-Mercado, C. Li, J. L. Medina-Franco, R. A. Miranda-Quintana, "Diversity and Chemical Library Networks of Large Data Sets", *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, *62*, 2186-2201.
- [210] H. R. Warren, S. J. Ross, P. D. Smith, J. M. Coulson, I. A. Prior, "Combinatorial Approaches for Mitigating Resistance to KRAS-Targeted Therapies", *Biochem. J.* **2022**, *479*, 1985-1997.
- [211] B. Biswas, Y.-H. Huang, D. J. Craik, C. K. Wang, "The prospect of substrate-based kinase inhibitors to improve target selectivity and overcome drug resistance", *Chem. Sci.* **2024**, *15*, 13130-13147.
- [212] M. R. Berthold, N. Cebron, F. Dill, T. R. Gabriel, T. Meinl, P. Ohl, K. Thiel, B. Wiswedel, "KNIME - The Konstanz Information Miner", **1. Aufl. Springer, 2007, Berlin.**
- [213] D. Mendez, A. Gaulton, A. P. Bento, J. Chambers, M. De Veij, E. Félix, M. P. Magariños, J. F. Mosquera, P. Mutowo, M. Nowotka, M. Gordillo-Marañón, F. Hunter, L. Junco, G. Mugumbate, M. Rodriguez-Lopez, F. Atkinson, N. Bosc, C. J. Radoux, A. Segura-Cabrera, A. Hersey, A. R. Leach, "ChEMBL: Towards Direct Deposition of Bioassay Data", *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 930-940.
- [214] A. Gaulton, L. J. Bellis, A. P. Bento, J. Chambers, M. Davies, A. Hersey, Y. Light, S. McGlinchey, D. Michalovich, B. Al-Lazikani, J. P. Overington, "ChEMBL: A Large-Scale Bioactivity Database for Drug Discovery", *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1100-1107.
- [215] Y. Zabolotna, A. Lin, D. Horvath, G. Marcou, D. M. Volochnyuk, A. Varnek, "Chemography: Searching for Hidden Treasures", *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 179-188.
- [216] A. Cherkasov, E. N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I. I. Baskin, M. Cronin, J. Dearden, P. Gramatica, Y. C. Martin, R. Todeschini, V. Consonni, V. E. Kuz'min, R. Cramer, R. Benigni, C. Yang, J. Rathman, L. Terfloth, J. Gasteiger, A. Richard, A. Tropsha, "QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To?", *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4977-5010.
- [217] D. Young, T. Martin, R. Venkatapathy, P. Harten, "Are the Chemical Structures in Your QSAR Correct?", *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 1337-1345.
- [218] M. Olah, M. Mracec, L. Ostopovici, R. Rad, A. Bora, N. Hadaruga, I. Olah, M. Banda, Z. Simon, T. I. Oprea, "Chemoinformatics in Drug Discovery, in Chemoinformatics in Drug Discovery", **1. Aufl. Springer, 2005, Dordrecht.**
- [219] W. H. B. Sauer, M. K. Schwarz, "Molecular Shape Diversity of Combinatorial Libraries: A Prerequisite for Broad Bioactivity", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 987-1003.

- [220] [https://hub.knime.com/vernalis/Public/PMI%20Plotting%20Example~zuyv2AxB\\_dFVs0Ym/current-state](https://hub.knime.com/vernalis/Public/PMI%20Plotting%20Example~zuyv2AxB_dFVs0Ym/current-state) Workflow für den PMI-Plot (zuletzt 13:04 Uhr am 26.02.2026)
- [221] L. Duo, Y. Chen, Q. Liu, Z. Ma, A. Farjudian, W. Y. Ho, S. S. Low, J. Ren, J. D. Hirst, H. Xie, B. Tang, "Discovery of novel SOS1 inhibitors using machine learning", *RSC Med. Chem.* **2024**, *15*, 1392-1403.
- [222] A. A. Lagunin, M. A. Romanova, A. D. Zadorozhny, N. S. Kurilenko, B. V. Shilov, P. V. Pogodin, S. M. Ivanov, D. A. Filimonov, V. V. Poroikov, "Comparison of Quantitative and Qualitative (Q)SAR Models Created for the Prediction of  $K_i$  and  $IC_{50}$  Values", *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1136.
- [223] S. Pétursson, "Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry", *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1297.
- [224] H. S. Tsukamoto, Y. Kondo, "Remarkable Solvent Effect on Pd(0)-Catalyzed Deprotection of Allyl Ethers Using Barbituric Acid Derivatives", *Synlett* **2007**, *2007*, 3131-3136.
- [225] M. Schelhaas, H. Waldmann, "Protecting Group Strategies in Organic Synthesis", *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2056-2083.
- [226] P. Crotti, V. Di Bussolo, L. Favero, F. Macchia, M. Pineschi, "Regiochemical control of the ring opening of 1,2-epoxides by means of chelating processes. Part 17: Synthesis and opening reactions of cis- and trans-oxides derived from (2S,6R)-2-benzyloxy-6-methyl-3,6-dihydro-2H-pyran, (2R,6R)- and (2S,6R)-2-methoxy-6-methyl-5,6-dihydro-2H-pyran", *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6069-6091.
- [227] V. Velvadapu, R. B. Andrade, "Concise syntheses of d-desosamine, 2-thiopyrimidinyl desosamine donors, and methyl desosaminide analogues from d-glucose", *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 145-150.
- [228] D. P. G. Emmerson, R. Villard, C. Mugnaini, A. Batsanov, J. A. K. Howard, W. P. Hems, R. P. Tooze, B. G. Davis, "Precise structure activity relationships in asymmetric catalysis using carbohydrate scaffolds to allow ready fine tuning: dialkylzinc-aldehyde additions", *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3826-3838.
- [229] D. P. G. Emmerson, W. P. Hems, B. G. Davis, "Carbohydrate-Derived Aminoalcohol Ligands for Asymmetric Reformatsky Reactions", *Tetrahedron: Asymmetry.* **2005**, *16*, 213-221.
- [230] A. D. Wouters, G. H. G. Trossini, H. A. Stefani, D. S. Lüdtkke, "Enantioselective Arylations Catalyzed by Carbohydrate-Based Chiral Amino Alcohols", *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2351-2356.
- [231] S. Kim, H. Chang, W. J. Kim, "Selective benzylation of diols with 1-(benzyloxy)benzotriazole", *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1751-1752.
- [232] E. A. Del Vigo, C. A. Stortz, C. Marino, "D-Allose, a rare sugar. Synthesis of D-allopyranosyl acceptors from glucose, and their regioselectivity in glycosidation reactions", *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20*, 4589-4598.

- [233] S. D. Meyer, S. L. Schreiber, "Acceleration of the Dess-Martin Oxidation by Water", *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7549-7552.
- [234] M. M. Heravi, T. Momeni, V. Zadsirjan, L. Mohammadi, "Applications of the Dess-Martin Oxidation in Total Synthesis of Natural Products", *Curr. Org. Synth.* **2021**, *18*, 125-196.
- [235] S. Chung, D. P. Ucello, H. Choi, J. I. Montgomery, J. Chen, "Trimethylaluminium-Facilitated Direct Amidation of Carboxylic Acids", *Synlett* **2011**, *22*, 2072-2074.
- [236] J. Li, K. Subramaniam, D. Smith, J. X. Qiao, J. J. Li, J. Qian-Cutrone, J. F. Kadow, G. D. Vite, B.-C. Chen, "AlMe<sub>3</sub>-Promoted Formation of Amides from Acids and Amines", *Org. Lett.* **2012**, *14*, 214-217.
- [237] B. Coxon, L. Hough, "3-Acetamido-3-deoxy-D-allose Diethyl Dithioacetal", *J. Chem. Soc.* **1961**, 1643-1649.
- [238] M. L. Wolfrom, F. Shafizadeh, R. K. Armstrong, "Synthesis of Amino Sugars by Reduction of Hydrazine Derivatives<sup>1</sup>", *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4885-4888.
- [239] U. G. Nayak, R. L. Whistler, "Nucleophilic displacement in 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-3-O-(p-tolylsulfonyl)- $\alpha$ -D-glucofuranose", *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3819-3822.
- [240] V. L. Campo, R. Sesti-Costa, Z. A. Carneiro, J. S. Silva, S. Schenkman, I. Carvalho, "Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on Trypanosoma cruzi and its cell surface trans-sialidase", *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 145-156.
- [241] J. Guo, J. W. Frost, "Kanosamine Biosynthesis: A Likely Source of the Aminoshikimate Pathway's Nitrogen Atom", *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10642-10643.
- [242] Z. P. Cannone, M. W. Peczuh, "A method for preparing N-alkylated kanosamines from diacetone d-glucose", *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 1830-1833.
- [243] A.-P. Wang, C. Liu, S. Yang, Z. Zhao, P. Lei, "An efficient method to synthesize novel 5-O-(6'-modified)-mycaminose 14-membered ketolides", *Tetrahedron* **2016**, *72*, 285-297.
- [244] J. S. Yadav, S. Raghavendra, M. Satyanarayana, "Phosphomolybdic Acid Supported on Silica Gel: An Efficient, Mild and Reusable Catalyst for the Chemoselective Hydrolysis of Acetonides", *Synlett* **2005**, *2005*, 2461-2464.
- [245] N. Lunau, K. Seelhorst, S. Kahl, K. Tschersch, C. Stacke, S. Rohn, J. Thiem, U. Hahn, C. Meier, "Fluorescently Labeled Substrates for Monitoring  $\alpha$ 1,3-Fucosyltransferase IX Activity", *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17379-17390.
- [246] J. Zhang, P. Kováč, "An Alternative Method for Regioselective, Anomeric Deacylation of Fully Acylated Carbohydrates", *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461-469.
- [247] O. Takahashi, K. Yamasaki, Y. Kohno, R. Ohtaki, K. Ueda, H. Suezawa, Y. Umezawa, M. Nishio, "The anomeric effect revisited. A possible role of the CH/n hydrogen bond", *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1202-1209.
- [248] S. Wei, J. Zhao, H. Shao, "A facile method for the preparation of sugar orthoesters promoted by anhydrous sodium bicarbonate", *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 1733-1737.

- [249] T. K. Lindhorst, "Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry", **3. Aufl.** Wiley-VCH **2015**, Weinheim.
- [250] R. Das, B. Mukhopadhyay, "Chemical O-Glycosylations: An Overview", *ChemistryOpen* **2016**, *5*, 401-433.
- [251] S. Chatterjee, S. Moon, F. Hentschel, K. Gilmore, P. H. Seeberger, "An Empirical Understanding of the Glycosylation Reaction", *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 11942-11953.
- [252] J. Madaj, M. Jankowska, A. Wiśniewski, "Synthesis of cis-(1→3)-glycosides of allyl 2-acetamido-4,6-O-benzylidene-2-deoxy- $\alpha$ -d-glucopyranoside", *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1293-1300.
- [253] J. Banoub, D. R. Bundle, "1,2-Orthoacetate intermediates in silver trifluoromethanesulphonate promoted Koenigs-Knorr synthesis of disaccharide glycosides", *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 2091-2097.
- [254] K. Bock, J. Fernández-Bolaños Guzmán, S. Refn, "Synthesis and properties of 1,1,3,3,-tetramethyl-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -d-glucopyranosyl) uronium triflate", *Carbohydr. Res.* **1992**, *232*, 353-357.
- [255] S. Hanessian, J. Banoub, "Chemistry of the glycosidic linkage. An efficient synthesis of 1,2-trans-di-saccharides", *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 13-16.
- [256] A. Forman, F.-I. Auzanneau, "Orthoesters formation leading to mismatched Helferich glycosylations at O-3 of N-trichloroacetylated glucosamine residues", *Carbohydr. Res.* **2016**, *425*, 10-21.
- [257] F.-I. Auzanneau, D. R. Bundle, "Application of thioglycoside chemistry to the synthesis of trisaccharides and deoxy-trisaccharides related to the *Shigella flexneri* Y polysaccharide", *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 534-548.
- [258] D. J. M. van der Vleugel, W. A. R. van Heeswijk, J. F. G. Vliegthart, "A facile preparation of alkyl  $\alpha$ -glycosides of the methyl ester of N-acetyl-d-neuraminic acid", *Carbohydr. Res.* **1982**, *102*, 121-130.
- [259] M. Schnabel, B. Römpf, D. Ruckdeschel, C. Unverzagt, "Synthesis of tryptophan N-glucoside", *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 295-297.
- [260] A. G. Volbeda, G. A. van der Marel, J. D. C. Codée, "Protecting group strategies in carbohydrate chemistry", in "Protecting Groups: Strategies and Applications in Carbohydrate Chemistry", **1. Aufl.**, Wiley-VCH, **2019**.
- [261] S. Anjum, N. D. Vetter, J. E. Rubin, D. R. J. Palmer, "Synthesis of 3,3'-neotrehalosidamine and related 1,1'-aminodisaccharides using disarmed, armed, and superarmed building blocks", *Tetrahedron* **2013**, *69*, 816-825.
- [262] B. Fraser-Reid, Z. Wu, U. E. Udodong, H. Ottosson, "Armed/disarmed effects in glycosyl donors: rationalization and sidetracking", *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6068-6070.

- [263] D. R. Mootoo, Peter. Konradsson, Uko. Udodong, Bert. Fraser-Reid, "Armed and disarmed n-pentenyl glycosides in saccharide couplings leading to oligosaccharides", *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5583-5584.
- [264] G. Zemplén, A. Kunz, "Studien über Amygdalin, IV: Synthese des natürlichen I-Amygdalins", *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1924**, *57*, 1357-1359.
- [265] W. Li, Z.-W. Zhang, S.-X. Wang, S.-M. Ren, T. Jiang, "Synthesis and Analysis of Potential DNA Intercalators Containing Quinoline-Glucose Hybrids", *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 80-86.
- [266] B. E. Fink, R. J. Cherney, K. Ngu, U. Velaparthi, W. D. Vaccaro, Z. Ruan, L. Y. Qin, P. A. Shirude, H. Rahaman, "Preparation of Quinazolines as KRAS Inhibitors for the Treatment of Cancers", U.S. Patent Appl. US20240217982A1, **2022**.
- [267] C. Laroche, S. M. Kerwin, "Efficient, Regioselective Access to Bicyclic Imidazo[1,2-x]-Heterocycles via Gold- and Base-Promoted Cyclization of 1-Alkynylimidazoles", *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9229-9232.
- [268] P. N. Liu, F. H. Su, T. B. Wen, H. H.-Y. Sung, I. D. Williams, G. Jia, "Selective and Efficient Cycloisomerization of Alkynols Catalyzed by a Ruthenium Complex", *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7889-7897.
- [269] M. Jäger, A. J. Minnaard, "Regioselective modification of unprotected glycosides", *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 656-664.
- [270] B. Ren, L. Cai, L.-R. Zhang, Z.-J. Yang, L.-H. Zhang, "Selective deacetylation using iodine-methanol reagent in fully acetylated nucleosides", *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8083-8086.
- [271] Y. Xing, J. Zuo, P. Krogstad, M. E. Jung, "Synthesis and Structure-Activity Relationship (SAR) Studies of Novel Pyrazolopyridine Derivatives as Inhibitors of Enterovirus Replication", *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1688-1703.
- [272] T. A. Halgren, "Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability", *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 377-389.
- [273] <https://bioorganische-chemie.uni-wuppertal.de/de/startseite/team/mitarbeiter/>  
(zuletzt 18:02 Uhr am 17.03.2026)



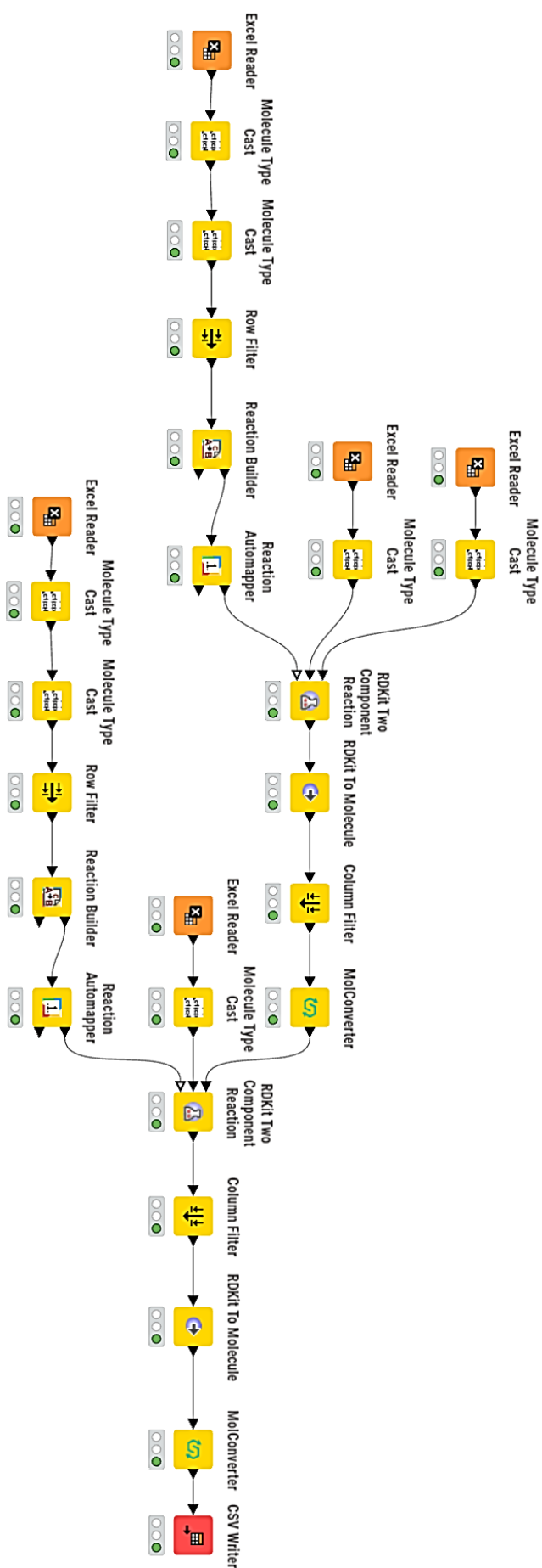
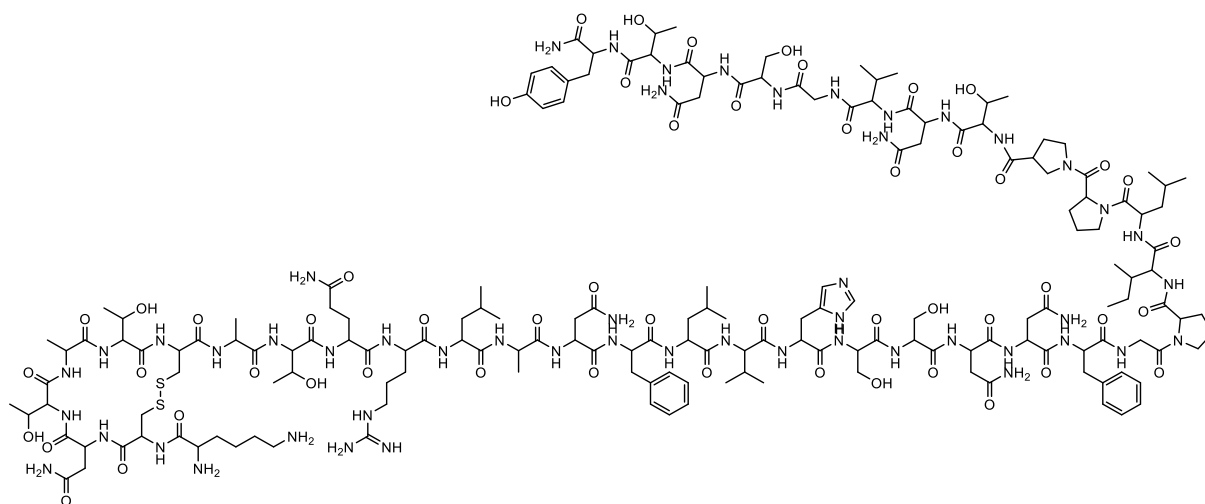


Abb. 77: Workflow zur Erstellung der Zuckerbibliothek



**Abb. 78:** Beste vorhergesagte Verbindung der Drugbank-Bibliothek



**Abb. 79:** Dokumentation der Arbeitsgruppe Scherckenbeck, Bergische Universität Wuppertal.<sup>[273]</sup>