

Entwicklung von DegS-Inhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Anna Laura Schmitz

geboren in Dorsten

Fakultät für Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2013 bis Januar 2017 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Kaiser am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Chemische Biologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 13.03.2017

Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser
Prof. Dr. Michael Ehrmann
Vorsitzender: Prof. Dr. Christian Mayer

Meinen Eltern und Sebastian

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	7
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	9
2.1	Niedermolekulare Verbindungen in der Biochemie.....	9
2.2	Infektionskrankheiten	10
2.2.1	Ursachen und Behandlung	10
2.2.2	Multiresistente Bakterien	11
2.3	Enzyme	14
2.3.1	Reversible Hemmung	15
2.3.2	Irreversible Hemmung	17
2.4	Proteasen	19
2.4.1	Einteilung, Aufbau und Funktionen.....	19
2.4.2	Serinproteasen	21
2.4.3	Die HtrA Familie	24
2.4.3.1	Prokaryotische HtrA-Proteasen	25
2.4.3.2	Eukaryotische HtrA-Proteasen	30
3	ZIELSETZUNG	32
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	35
4.1	Struktur des LDC-Inhibitors und Derivatisierungsmöglichkeiten	35
4.2	Synthese des LDC-Inhibitors und Derivaten.....	36
4.2.1	Synthese des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts	36
4.2.2	Methylierung des Schwefels.....	37
4.2.3	Phosphorylierung und Substitutionsreaktion zur Einführung der Gruppe A	38
4.2.4	Oxidation des Thioethers.....	40
4.2.5	Substitution der Sulfon-Gruppe und Generierung der Gruppe B	41
4.2.6	Synthese von Benzylamin-Derivaten.....	42
4.3	Synthetisierte Derivate und deren biologische Evaluation	44
4.3.1	Derivate der Gruppe A.....	45
4.3.1.1	RseA-Proteolyse-Assays mit DegS	45
4.3.1.2	Weiterführende Experimente	50
4.3.1.3	Verbesserung der DegS-Spezifität	53
4.3.1.4	DegS Inhibitoren in Kombination mit anderen Antibiotika	54
4.3.2	Derivate der Gruppe B.....	58
4.3.3	Derivate der Gruppe C und des Pyrazol-Grundgerüsts.....	59
4.3.3.1	RseA-Proteolyse-Assays mit DegS	59

4.3.3.2	Verbesserung der DegS-Spezifität	63
4.3.3.3	Synthese eines potentiellen, spezifischen Inhibitors	64
4.4	Ansätze zur Bestimmung der Inhibitor-Bindestelle.....	65
4.4.1	Photocrosslinking-Experimente	65
4.4.2	Molekulares Docking	66
4.5	Ansätze zur Syntheseoptimierung.....	68
4.5.1	Syntheseoptimierung der Gruppe A	68
4.5.1.1	Modifizierung über eine OH-Gruppe am Benzylamin	68
4.5.1.2	Modifizierung über eine NH ₂ -Gruppe am Benzylamin	70
4.5.2	Syntheseoptimierung der Gruppe C	74
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	79
6	SUMMARY AND OUTLOOK	82
7	EXPERIMENTELLER TEIL.....	85
7.1	Arbeitsmaterialien und Instrumente	85
7.1.1	Chemikalien.....	85
7.1.2	Säulenchromatographie	85
7.1.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	85
7.1.4	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS).....	85
7.1.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	86
7.1.6	Gefriertrocknung.....	86
7.1.7	NMR-Spektroskopie	86
7.2	Allgemeine Methoden	87
7.2.1	Methode A: Synthese der Pyrazolotriazine.....	87
7.2.2	Methode B: Methylierung mit Methyljodid.....	87
7.2.3	Methode C: Chlorierung mit Phosphorylchlorid	87
7.2.4	Methode D: Substitution des Chlorids durch ein Amin	88
7.2.5	Methode E: Oxidation mit <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure.....	88
7.2.6	Methode F: Substitution des Methylsulfons	88
7.3	Versuchsvorschriften.....	89
7.3.1	Synthese der Derivate mit Modifizierungen in Position B	89
7.3.2	Synthese der Derivate mit Modifizierungen in Position C und des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts	93
7.3.3	Synthese der Derivate mit Modifizierungen in Position A	124
8	LITERATUR	158
9	ANHANG.....	167

9.1	Abkürzungsverzeichnis	167
9.2	Abbildungsverzeichnis	171
9.3	Tabellenverzeichnis	173
9.4	Lebenslauf	174
9.5	Erklärung.....	175
9.6	Danksagung.....	176

1 Einleitung

Bakterien (früher Eubacteria) bilden neben Eukarya (Eukaryoten) und Archaea (früher Archaeobacteria) eine der drei Domänen, in die sich alle bis heute auf der Erde entdeckten und erforschten Organismen einteilen lassen.^[1] Bakterien gehören zu den Prokaryoten, sie besitzen somit anders als die Eukaryoten keinen deutlich abgegrenzten Zellkern. Erst 1977 wurden die Prokaryoten von Woese aufgrund eindeutiger biochemischer Unterschiede in zwei Domänen unterteilt: Bacteria und Archaea.^[2] Mit einer Gesamtzahl von geschätzt 5×10^{30} sind Bakterien so gut wie überall auf der Erde zu finden, was sich auf ihre geringe Größe, der vielfältigen Ernährungsmöglichkeiten und Stoffwechselaktivitäten und nicht zuletzt auf ihre Fähigkeit, sich ungünstigen Bedingungen sowie wechselnden Umweltbedingungen anzupassen und zu widerstehen, zurückführen lässt. Dabei werden verschiedenste Biotope von ihnen besiedelt, z. B. saure, heiße Quellen, als Parasiten bestimmte Gewebe oder von Menschen geschaffene Biotope wie Faultürme. Sie sind in der Luft, in der Erde und auch im Trinkwasser zu finden und leben sowohl in und auf Tieren, Pflanzen und Menschen, zumeist als unschädliche Mitesser aber auch als Symbiosepartner, z. B. zum Aufschluss der Nahrung beispielsweise bei Pansenorganismen (Aufschluss der Zellulose durch Mikroorganismen), als Vitaminlieferanten oder als Leuchtbakterien in Fischen.

Gegenüber den harmlosen Bakterien, die z. B. die Darm-, Haut- oder Mundflora bilden, gibt es auch krankheitserregende Bakterien, die mitunter für Infektionen, Sepsis und Organ-Entzündungen verantwortlich sind, die letztendlich tödlich verlaufen können. Eine der bekanntesten bakteriellen Infektionskrankheiten, die bis heute zu den zehn häufigsten Todesursachen weltweit gehört, ist die Tuberkulose. Durch ausreichende Hygiene kann die Zahl der Bakterien jedoch reduziert werden, sodass Erkrankungen durch bakterielle Erreger effektiv vorgebeugt werden kann. Infektionen durch eingedrungene Bakterien werden mit antibiotischen Wirkstoffen wie Penicillin behandelt. Doch auch hier zeigt sich die Vielfältigkeit und Anpassungsfähigkeit von Bakterien, die vermehrt Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika entwickelt haben. Das wohl bekannteste und am besten untersuchte Bakterium ist *Escherichia coli*, das normalerweise im Darm vorkommt und dort als Vitaminproduzent agiert. Außerhalb des Darms kann es wiederum zu schweren Entzündungen und zu Durchfallerkrankungen führen. Auch viele weitere Bakterienfamilien sind aus verschiede-

nen Stämmen mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften aufgebaut. Insgesamt existiert eine Vielzahl an bakteriellen Stämmen, welche sich sowohl in Bezug auf Verbreitung, Einsatzzweck als auch der Pathogenität massiv unterscheiden. Aufgrund dieser Wandlungsfähigkeit wird bis heute an antimikrobiellen Wirkstoffen zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen geforscht.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Niedermolekulare Verbindungen in der Biochemie

Als niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) werden Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht (weniger als 1000 Da)^[3] bezeichnet. Dazu zählen Lipide, Monosaccharide, Naturstoffe und Metaboliten, sowie klassische Chemotherapeutika. Schwerere Verbindungen wie Proteine zählen hingegen zu den Makromolekülen. Neben einer therapeutischen Anwendung können bioaktive niedermolekulare Verbindungen auch in der chemischen Biologie zur Manipulation von biologischen Prozessen eingesetzt werden.

Bis heute und wahrscheinlich auch in Zukunft sind Naturstoffe in der Arzneimittelforschung eine sehr wichtige Quelle für bioaktive Verbindungen. Doch mittlerweile existieren auch andere Ansätze zur Wirkstoffentwicklung, z. B. die strukturbasierte Wirkstoffforschung, in welcher zunächst die Strukturbestimmung des biologischen *Targets* (Zielverbindung) durch Röntgenstrukturanalysen durchgeführt wird und anhand dessen niedermolekulare chemische Verbindungen so entworfen werden, dass sie die biologische Aktivität beeinflussen. Außerdem können in automatisierten *high-throughput screenings* (Hochdurchsatz-Screenings, HTSs) eine große Anzahl an chemisch synthetisierten niedermolekularen Verbindungen getestet und biologisch aktive Verbindungen identifiziert werden.^[4-6] Diese dienen dann als Leitstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Viele Arzneistoffe sind niedermolekulare Verbindungen, da sie eine Reihe an Vorteilen bieten. Auch zur Behandlung neurologischer Erkrankungen werden sie eingesetzt. Während hochmolekulare Verbindungen nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, können immerhin knapp 2 % der niedermolekularen Verbindungen diese passieren.^[7] Wegen ihrer geringen Größe können niedermolekulare Verbindungen schnell durch die Zellmembran diffundieren und an ihren intrazellularen Wirkungsort gelangen. Dort können sie als Inhibitoren für Protein-Protein-Interaktionen (PPI) agieren oder spezifische Funktionen eines Proteins stören und somit biologische Prozesse unterbinden.^[8, 9] Niedermolekulare Verbindungen können auch als Aktivatoren agieren, sodass die Proteinfunktion aktiviert oder die Enzymaktivität gesteigert wird. In der Regel sind die biologischen Effekte reversibel, dosisabhängig und können durch Anpassung der Konzentration und durch die Kombination mit anderen Verbindungen spezifisch kontrolliert werden. Sie bieten zudem

eine große strukturelle Vielfalt. Niedermolekulare Verbindungen können synthetisch modifiziert werden, durch Einführung neuer Gruppen oder Variieren der vorhandenen funktionellen Gruppen, und so deren Potential und Spezifität für bestimmte *Targets* erforscht und optimiert werden.^[10, 11] Nachteil ist, dass spezifische niedermolekulare Verbindungen mehr als ein Target haben können und es zu Beeinträchtigungen des Wirkungsmechanismus kommt, sobald unerwartete Nebeneffekte *in vivo* auftreten.^[10]

2.2 Infektionskrankheiten

Zu den häufigsten Todesursachen weltweit gehören neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs die Infektionskrankheiten. Während in Industrieländern wie Deutschland die Todesfälle durch Infektionen durch die Entwicklung von Impfstoffen und Antibiotika überschaubar sind, sind in Entwicklungsländern aufgrund unzureichender Hygiene und medizinischer Unterversorgung Infektionskrankheiten noch immer stark verbreitet und führen mit Abstand die Statistiken der Todesursachen an. Ob viral oder bakteriell ausgelöst, Krankheiten wie HIV, Ebola und Tuberkulose fordern jährlich zahlreiche Tote und tragen erheblich zur Kindersterblichkeitsrate in Entwicklungsländern bei.^[12-14]

Der nachlässige Gebrauch von Antibiotika führt zudem zu multiresistenten Bakterien, wodurch Behandlungen mit bis dato wirksamen Medikamenten nicht mehr möglich sind. Bekanntes Beispiel hierfür sind multiresistenten Krankenhauskeime wie MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*), die auch in Industrieländern zu einem immer größeren Problem werden.^[15, 16]

2.2.1 Ursachen und Behandlung

Infektionskrankheiten werden durch Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Viren ausgelöst. Ob auf der menschlichen Haut, der Mund- und Nasenhöhle oder dem Magen-Darmtrakt, überall finden sich Bakterien, Pilze und Viren, die jedoch nicht gleich zu einer Infektion führen, da inneres Gewebe und Organe erst durch beispielsweise äußere Verletzungen von Pathogenen befallen werden können.^[17, 18]

Der Infektionsmechanismus beruht auf molekularen Interaktionen von Pathogen und Wirt. Die unterschiedlichen Pathogene verfügen dabei über eine große Bandbreite an Infektionsstrategien: Bakterien können z. B. durch spezifische Manipulation humaner,

für die Immunantwort relevanter, Proteine eine Störung des humanen Abwehrmechanismus auslösen, wodurch eine Infektion ermöglicht wird. Viren hingegen beeinflussen häufig humane Transkriptionsprozesse, um damit die eigene Replikation zu fördern, oder zelluläre Transportprozesse, um ihr genetisches Material über die Kernmembran zu transportieren.^[19]

Durch angemessene Hygiene wird solchen Infektionen vorgebeugt, kommt es trotzdem zur Erkrankung wird je nach Pathogen-Typ mit Antibiotika (altgr. *ἀντί-* anti- gegen, *βίος* bios Leben) oder Virostatika (lat. *virus*, altgr. *στάσις* stasis Stillstand) behandelt, die das Wachstum des Pathogens hemmen oder dieses abtöten. Obwohl mit angemessener Hygiene oder geeigneter medikamentöser Behandlung Infektionskrankheiten behandelt werden können, gehören sie trotzdem zu den häufigsten Todesursachen weltweit. In Entwicklungsländern liegt die hohe Infektionsrate zum einen an mangelnder Hygiene, d. h. fehlender Abwassersysteme und Wasserwerke, zum anderen an der medizinischen Unterversorgung. In Industrieländern hingegen steigt der Bedarf an neuen Antibiotika, da antibiotikaresistente Keime ein zunehmendes Problem darstellen. Grund dafür ist der nachlässige Umgang mit Antibiotika in der Humanmedizin und der Tiermast.^[20]

2.2.2 Multiresistente Bakterien

Um das Wachstum bakterieller Pathogene zu hemmen und diese abzutöten, attackieren Antibiotika essentielle bakterielle Vorgänge wie den Folsäure-Metabolismus, die zytoplasmatische Membranstruktur oder die Zellwandsynthese.^[21] Eines der bekanntesten antibiotischen Präparate ist das 1928 von Fleming entdeckte Penicillin (Abb. 1, links). Bereits 1948 waren jedoch bereits mehr als die Hälfte der in englischen Krankenhäusern isolierten Staphylokokken (*Staphylococcus pyogenes*) gegen diese Substanz resistent.^[22]

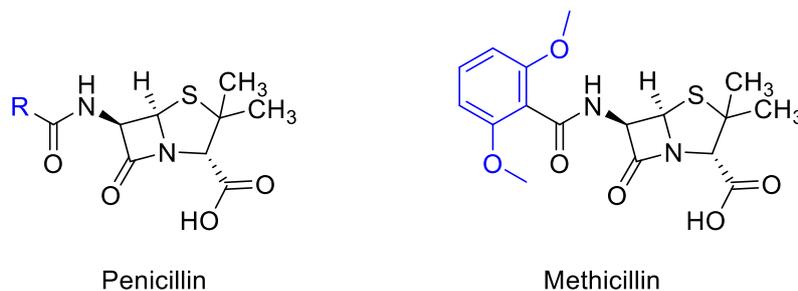


Abb. 1: (Links) Struktur des β -Lactam-Antibiotikums Penicillin, wobei R eine variable Seitenkette darstellt. (Rechts) Struktur des halbsynthetischen Penicillins Methicillin.

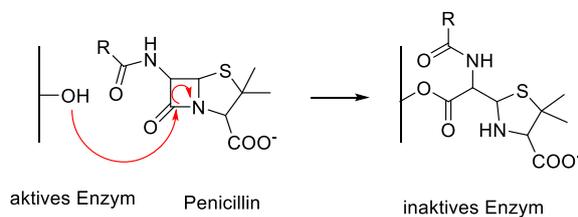
Der nachlässige Gebrauch dieser Präparate führt zu erhöhtem Auftreten von multiresistenten Organismen und macht Therapien damit riskanter, kostenintensiver und teilweise erfolglos.^[23, 24] Die biologischen Mechanismen zur Resistenzbildung von Bakterien gegen Antibiotika variieren: Durch Reduktion der Permeabilität vermeiden Bakterien das Eindringen von Antibiotika; durch Modifizierung des antimikrobiellen Zielproteins wird dieses als solches nicht mehr von dem Wirkstoff gebunden und durch gesteigerten Efflux werden bereits eingedrungene Antibiotika aus der Zelle transportiert, wodurch die Konzentration und der damit verbundene Schaden für die Zelle minimiert wird. Ein anderer bakterieller Resistenzmechanismus basiert auf der gerichteten Zersetzung von Antibiotika durch Enzyme wie z. B. β -Lactamasen, die durch Hydrolyse den β -Lactam-Ring der Penicilline aufspalten und somit die Wirkung des Antibiotikums verhindern (Abb. 2, B).^[23, 25-27]

Der bekannteste Vertreter dieser multiresistenten Bakterien ist das *Staphylococcus aureus* (altgr. *σταφυλή staphylé* Weintraube, *κόκκος kókkos* Kern, Korn, Beere, lat. *aureus* golden), das seinen hohen Bekanntheitsgrad seiner Resistenz gegenüber Methicillin (Abb. 1, rechts), einem halbsynthetischen Penicillin, zu verdanken hat.^[23] Über 90 % der in Krankenhäusern verbreiteten Stämme des *Staphylococcus aureus* produzieren β -Lactamasen^[28], so dass der Einsatz von Methicillin, einem gegenüber β -Lactamasen resistenten Wirkstoff notwendig wurde. Die gesteigerte Anwendung dieses Wirkstoffes führte jedoch innerhalb kürzester Zeit zur Bildung von Methicillin-resistenten Stämmen (MRSA, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*).^[27] Doch auch andere Bakterien wie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* oder *Mycobacterium tuberculosis* entwickeln zunehmend Resistenzen gegenüber bekannten Antibiotika.^[23]

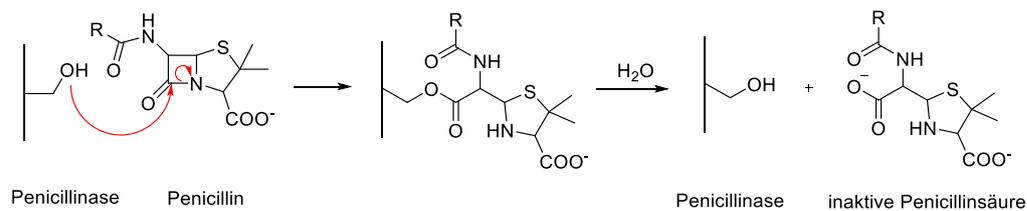
Die Entwicklung und Einführung neuer Antibiotika mit neuen Wirkungsmechanismen ist aufwändig und dauert lange. Daher werden neben diesem Ansatz auch als alternative Lösungsansätze z. B. die Wiedereinführung von Antibiotika, welche entweder chemisch-modifiziert oder in ihrer Anwendung verändert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Substanzklasse der Polymyxinen, welche in den 1940er Jahren entdeckt wurden. Der klinische Gebrauch dieser Präparate wurde jedoch wegen früherer Beobachtungen bzgl. der Nephrotoxizität und Neurotoxizität nach intravenöser Verabreichung in den 70er Jahren größtenteils wieder eingestellt. Steigende Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika führten jedoch zu erneuten Forschungsansätzen innerhalb dieser Substanzklasse, um den bisher weitgehend unbekanntem Mechanis-

mus der Toxizität zu klären und pharmakologisch unbedenkliche Polymyxin-ähnliche Lipopeptide zu entwickeln.^[29] Ein anderer Alternativansatz ist die Kombination von verschiedenen Präparaten, z. B. durch eine Kombination mit einem Inhibitor, der den Abwehrmechanismus des Bakteriums gegenüber dem Wirkstoff hemmt, wodurch das Antibiotikum die Möglichkeit hat, ungehindert zu agieren (Abb. 2, C). Dies ermöglicht den Einsatz von antibiotischen Wirkstoffen in Organismen, die bereits eine Resistenz entwickelt haben.

A Wirkungsmechanismus von Penicillin



B Inaktivierung von Penicillin durch Penicillinase



C Inaktivierung der Penicillinase durch einen Inhibitor

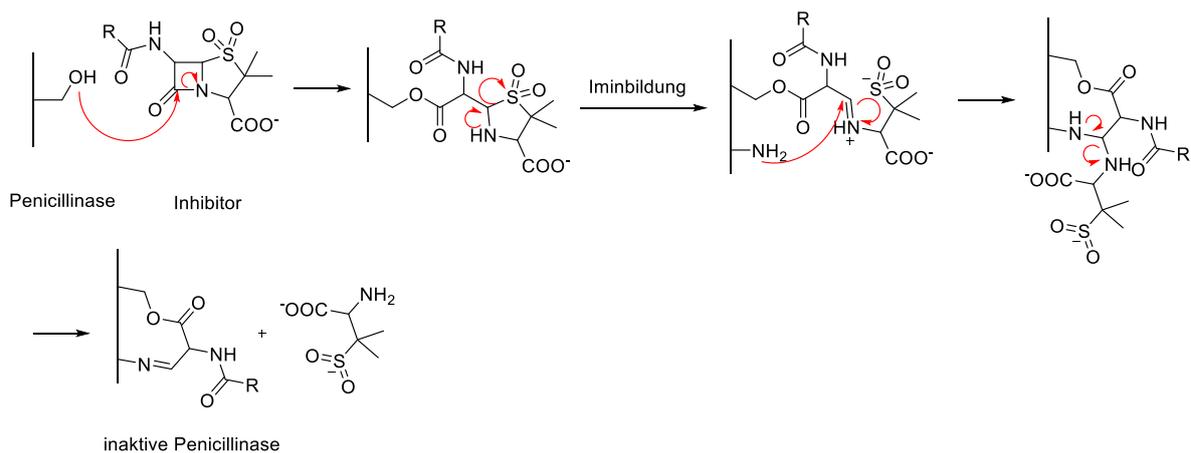


Abb. 2: Mechanismen zur (A) Hemmung von Enzymen durch Penicillin, (B) Inaktivierung von Penicillin durch Penicillinase und (C) Inaktivierung von Penicillinase durch einen Inhibitor.^[30]

Bei den Präparatkombinationen Ceftolozane und Tazobactam, MK-7655 und Imipenem, Ceftazidime und Avibactamin oder Amoxicillin und Clavulansäure handelt es sich um β -Lactam-Antibiotika, die mit β -Lactamase-Inhibitoren versetzt sind. Der In-

hibitor, der für sich alleine keine therapeutische Wirkung hat, verhindert die enzymatische Spaltung des Antibiotikums, welches dann in die Zellwandsynthese des Bakteriums eingreift. Derartige Präparatkombinationen bieten die Möglichkeit, β -Lactambasierte Antibiotika zu verbessern.^[31, 32] Mechanismen, die auf Inhibition des Efflux-Systems basieren, werden ebenfalls erforscht.^[33]

2.3 Enzyme

Bei Enzymen handelt es sich um Proteine, die in lebenden Organismen für die Katalyse von fast allen biochemischen Reaktionen verantwortlich sind. Bei milden Temperaturen zwischen 20 °C und 40 °C und pH-Werten um 7 senken diese die Aktivierungsenergie durch Stabilisierung von Übergangszuständen und beschleunigen dadurch die Reaktionen um einen Faktor von bis zu 10^{14} .^[34, 35] Das Enzym Orotidin 5'-phosphat decarboxylase (ODCase) beschleunigt die Halbwertszeit der Decarboxylierung von Orotidin 5'-phosphat auf 18 ms, während die chemische Reaktion ohne Katalysator unter gleichen Bedingungen mittels Arrhenius-Extrapolation auf eine Halbwertszeit von 78,000,000 Jahren bestimmt werden konnte. Das entspricht einer Reaktionsbeschleunigung von 10^{17} und macht ODCase zurzeit zu dem schnellsten bekannten Protein-Katalysator.^[36, 37] Wie hoch die Effizienz dieser enzymatischen Katalysatoren sind, wird auch durch den Vergleich mit chemisch-katalysierten Reaktionen deutlich: Hier herrschen meist signifikant höhere Temperaturen sowie extreme pH-Werte und Drücke.^[36] Enzyme werden wie jeder andere Katalysator in Reaktionen nicht verbraucht. Sie sind hochspezifisch, aber auch sehr empfindlich gegenüber Schwankungen von Temperatur und pH-Wert. Bedingungen außerhalb des Optimums führen zu Konformationsänderungen durch Denaturierung und damit zur Verminderung bis hin zum vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Die Beeinflussung von Enzymaktivitäten durch Aktivatoren und Inhibitoren, Molekülen, die durch Interaktion mit dem Enzym die Aktivität herauf- oder herabsetzen, findet unter anderem in der Entwicklung von Arzneimitteln wie z. B. Antibiotika Anwendung.

Bei der enzymatischen Katalyse von Reaktionen binden bestimmte Moleküle (Substrate) an das substratspezifische aktive Zentrum des Enzyms, wodurch sich ein Enzym/Substrat-Komplex ausbildet. Enzyme sind in der Lage, strukturell sehr ähnliche Substrate voneinander zu unterscheiden. Dies geschieht durch komplementär geformte Bindungstaschen und anhand der spezifischen Ladung und Hydrophi-

lie/Hydrophobie des Substrats. Das Enzym senkt die Aktivierungsenergie für die substratspezifische Reaktion und spaltet abschließend das Produkt wieder ab, das Enzym steht anschließend für weitere Katalysezyklen zur Verfügung (Abb. 3). In der Regel katalysieren Enzyme nur eine bestimmte Reaktion für ein Substrat.^[35]

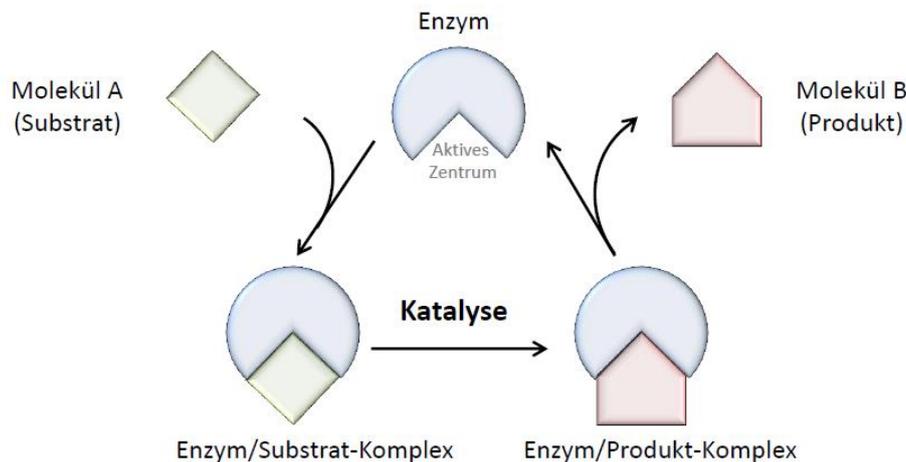


Abb. 3: Schematische Darstellung einer enzymatisch-katalysierten Reaktion.^[35]

Proteasen oder proteolytische Enzyme gehören zu einer der größten und wichtigsten Enzymgruppen. Sie lassen sich in fünf Untergruppen einteilen: Aspartat-, Serin-, Threonin-, Cystein- und Metalloproteasen und sind für die selektive Katalyse der Hydrolyse von Peptidbindungen zuständig. Proteasen sind an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt, dazu gehören der Proteinverdau, die Blutgerinnung, das Zellwachstum, die Immunantwort und die Apoptose. Unkontrollierte oder ungewünschte Proteolyse kann aber auch der Auslöser für Krankheiten wie Krebs, Arthritis, virale Infektionen, Entzündungen und Alzheimer sein. Daher gibt es Inhibitoren, die diesen Katalysezyklus hemmen sollen. Dabei wird zwischen reversibler und irreversibler Hemmung eines Enzyms unterschieden.^[38]

2.3.1 Reversible Hemmung

Die reversible Hemmung von Enzymen basiert meist auf nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor. Da in der Regel keine kovalenten Bindungen aufgebaut werden, kann der Inhibitor wieder verdrängt werden und das Enzym seine katalytische Aktivität somit wiederaufnehmen. Reversible Hemmung von Enzymen spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von Stoffwechselprozessen.

Wird beispielsweise zu viel Produkt durch ein Enzym hergestellt, so kann dieses Produkt als Inhibitor für das Enzym fungieren, indem es reversibel an dieses bindet. Die Pharmaindustrie favorisiert die Entwicklung selektiver reversibler Inhibitoren gegenüber irreversibler Inhibitoren, da deren Wirkprofil in der Regel besser vorhergesagt werden kann.^[39, 40] Je nach Bindungsstelle und Wirkungsmechanismus wird dabei zwischen drei Arten der Enzymhemmung unterschieden: kompetitive Hemmung, nicht-kompetitive (allosterische) Hemmung und unkompetitive Hemmung (Abb. 4).

Bei der kompetitiven Hemmung konkurrieren Substrat und Inhibitor um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Bei dem Inhibitor handelt es sich häufig um eine dem Substrat strukturell sehr ähnliche Verbindung. Ist die Substratbindestelle einmal durch einen Inhibitor besetzt, hat das Substrat keine Möglichkeit mehr, am Enzym zu binden und weiter umgesetzt zu werden. Durch Erhöhung der Substratkonzentration kann der Inhibitor jedoch aus der Bindungsstelle verdrängt werden. Beispiele für kompetitive Inhibitoren sind D-Tubocurarin und andere Curare ähnliche Verbindungen, die Cholinesterase hemmen.^[41] Ein besonderer Fall der kompetitiven Hemmung tritt ein, wenn es durch eine hohe Affinität des Inhibitors gegenüber dem aktiven Zentrum des Enzyms zu so starken Wechselwirkungen kommt, dass durch kinetische Analyse eine Unterscheidung zwischen kompetitiver und irreversibler Hemmung nicht mehr möglich ist. Dies wird als quasi-irreversible Hemmung bezeichnet.

Bei der nicht-kompetitiven oder auch allosterischen (altgr. *αλλος* anders, *στρος* Ort) Hemmung bindet der Inhibitor nicht im aktiven Zentrum des Enzyms, sondern an einer anderen Stelle am Enzym, dem allosterischen Zentrum. Daher ist in der Regel auch keine strukturelle Ähnlichkeit zum Substrat gegeben. Sobald der Inhibitor an das Enzym gebunden hat, kommt es zu einer Konformationsänderung, die dazu führt, dass das aktive Zentrum für das Substrat nahezu bis gänzlich unzugänglich wird. Das Enzym kann dadurch das Substrat nicht mehr binden bzw. umsetzen. Aufgrund der unterschiedlichen Bindestellen von Inhibitor und Substrat kann der Inhibitor des Weiteren nicht durch einen Substratüberschuss verdrängt werden. Stattdessen muss der Inhibitor entfernt oder ersetzt werden. Ein Beispiel für eine allosterische Enzymregulation ist der Mechanismus der Enzymhemmung in Biosynthesewegen. Bei dieser hemmt das Endprodukt einer Biosynthese häufig allosterisch das erste Enzym der Biosynthesekaskade. Ein weiterer, gelegentlich beobachteter Mechanismus ist die sogenannte Substrathemmung, bei der das Substrat bei zu hoher Kon-

zentration selbst als Inhibitor agiert. Ein Beispiel dafür ist die katalytische Umsetzung von Fruktose-6-Phosphat mit Adenosintriphosphat (ATP) zu Fruktose-1,6-Phosphat durch Fruktose-1,6-Diphosphatase (FDPase). Dabei induziert das ATP-Substrat eine allosterische Hemmung, wenn dieses in zu hohen Konzentrationen vorhanden ist.^[42]

Bei der unkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an den Enzym/Substrat-Komplex der enzymatischen Reaktion, d. h. der Inhibitor kann erst an das Enzym binden, wenn dieses mit dem Substrat reagiert hat. Dementsprechend nimmt das Ausmaß der unkompetitiven Hemmung mit der Erhöhung der Substratkonzentration zu.

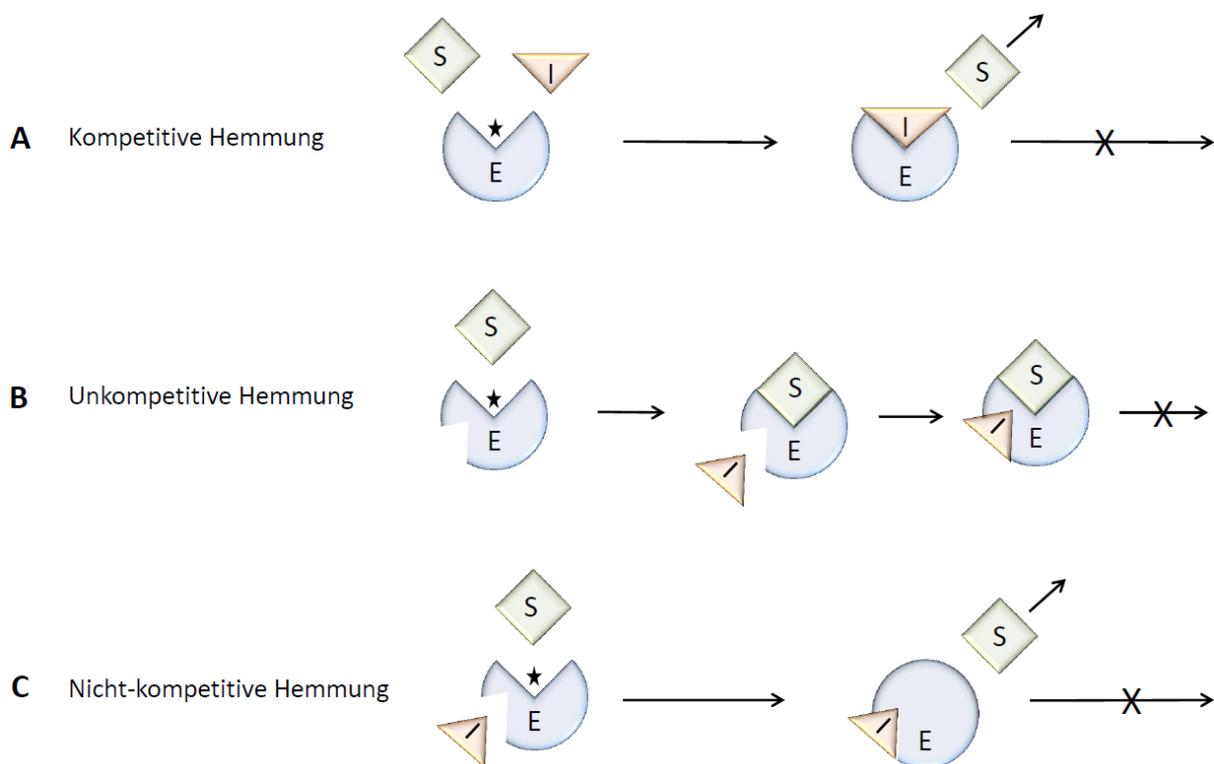


Abb. 4: Die drei Hemmtypen der reversiblen Inhibition. (A) Der Inhibitor I blockiert das aktive Zentrum. (B) Nachdem das Substrat S im aktiven Zentrum am Enzym E gebunden hat, kann der Inhibitor I binden und somit eine Umsetzung zum Produkt verhindern. (C) Der Inhibitor I bindet an das Enzym E und verhindert das Binden vom Substrat S durch eine Konformationsänderung.

2.3.2 Irreversible Hemmung

Die irreversible Hemmung eines Enzyms hat zur Folge, dass dieses unwiderrufflich unbrauchbar für die Katalyse von Reaktionen wird. Im häufigsten Fall geht hierzu ein Inhibitor eine kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms ein. Dabei finden irreversible Reaktionen mit reaktiven Carboxyl-, Amino- oder Hydroxylgruppen statt. Häufig versucht die Zelle diesen Verlust an Enzymaktivität durch erhöhte

Resynthese dieses Enzyms zu kompensieren. Ist die Konzentration des Inhibitors jedoch zu hoch, kann der Verlust an Enzym nicht mehr ausgeglichen werden und es kommt zu physiologischen Schäden innerhalb der Zelle, bis hin zum Zelltod.^[34]

Zu den ersten irreversiblen Inhibitoren gehörten die Halomethylketone. Diese inhibieren Serinproteasen, indem sie eine kovalente Bindung zwischen ihrem Methylenkohlenstoff und dem Stickstoff des His64 im aktiven Zentrum und eine zweite kovalente Bindung zwischen der Hydroxylgruppe des Ser221 im aktiven Zentrum und dem Kohlenstoff ihrer Carbonylgruppe bilden. Auch Cysteinproteasen werden durch die Bildung von kovalenten Thioetheraddukten gehemmt. Der Mechanismus zur Hemmung der Cysteinprotease ist noch nicht geklärt. Es gibt zwei mögliche Mechanismen, die zu diesem Addukt führen könnten. Der eine Mechanismus besteht aus einer direkten Substitution der Halogengruppe durch das Thiolat. In der zweiten Variante entsteht zunächst ein Thiohemiketal, welches zu einem dreigliedrigen Sulfoniumintermediat umgesetzt wird und anschließend zum Thioetheraddukt umlagert.^[38] Neben den Halomethylketonen sind eine Vielzahl an weiteren irreversiblen Inhibitoren bekannt (Abb. 5).

Ein anderes bekanntes Beispiel sind β -Lactamasen, wie Penicillin, die Serinproteasen inhibieren. Diese binden irreversibel an der Hydroxylgruppe eines Serinrestes im aktiven Zentrum der Transpeptidase. Der entstandene Ester kann nicht weiter hydrolysiert werden, wodurch eine irreversible Hemmung des Enzyms erreicht wird.^[34]

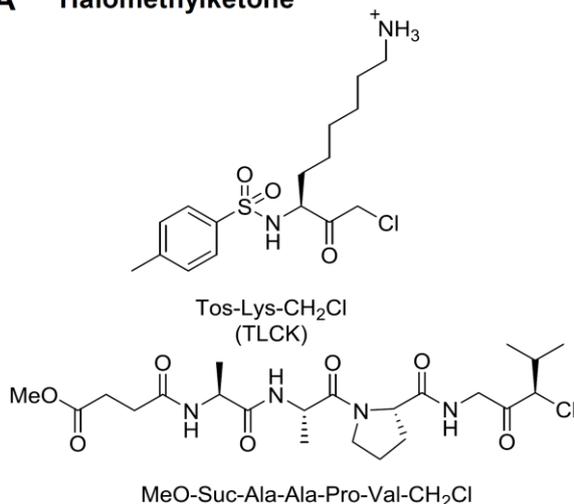
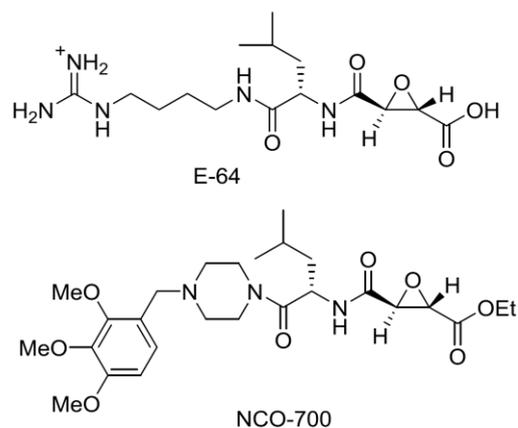
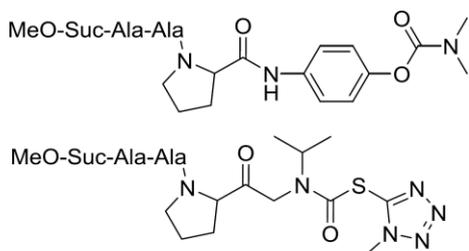
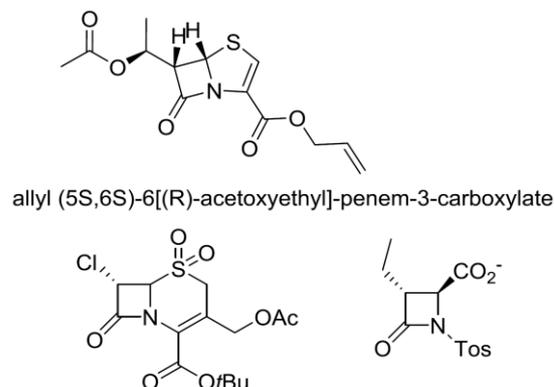
A Halomethylketone**B Epoxysuccinylpeptide****C Carbamate****D β-Lactame**

Abb. 5: Beispiele für Inhibitoren, die für die irreversible Hemmung von Enzymen eingesetzt werden. (A) Chloromethylketone mit einer entsprechenden Peptidsequenz als selektive Inhibitoren für fast alle Serinproteasen. (B) Epoxysuccinylpeptide, die selektiv Cysteinproteasen durch S-Alkylierung von Cystein inhibieren. (C) Verbindungen, die durch Übertragung einer Acyleinheit auf das Enzym selektiv Elastase inhibieren. (D) β-Lactam-Inhibitoren, die durch Aufbruch des β-Lactam-Rings an Serin binden.^[38]

2.4 Proteasen

2.4.1 Einteilung, Aufbau und Funktionen

Der Abbau von Proteinen innerhalb von lebenden Organismen ist essentiell. Die Resonanzstruktur macht Amidbindungen jedoch sehr stabil. Zum einen bekommt die Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung einen Doppelbindungscharakter, zum anderen ist der Carbonyl-Kohlenstoff weniger elektrophil und daher weniger anfällig für nukleophile Angriffe. Für die Aktivierung der unreaktiven Carbonyl-Funktion und die Spaltung der

Amidbindung in einer Zelle sind Proteasen zuständig. Proteasen sind somit Enzyme, die Proteine in ihrem aktiven Zentrum binden und dort die Hydrolyse katalysieren.^[43] Die Einteilung erfolgt über den Mechanismus der Substrathydrolyse in fünf unterschiedliche Gruppen: Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen.^[44] Diese fünf Gruppen benutzen zwei unterschiedliche Mechanismen, um das tetraedrische Intermediat, welches bei der katalytischen Spaltung eines Peptids entsteht, zu stabilisieren. In Serin-, Threonin- und Cysteinproteasen ist das bindende Nukleophil, die Hydroxyl- bzw. Thiolgruppe, der entsprechende Rest einer proteinogenen Aminosäure. Es wird daher von einer kovalenten Katalyse gesprochen, da während der Katalyse eine kovalente Bindung zwischen Enzym und Protein entsteht. Bei den Serin- und Cysteinproteasen fungiert dabei meistens ein weiteres Histidin als Base zur Aktivierung des Nukleophils. In Aspartat- und Metalloproteasen ist das angreifende Nukleophil hingegen ein aktiviertes Wassermolekül, sodass es zwischen Enzym und Protein zu einer nicht-kovalenten Bindung kommt. Als Base oder Säure dient hier die namensgebende Aminosäure Aspartat oder Zink bei Metalloproteasen (Abb. 6). Es wird außerdem zwischen Endo- und Exopeptidasen differenziert. Endopeptidasen spalten Proteine in der Mitte des Moleküls, während Exopeptidasen einzelne Aminosäuren bis kurze Peptidketten vom N- oder C-Terminus abspalten (Aminopeptidase oder Carboxypeptidase).^[45]

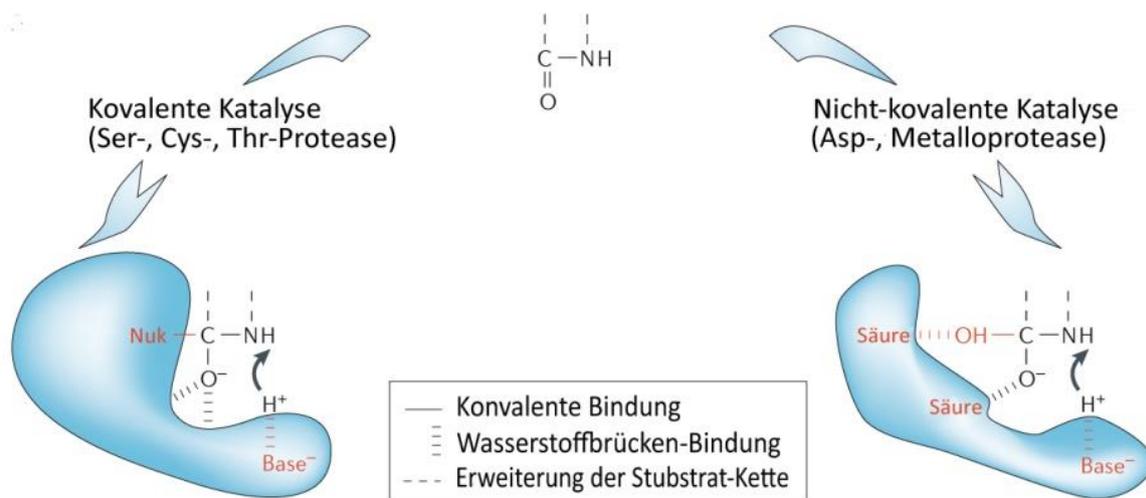


Abb. 6: Schematische Darstellung einer kovalenten und nicht-kovalenten Katalyse einer Hydrolyse-reaktion durch ein Enzym. (Modifiziert nach Turk *et al.*, 2006)^[45]

Lange ging man davon aus, dass der Abbau von Proteinen unspezifisch abläuft und lediglich für den Proteinkatabolismus und somit die Wiederauffüllung des Aminosäu-

re pools notwendig ist. Inzwischen ist jedoch klar, dass Proteasen hochspezifisch sind und für die Kontrolle einer Vielzahl von biologischen Prozessen in allen lebenden Organismen von Bedeutung sind. Dazu gehören die Kontrolle der intra- und extrazellulären Lokalisierung von Proteinen, das Generieren und Verstärken molekularer Signale (Signaltransduktion), die Aktivierung oder Inaktivierung von anderen Enzymen, Hormonen und Wachstumsfaktoren und das Modulieren von Protein-Protein-Interaktionen.^[46-48] In Anbetracht der Relevanz proteolytischer Ereignisse für viele essentielle Prozesse ist es nicht verwunderlich, dass ein Defekt oder eine temporär- oder räumlich-fehlgeleitete Aktivität zu schweren Erkrankungen wie Krebs oder Arthritis führen kann.^[49]

Proteasen sind auch in Mikroorganismen zu finden, wo sie für die Replikation benötigt werden oder als Virulenzfaktor fungieren. Daher werden sie gerne als *Target* bei der Entwicklung neuer Therapien gegen Infektionen genommen.^[50] Doch auch in der Lebensmittel- und Waschmittelindustrie sowie in der Lederindustrie zur Enthaarung und zum Beizen der Haut werden Proteasen eingesetzt.^[51, 52]

Zu der zahlenmäßig größten Gruppe der Proteasen gehören Serinproteasen. Sie kommen in vielen Organismen vor und sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt.

2.4.2 Serinproteasen

Ein Drittel aller bekannten Proteasen sind Serinproteasen. Sie wurden nach dem nukleophilen Serin-Rest im aktiven Zentrum benannt. Serinproteasen besitzen eine so genannte katalytische Triade, bestehend aus drei Aminosäuren, oder eine katalytische Diade, bestehend aus zwei Aminosäuren, die die proteolytische Spaltung von Proteinen im aktiven Zentrum durchführen. Einige bekannte Varianten der Triade und Diade sind Ser/His/Glu, Ser/His/His oder Ser/Glu/Asp und Ser/Lys oder Ser/His. Die in der Natur mit Abstand am weitesten verbreitete Variante ist jedoch die katalytische Triade Ser/His/Asp. Die Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen, die eine der größten Untergruppen darstellen und zu den mit am besten untersuchten Serinproteasen gehören, besitzen ebenfalls diese „klassische“ katalytische Triade.^[53, 54] Daher soll im Folgenden die enzymatisch-katalysierte Hydrolyse von Proteinen am Beispiel des Chymotrypsins genauer erklärt werden (Abb. 7). Chymotrypsin liegt als Zymogen, der inaktiven Vorstufe eines Enzyms, im Pankreas vor und fungiert dort als Verdau-

ungsenzym. Wie die meisten Serinproteasen gehört Chymotrypsin zu den Endopeptidasen und spaltet bevorzugt an der Carboxyseite von aromatischen Aminosäuren und von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten wie Phenylalanin oder Tryptophan.^[51] Die katalytische Triade im aktiven Zentrum besteht aus His57, Ser195 und Asp102. Da die Hydroxylgruppe des Serins von Natur aus nicht stark nukleophil ist, muss das Enzym mit einer Base das Serin für weitere Reaktionen zunächst aktivieren.

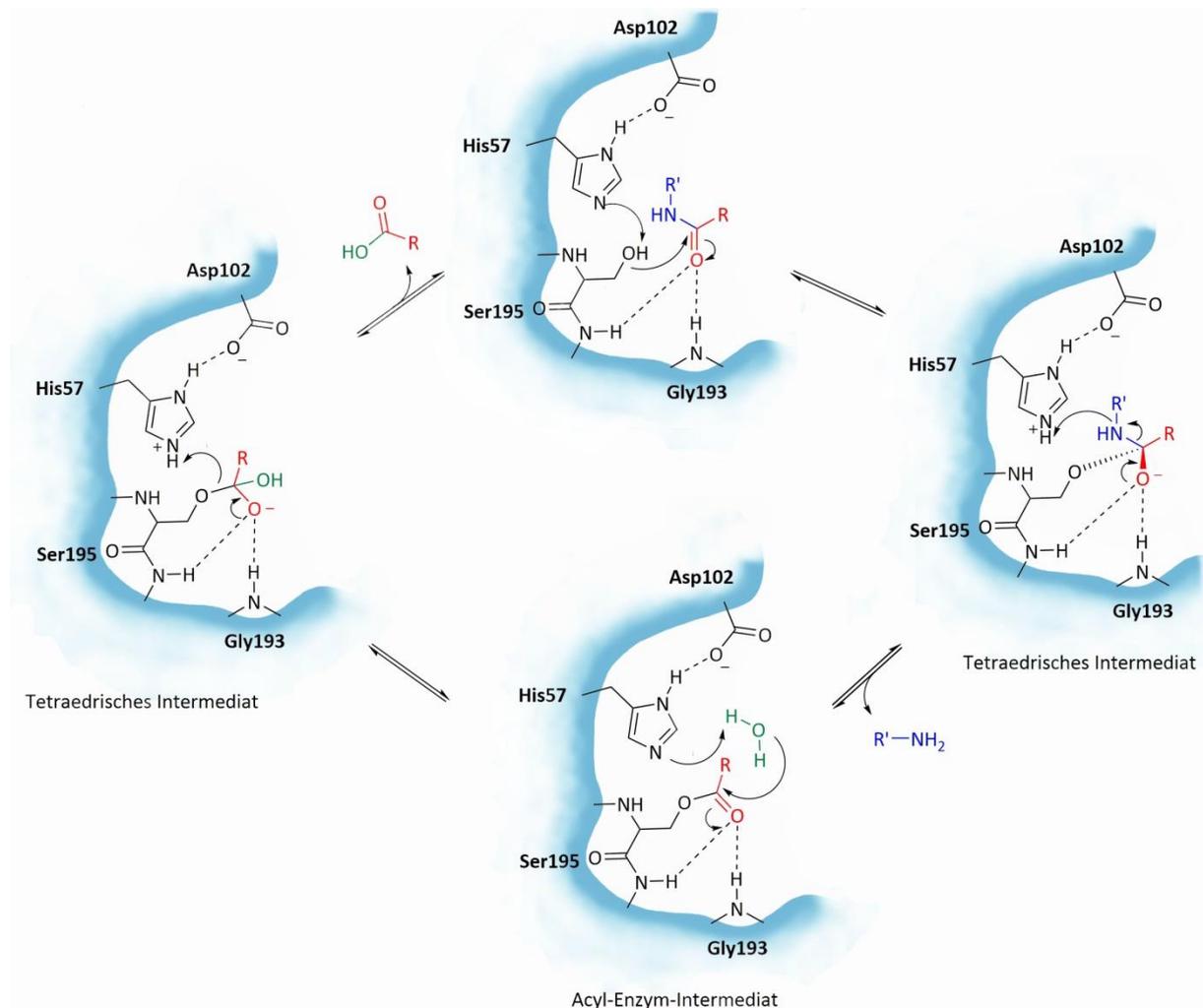


Abb. 7: Allgemeiner Hydrolyse-Mechanismus einer Serinprotease mit der katalytischen Triade Ser/His/Asp. (Modifiziert nach Hedstrom *et al.*, 1994)^[55]

Durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen His57 und Asp102 wird die Basizität von Histidin so stark erhöht, dass dieses die Hydroxylgruppe des Ser195 deprotonieren kann. Das sogenannte *oxyanion hole*, eine positiv geladene Tasche, die aus den NH-Gruppen des Peptidrückgrates Gly193 und Ser195 gebildet wird, aktiviert die Carbonylgruppe des zu spaltenden Proteins. Das Alkoholat

greift dann nukleophil an dem aktivierten Kohlenstoff der Carbonylgruppe an, sodass ein negativ geladenes, tetraedrisches Intermediat entsteht. Dieses wird durch das *oxyanion hole* unter Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert. Das *oxyanion hole* ist strukturell an die katalytische Triade verknüpft. Der C-terminale Teil des Proteins wird abgespalten, sodass ein stabiles Acyl-Enzym-Intermediat entsteht. Im nächsten Schritt wird diese Ester-Bindung durch Hydrolyse gespalten. Histidin fungiert wie bereits zuvor beschrieben als starke Base und sorgt für eine Deprotonierung des Wassers. Dieses greift dann nukleophil am aktivierten Carbonyl-Kohlenstoff an und es entsteht erneut ein negativ-geladenes Intermediat, das durch das *oxyanion hole* stabilisiert wird. Nach Abspaltung des N-terminalen Teils des Proteins steht das Ser195 für weitere Katalysen zur Verfügung.^[56-58]

Die Substraterkennung erfolgt über die Polypeptid-Bindungsstellen und die Bindungstaschen für die Seitenketten des Peptidsubstrats. Die Nomenklatur der Bindungstaschen erfolgt nach Schechter und Berger. Die Bindungsstellen im aktiven Zentrum des Enzyms werden von der katalytischen Bindungsstelle zum N-Terminus als S_1 - S_n und von der katalytischen Bindungsstelle zum C-Terminus als S_1' - S_n' bezeichnet. Analog dazu werden die Bindungsstellen am Substrat von der zu spaltenden Amidbindung zum N-Terminus als P_1 - P_n und von der zu spaltenden Amidbindung zum C-Terminus als P_1' - P_n' bezeichnet.^[59, 60] Die S_1 -Stelle des Chymotrypsins, direkt benachbart zum Ser195, bekommt ihre Spezifität durch die Kombination der drei Aminosäuren Ser189, Gly216 und Gly226, die eine hydrophobe Tasche bilden. Substrate mit hydrophoben P_1 -Rest werden demnach stark bevorzugt.^[61] Gleichzeitig interagiert die Polypeptid-Bindungsstelle, die die Hauptketten der Reste Ser214, Trp215 und Gly216 beinhaltet, durch Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den P_1 - P_3 Resten des Substrats. Diese Interaktion ist mitentscheidend für die effektive Hydrolyse des Substrats. Auch die Bindungsstelle S_2 , bestehend aus His57, Trp215 und Leu99, zeigt schwache hydrophobe Tendenzen, während die Bindungsstelle S_3 eher unspezifisch sogar in der Lage ist, D-Aminosäuren anzunehmen. Aufgrund der guten elektrostatischen Wechselwirkung mit Asp35 und Asp64 bevorzugt Chymotrypsin Aminosäuren wie Arg oder Lys als P_1' . Die genauen Interaktionen der P' -Seitenkette sind bisher jedoch nur rudimentär bekannt.^[53]

2.4.3 Die HtrA Familie

HtrA (*high temperature requirement A*)-Proteasen gehören zu den ATP-unabhängigen Serin-Endopeptidasen, die unter anderem in Bakterien, Archaeen, Pflanzen, Pilzen, Fröschen, Fischen und Säugetieren gefunden wurden.^[62] HtrA-Proteasen besitzen eine Proteasedomäne und eine oder zwei C-terminale PDZ-Domänen (Abb. 8, A). Der Name der PDZ-Domäne stammt von den drei Proteinen, in denen diese Domäne als erstes entdeckt und beschrieben wurden: PSD-95 (*post-synaptic density of 95 kDa*), DLG1 (*discs large*) und ZO-1 (*zonula occludens 1*).^[63] Während die Protease-Domäne wie zuvor beschrieben die Amidbindungen spaltet, ist die PDZ-Domäne allgemein eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne. So konnte gezeigt werden, dass bei einigen HtrA-Proteasen das Substrat C-terminal an die PDZ-Domäne bindet, während bei anderen ein „Aktivatorprotein“ an diese Domäne bindet. Die PDZ- und die Protease-Domäne sind durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden, die dadurch gegebene Mobilität ermöglicht die Kontrolle über den Zugriff auf den proteolytischen Raum sowie die Kontrolle über den Mechanismus der Protease-Aktivierung.

Wie durch Röntgenstrukturanalysen gezeigt werden konnte, ordnen sich HtrAs zu Trimeren oder zu Vielfachen von Trimeren wie z. B. Hexameren oder höhergeordneten Oligomeren (bis zu 24-meren) zusammen (Abb. 8, B).^[63, 64] Bei den trimeren Strukturen ordnen sich die einzelnen Monomere trichterförmig an, sodass die Proteasedomänen nach innen und die PDZ-Domänen nach außen zeigen. Neben weiteren Mechanismen dient das Anordnen und Entordnen zu und von hochgeordneten Oligomeren der Regulierung der Proteaseaktivität.^[63] Die katalytische Aktivität ist sehr sensibel und kann anders als bei anderen klassischen Serinproteasen reversibel ein- und ausgeschaltet werden.

Einige HtrAs bauen beschädigte oder fehlgefaltete Proteine ab und sind damit essentiell für die Proteinqualitätskontrolle^[65], indem sie fehlgefaltete Proteine abbauen oder auch teilweise als Chaperone agieren.^[66-68] Ähnlich divers sind auch die zellulären Aufenthaltsorte von HtrAs: Bei Bakterien sind diese extrazytoplasmatisch lokalisiert, also in der Zellhülle von Gram-negativen Bakterien oder im extrazellulären Raum von Gram-positiven Bakterien. Bei Eukaryoten findet man diese in den Mitochondrien, den Chloroplasten, dem Kern und der extrazellulären Matrix.^[67]

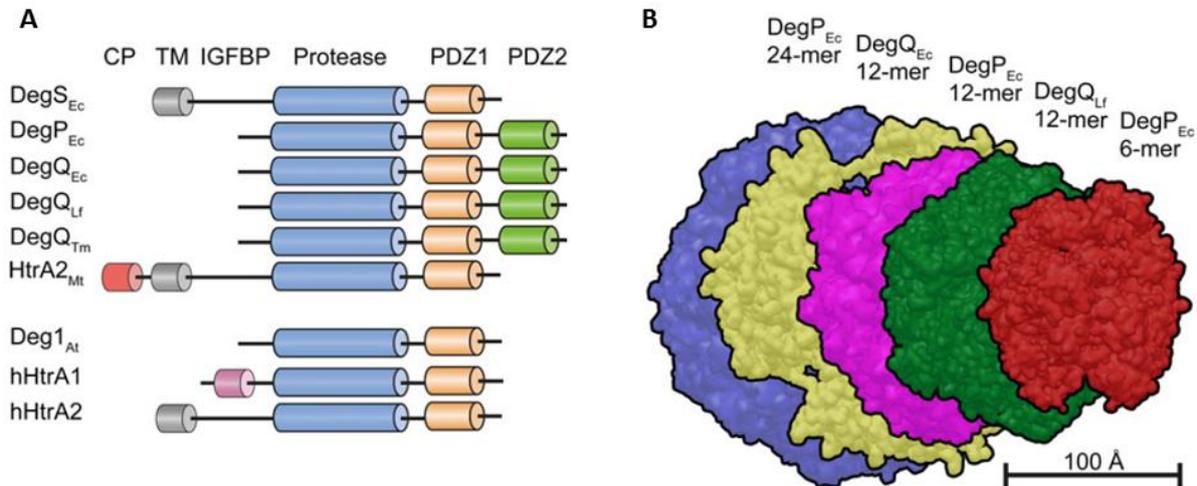


Abb. 8: Zusammensetzung von HtrA-Proteasen und deren Anordnung zu Oligomeren. (A) Schematische Darstellung der Domänen in unterschiedlichen HtrA-Proteasen. Dabei ist CP die zytoplasmatische Domäne (*cytoplasmatic domain*), TM die transmembrane Domäne (*transmembrane domain*), IGFBP die insulin-ähnliche Wachstumsfaktor Bindungsprotein Domäne (*insulin-like growth-factor binding protein domain*). (B) Größenvergleich von oligomerisierten HtrAs. (Modifiziert nach Hansen *et al.*, 2012)^[63]

2.4.3.1 Prokaryotische HtrA-Proteasen

Bakterielle HtrA-Proteine übernehmen wichtige Funktionen in der Proteinqualitätskontrolle, wo sie sowohl als Chaperone als auch als Proteasen im periplasmatischen Raum fungieren oder in der Einleitung des Hitzestress-Signalweges involviert sind.^[69] Die bekanntesten Vertreter der prokaryotischen HtrAs sind die *E. coli*-Proteine DegP, DegQ und DegS. Für diese Enzyme liegen biochemische und strukturelle Daten vor, die eine detaillierte Einsicht in die Organisation, die Funktion und den regulatorischen Mechanismus, darunter die allosterische Signalkaskade und die dynamische Änderung der Oligomerisationsgrade erlauben.^[63]

DegP, ursprünglich als Protease Do bezeichnet, wurde 1983 als neues zytoplasmatisches proteolytisches Enzym in *Escherichia coli* entdeckt und beschrieben.^[70] Einige Jahre später, 1991, wurde das erste Mal berichtet, dass DegP Auswirkungen auf die Virulenz von Bakterien haben soll.^[71, 72] DegP besitzt eine N-terminale Protease-Domäne und zwei PDZ-Domänen, welche teilweise in der Substratbindung involviert zu sein scheinen (Abb. 9, A). In seiner inaktiven Form liegt es als Hexamer vor.^[73] Sobald jedoch ein Substrat an die PDZ-Domäne bindet, kommt es zu einer Destabilisierung des Hexamers und einer Umwandlung zu einem höher-geordneten proteolytisch aktiven 12-mer oder 24-mer (Abb. 9, C).^[74]

DegP ist ein bifunktionelles Hitzeschockprotein, das im Periplasma der Zelle lokalisiert ist.^[75] Dort kombiniert es die Aufgaben eines Chaperons und einer Protease.^[64, 76, 77] Dies bedeutet, dass DegP sowohl bei der Rückfaltung fehlgefalteter periplasmatischer Proteine assistiert^[78] und, falls dies nicht möglich sein sollte, diese auch abbauen kann. Dies ist ein entscheidender Prozess in der Proteinqualitätskontrolle, in welcher fehlgefaltete oder -lokalisierte Proteine "repariert" oder abgebaut werden, um schwerwiegende Fehlfunktionen zu vermeiden. Dies ist notwendig, weil sich z. B. fehlgefaltete Proteine innerhalb der Zelle zu Aggregaten zusammenlagern können,^[79] die die Zelle beschädigen oder gar zum Zelltod und zu neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington führen können.^[80] Dabei erfolgt die Proteinqualitätskontrolle in zwei Stufen: Treten durch Stressfaktoren fehlgefaltete Proteine auf, werden diese von DegP und anderen Chaperonen gebunden, um ein Agglomerieren zu verhindern und das Protein zu entfalten.^[81] Ist ein Protein jedoch stark beschädigt und eine Reparatur nicht mehr möglich, werden diese Proteine durch Proteasen abgebaut, bevor sie Schaden anrichten können.^[80] DegP kann nun beide Funktionen übernehmen. Als Protease agierend, bindet DegP dabei fehlerhafte Proteine über ihren C-Terminus an seine PDZ-Domäne 1. Anschließend wird das gebundene Protein durch die Protease-Domäne gespalten. Das so entstehende verkürzte Substrat wird nicht in das Periplasma abgegeben, sondern über den neu generierten C-Terminus erneut an die PDZ-Domäne 1 gebunden und ein weiteres Mal gespalten (Abb. 9, B). Dieser Prozesse wird so lange wiederholt, bis das komplette Protein verdaut wurde.^[82] Weitere Funktionen von DegP scheinen der Transport von ungefalteten Außenmembranproteinen (*outer-membrane proteins*, OMPs) durch das Periplasma an die Zellmembran zu sein.

DegQ gehört wie DegP zu den Protease-Chaperonen und setzt sich aus einer Protease- und zwei PDZ-Domänen zusammen. Es besitzt eine hohe Sequenzhomologie von 60 % zu DegP.^[63] In seiner inaktiven Form lagert sich DegQ zu Trimeren zusammen, während bei der Aktivierung Komplexe aus bis zu acht Trimeren gebildet werden. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zu DegP liegt nahe, dass DegQ auch ähnliche Funktionen in der Zelle übernimmt.^[83] Allerdings ist DegQ bisher weniger gut charakterisiert als die beiden Proteine DegP und DegS.^[63]

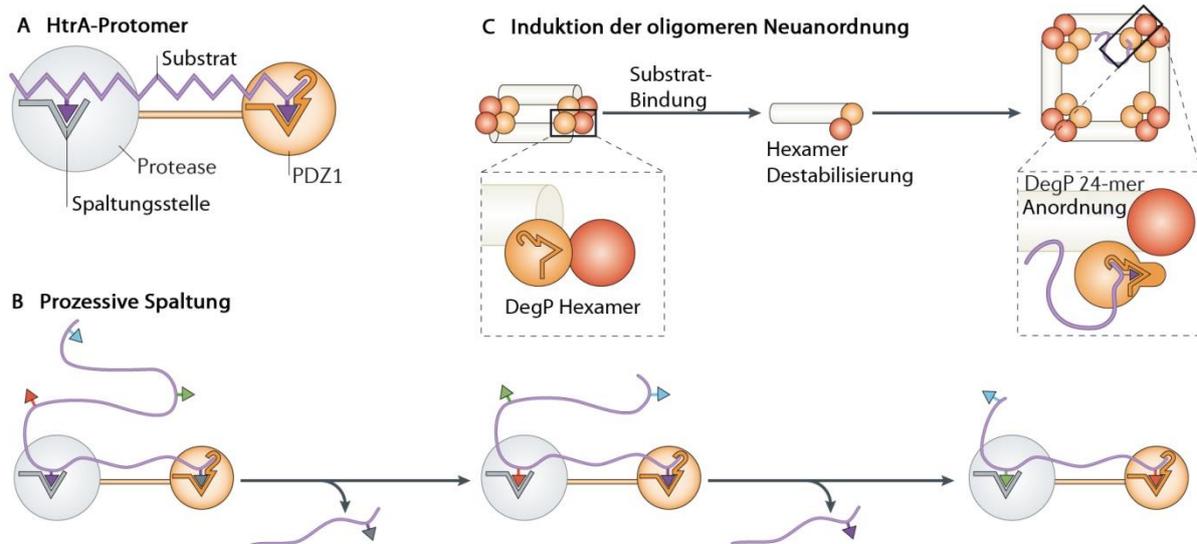


Abb. 9: Funktion der PDZ-Domäne in der Proteolyse. (A) Aufbau eines HtrA-Protomers. (B) Schematische Darstellung der Spaltung eines Substrats an unterschiedlichen Spaltungsstellen (farbige Dreiecke) durch die Zusammenarbeit von Protease- und PDZ1-Domäne. (C) Oligomere Umwandlung von DegP durch Bindung eines Peptids an die PDZ-Domäne. (Modifiziert nach Clausen *et al.*, 2011)^[67]

Im Gegensatz zu DegP und DegQ ist DegS eine rein regulatorische Protease, die als periplasmatischer Stress-Sensor bei der Proteinqualitätskontrolle agiert.^[67] Sie besteht aus einer N-terminalen Transmembran-, einer PDZ- und einer Protease-Domäne. Die Transmembrandomäne durchquert die Phospholipiddoppelschicht und ist damit in der Zellmembran verankert (Abb. 10, B). Über einen Linker ist sie an die Proteasedomäne im Periplasma verbunden, die wiederum mit der PDZ-Domäne verbunden ist.^[84] Die N-terminale Protease besteht aus den Resten 42-251 und die C-terminale PDZ-Domäne aus den Aminosäuren 252-354. Tyr351 passt in eine Tasche der Proteasedomäne, wo es zu Van-Der-Waals-Wechselwirkungen mit Leu124, Pro183, Arg256 und Tyr258 kommt. Zusätzlich sind die beiden Domänen über eine Salzbrücke verbunden, sodass die PDZ- und Proteasedomäne insgesamt über zwei Linker miteinander verbunden sind.^[84] Wie alle prokaryotischen HtrA-Proteine bildet DegS Oligomere. Dabei lagern sich je drei DegS-Protomere zu Trimeren zusammen, die sich trichterförmig ausrichten. Die drei Proteasedomänen zeigen in dieser Anordnung nach innen und die drei PDZ-Domänen nach außen (Abb. 10, A).

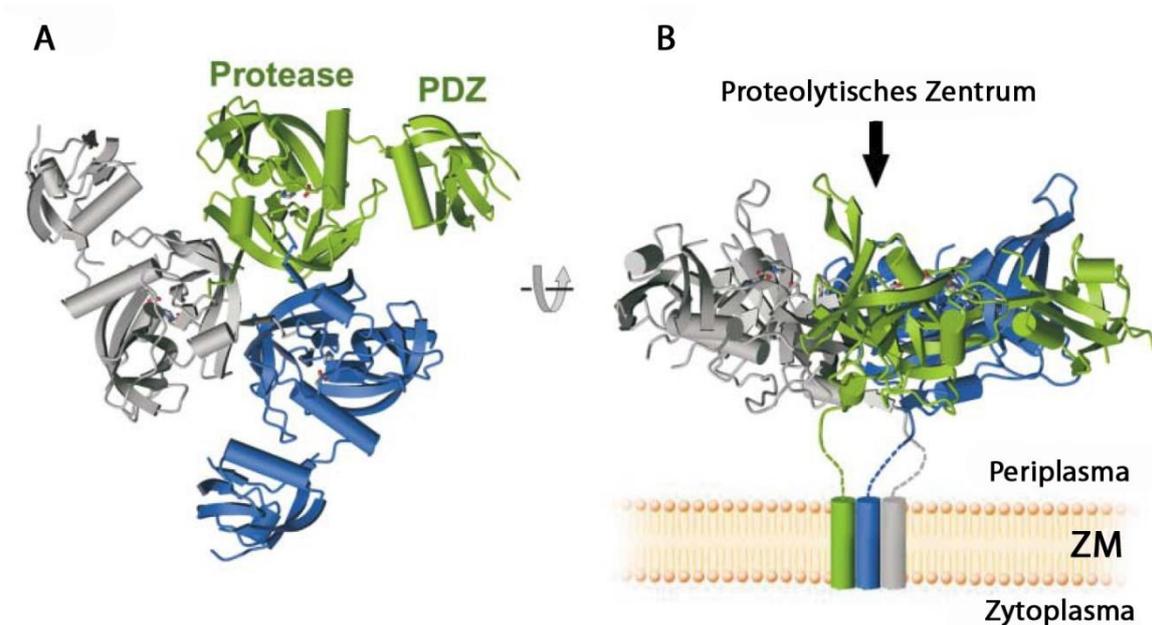


Abb. 10: Struktur der Serinprotease DegS. (A) DegS-Trimer von oben betrachtet, wobei jedes DegS-Protomer farblich unterschiedlich dargestellt ist. (B) Seitenansicht eines DegS Trimers und dessen Orientierung im Periplasma. (Modifiziert nach Wilken et al., 2004)^[84]

Bakterielles DegS liegt unter normalen Bedingungen des Zellwachstums als inaktive Protease in der Zelle vor, die erst durch äußere Einflüsse wie fehllokalisierte Proteine im Periplasma aktiviert wird und damit zur Regulation der Stressantwort des Systems beiträgt.^[85] Röntgenstrukturanalysen und biochemische Assays ermöglichten die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus für diese Protease. Durch Interaktionen zwischen Protease- und PDZ-Domäne wird die sonst flexible PDZ-Domäne in einer starren Position gehalten, sodass Substrate nun problemlos präzise binden können.^[67] Fehlerhafte Proteine, die sich außerhalb der Membran befinden (OMPs), binden C-terminal an die PDZ-Domäne und bewirken eine Neuorientierung des Loop 3 an der Protease-Domäne. Die daraus resultierenden Konformationsänderungen führen letztendlich zur Aktivierung des katalytisch aktiven Zentrums der Proteasedomäne (Abb. 11).^[84-88] In biochemischen Assays konnte gezeigt werden, dass DegS eine hohe Affinität gegenüber OMPs aufweist, die eine Kombination aus den Aminosäuren Phe-x-Phe oder Tyr-x-Phe am C-Terminus besitzen.^[86]

Diese Proteine dienen also als Aktivatoren für DegS. Das proteolytisch aktive Zentrum besteht aus der klassischen katalytischen Triade Asp126, His96 und Ser201. Da die Aktivatorproteine außerhalb des aktiven Zentrums der Protease binden, handelt es sich um eine allosterische Aktivierung.

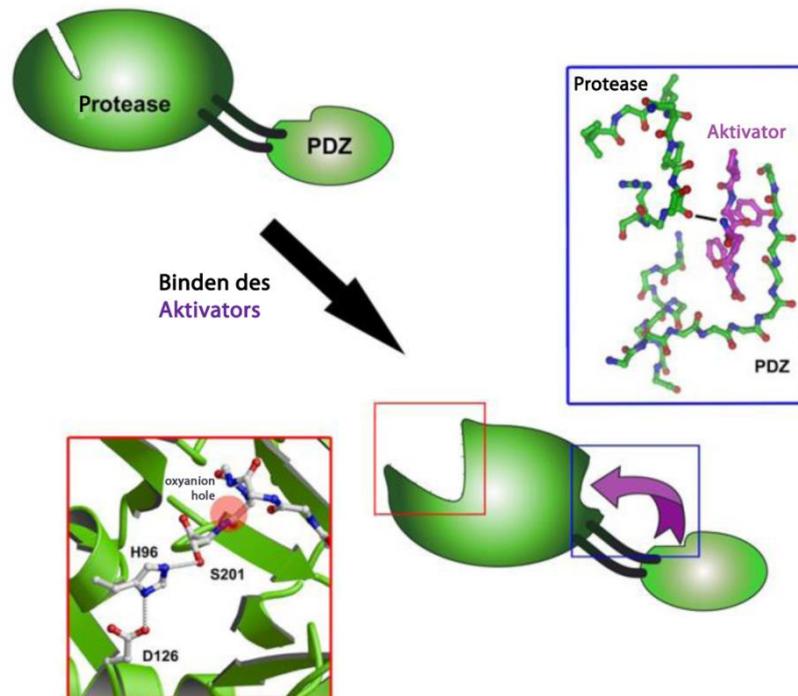


Abb. 11: Allosterische Aktivierung der Proteasedomäne. Der Aktivator bindet an die PDZ-Domäne und induziert eine Serie von Konformationsänderungen, die zur Aktivierung der proteolytischen Aktivität führen.

In dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* existiert eine Vielzahl an Systemen für die Proteinqualitätskontrolle. Darunter der σ^E -Signalweg, der stressinduzierte fehlgefaltete Proteine im Periplasma wahrnimmt und über Signaltransduktion die Transkription von Stressgenen im Zytoplasma induziert. OMPs binden an die PDZ-Domäne von DegS und aktivieren die Proteasedomäne für die Spaltung des Substrats RseA zwischen Val148 und Ser149. Bei RseA handelt es sich um einen Anti- σ -Faktor, der den σ -Faktor σ^E bindet und damit seine transkriptionale Aktivität inhibiert. Allerdings verhindert das am RseA gebundene RseB diesen ersten Schnitt im Periplasma. Erst durch eine Anhäufung von Lipopolysacchariden (LPS), die direkt an RseB binden, wird der inhibitorische Effekt aufgehoben und die RseA-Spaltung kann stattfinden. Die sich in der Zellmembran befindende Metalloprotease RseP (*regulator of sigma E protease*) wird durch den neu generierten C-Terminus von Val148, der beim Abbau von RseA im Periplasma entsteht, aktiviert und katalysiert den zweiten Schnitt, zwischen den Resten 108 und 109, innerhalb der Zellmembran nahe des Zytoplasmas.^[89-93] RseA und σ^E liegen dann als freibeweglicher, aber inaktiver, Komplex im Zytoplasma vor. Erst durch den vollständigen Abbau des RseA-Substrats durch zytoplasmatische, ATP-abhängige Proteasen wie ClpXP wird σ^E freigesetzt und kann an die RNA-Polymerase (*ribonucleic acid polymerase*) binden und die

Transkription von Stressgenen wie DegP induzieren (Abb. 12).^[94] Der allgemeine Mechanismus eines proteolytischen Signaltransports vom Periplasma über die Zellmembran ins Zytoplasma wird dabei als regulierte Intermembran-Proteolyse (RIP, *regulated intermembrane proteolysis*) bezeichnet.^[95]

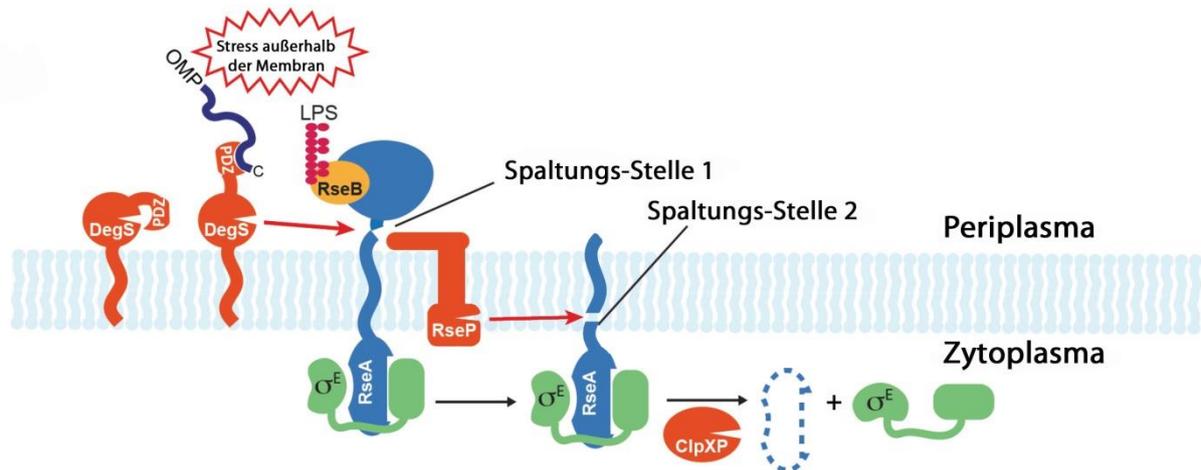


Abb. 12: Mechanismus der DegS-induzierten σ -Faktor-Freigabe ins Zytoplasma, durch Abbau des Anti- σ -Faktors RseA. (Modifiziert nach Paget *et al.*, 2015)^[89, 95]

Der σ^E -Signalweg in *E. coli*, aber auch in anderen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, ist somit ein wichtiger Mechanismus zum Erhalt der Zellintegrität und der Virulenz.^[96, 97] DegS als Stresssensor ist dabei die auslösende Kraft für eine Kaskade von Mechanismen und wird dadurch zu einem essentiellen Protein für die Regulation der Stressantwort.^[86, 98] Diese Funktion macht DegS auch zu einem attraktiven *Target* in der Entwicklung neuer Antibiotika.

2.4.3.2 Eukaryotische HtrA-Proteasen

Es sind vier humane HtrA-Proteasen (HtrA1-4) bekannt. Diese sind an verschiedenen biologischen Mechanismen beteiligt: Zellwachstum, Apoptose, Arthritis und neurodegenerativen Krankheiten, um nur ein paar zu nennen.^[99] Humane HtrA-Proteasen werden nach ihren Domänen am N-Terminus in zwei Gruppen unterteilt. Während sich HtrA1, HtrA3 und HtrA4 aus einer N-terminalen IGFBP7-Domäne (*insulin growth factor binding protein 7*), einer Proteasedomäne und einer C-terminalen PDZ-Domäne zusammensetzen,^[67, 100] setzt sich HtrA2 wie die bakterielle Protease DegS aus einer N-terminalen Transmembrandomäne, einer Proteasedomäne und einer C-terminalen PDZ-Domäne zusammen.^[67]

HtrA1 gehört zu den biochemisch und mechanistisch best-erforschten humanen HtrA-Proteasen. In Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass HtrA1 in die Kontrolle und Regulation des Zellwachstums von normalen und malignen transformierten Zellen involviert ist.^[101] Während bei Osteoarthritis die Expression von HtrA1 ansteigt, wird die Expression in Fibroblasten in Ovarialkarzinomen und Melanomen stark runterreguliert.^[101, 102] Es konnte sogar gezeigt werden, dass eine Überexpression von HtrA1 in Krebszellen das Zellwachstum und die Proliferation *in vitro* und *in vivo* inhibiert. Es besteht daher die Vermutung, dass HtrA1 aber auch HtrA2 möglicherweise als Tumorsuppressor agieren.^[67, 103]

HtrA2 wird stressinduziert aktiviert. Es agiert als Caspase-Aktivator, indem es Inhibitoren von apoptotischen Proteinen (*inhibitors of apoptotic proteins*, IAPs) bindet und damit reguliert. HtrA2 kann sowohl durch Störung der Caspase-IAP-Interaktionen als auch Caspase-unabhängig durch seine Proteaseaktivität die Apoptose induzieren.^[104-108] Fehlfunktionen von HtrA2 werden mit Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson in Verbindung gebracht.^[66, 109] Sowohl in inaktiver als auch in aktiver Form liegt es als Trimer vor.^[67]

Die Proteasen HtrA3 und HtrA4 sind bisher wenig erforscht. HtrA3 weist mit über 50 % übereinstimmender Aminosäuren eine hohe Sequenzhomologie zu HtrA1 auf. Auch der Aufbau der Domänen ist identisch. Aufgrund dessen wird vermutet, dass HtrA3 ähnliche Funktionen wie HtrA1 hat.^[110] Dazu gehört der Einfluss auf die Zytotoxizität von chemotherapeutischen Mitteln.^[111]

Es wird vermutet, dass die Inhibition der proteolytischen Aktivität von eukaryotischen HtrAs zur Behandlung von Krebs und neurodegenerativen Krankheiten geeignet ist.^[66]

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die chemische Synthese von niedermolekularen Modulatoren für die Serinprotease DegS und dessen Validierung als therapeutisches *Target* zur Entwicklung neuer Antibiotika.

Aufgrund des vermehrten Auftretens von bakteriellen Resistenzen gegenüber Antibiotika wird kontinuierlich an der Entwicklung neuer antimikrobieller Verbindungen geforscht und nach neuen bakteriellen *Targets* gesucht.^[23, 24] Als Stresssensor ist das periplasmatische Protein DegS essentiell für die Stressantwort in bakteriellen Zellen. Es ist in einer Vielzahl von Bakterien zu finden.^[67] Diesem Protein wird außerdem eine besondere Bedeutung in der Virulenz einiger Bakterien zugeschrieben.^[96] Die essentiellen Funktionen von DegS, aber auch dessen Lokalisierung im Periplasma, die eine gute Zugänglichkeit gewährt, da für Interaktionen mit DegS nicht die Zellmembran durchquert werden muss, machen dieses Protein zu einem vielversprechenden, bisher jedoch wenig beachteten *Target* in der Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe. Mit der Inhibition von DegS würde es zu Aggregationen von fehlerhaften Proteinen im Periplasma kommen, was zu einer physischen Beeinträchtigung der Zellintegrität, den Verlust von wichtigen Funktionen und zu erhöhtem Zellstress führt. Die bakterielle Zelle würde letale Schäden erleiden.

In einer Kooperation mit dem *Lead Discovery Center* (LDC) in Dortmund wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit in *high throughput screenings* (HTSs), einem automatisierten *in vitro* Screeningsystem, eine aus ca. 185,000 niedermolekulare Verbindungen bestehende Substanzbibliothek auf eine Hemmung der DegS-Aktivität getestet. Als potentieller Inhibitor konnte dabei die Verbindung 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**1**) identifiziert werden, einer vom LDC synthetisierten Verbindung, die auch verschiedene Kinasen hemmt. Die Kernstruktur dieser Substanz wird von einem Pyrazolotriazin gebildet, welches mit drei funktionellen Gruppen modifiziert ist: einer Benzylamin-Gruppe (Gruppe A; Abb. 13, grün), einer 4-Aminopiperidin-Gruppe (Gruppe B; Abb. 13, blau) am Triazin-Ring und einer Isopropyl-Gruppe (Gruppe C; Abb. 13, rot) am Pyrazol-Ring.

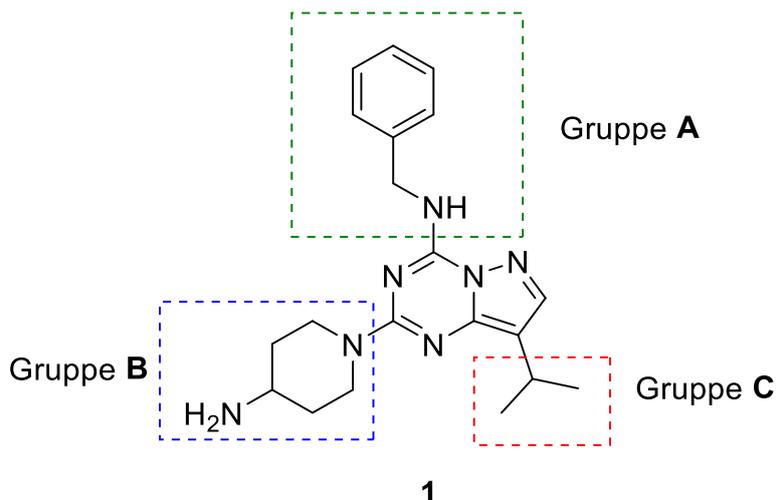


Abb. 13: Struktur des LDC-Inhibitors 1. Das Grundgerüst besteht aus einer Pyrazolotriazineinheit. Die drei funktionellen Gruppen sind farblich markiert. Dabei handelt es sich um eine Benzylamino-Gruppe (Gruppe A, grün), eine 4-Aminopiperidin-Gruppe (Gruppe B, blau) und eine Isopropyl-Gruppe (Gruppe C, rot).

Dieser LDC-Inhibitor, auch LDC043908 genannt, wurde in weiteren biochemischen Assays, einer Gel-basierten Analyse eines DegS-vermittelten Proteinabbaus und einem biochemischen pNA (*para*-Nitroanilin)-basierten Enzymassays getestet und dort eine leider nur moderate inhibitorisch wirksame Aktivität bei einer Konzentration von 200 μM festgestellt. Zum Vergleich weisen medizinisch-nutzbare Chemotherapeutika demgegenüber häufig Bioaktivitäten bei Konzentration im nM-Bereich auf.

Auf Basis dieser Verbindung sollten daher in dieser Arbeit Derivate synthetisiert werden, die zum einen Aufschluss über den bisher unbekanntem inhibitorischen Mechanismus geben sollten (Struktur-Wirkungsbeziehung) und zum anderen den relativ kleinen inhibitorischen Effekt der Ursprungsverbindung steigern sollten. Da über den Mechanismus der Inhibition keine Daten vorlagen, sollte zunächst durch Derivatisierung der einzelnen drei funktionellen Gruppen sowie des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts und anschließenden biologischen Assays deren jeweiliger Einfluss auf die inhibitorische Aktivität der Verbindung identifiziert und bewertet werden. Dies sollte erste Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehung liefern.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollten dann weitere Modifizierungen und Optimierungen, zur Verbesserung der inhibitorischen Wirkung aber auch im Hinblick auf die Spezifität des Inhibitors gegenüber DegS, durchgeführt werden. Denn neben der relativ schwachen Inhibition von DegS durch Verbindung **1** war diese, wie auch weitere bisher getestete strukturell verwandten Verbindungen, ein relativ starker Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs). Um niedermolekulare Verbindungen wie **1**

als Inhibitor von DegS und damit als potentiellen Wirkstoff gegen bakterielle Infektionskrankheiten in Betracht ziehen zu können, war sowohl eine Verbesserung der Inhibition von DegS sowie der Spezifität gegenüber *off-targets* wie z. B. Kinasen nötig.

Neben der Synthese eines potenten DegS-Inhibitors sollte zudem an einer Syntheseoptimierung gearbeitet werden, um eine schnellere und effizientere Synthese biologisch aktiver Derivate zu ermöglichen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Struktur des LDC-Inhibitors und Derivatisierungsmöglichkeiten

Bei der vom LDC entdeckten Verbindung 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**1**) handelt es sich um einen relativ schwachen DegS-Inhibitor. Der Kern dieser Verbindung besteht aus einem Pyrazolotriazin, an welchem drei funktionelle Gruppen substituiert sind: Eine Benzylamin-Gruppe (Gruppe A), die über das Amin am Triazin gebunden ist, eine 4-Aminopiperidin-Gruppe (Gruppe B), die über das sekundäre Amin am Triazin gebunden ist und einer Isopropyl-Gruppe (Gruppe C), die am Pyrazol gebunden ist. Über die Struktur-Wirkungsbeziehung war bisher nichts bekannt. Da keine Informationen über die Bindungsstelle vorlagen, bestand eine zusätzliche Herausforderung darin, das Molekül für einen Zweck zu optimieren, ohne Kenntnis darüber zu haben, wie und wo dieses überhaupt auf molekularer Ebene bindet.

Da es sich bei dieser Verbindung um kein Peptid handelt, bestand die Vermutung, dass es nicht im aktiven Zentrum von DegS bindet und es sich damit um einen allosterischen Hemmtyp handelt. Erst kürzlich konnte dies weitgehend bestätigt werden, da nachgewiesen werden konnte, dass es zu einer Konkurrenz um die allosterische Bindestelle von DegS zwischen diesen Inhibitoren und Aktivatorpeptiden kommt.^[112]

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss der einzelnen Strukturelemente untersucht, aus denen sich das Molekül zusammensetzt. Hierzu wurden Derivate mit unterschiedlichen Gruppen am Pyrazolotriazin synthetisiert, es wurden aber auch Veränderungen am Pyrazol-Kern vorgenommen. Ziel war es, auf der einen Seite die Relevanz der einzelnen Komponenten für die DegS-Aktivität zu bestimmen und auf der anderen Seite zu erfahren, wie die Komponenten modifiziert werden müssen, um die DegS-Aktivität zu erhöhen. Aufgrund der wenigen Informationen über die molekulare Wirkungsweise dieses Inhibitors konnte im Vorfeld keine Aussage darüber gemacht werden, ob ein hydrophiler, ein hydrophober, ein polarer, ein langkettiger oder ein kleiner Rest den inhibitorischen Effekt der Verbindung **1** verbessert. Daher sollten zunächst mehrere Derivate mit unterschiedlichen Gruppen in Position A-C synthetisiert werden, um einen Einblick in die Struktur-Wirkungsbeziehung zu bekommen und anschließend fokussiert an der richtigen Position an der Optimierung des Inhibitors zu arbeiten. Zusätzlich sollte gezielt an der Bestimmung der präzisen Binde-

stelle des Inhibitors gearbeitet werden. Im Zuge dessen wurde ein Azid-Derivat synthetisiert und mittels Photocrosslinking analysiert.

Das Modifizieren der drei Gruppen bzw. des Pyrazol-Rings geschah in unterschiedlichen Stufen der Synthese. Eine Modifizierung der Benzylamin-Gruppe oder der 4-Aminopiperidin-Gruppe geschah vergleichsweise spät in der Synthese. Dabei handelt es sich um eine einfache Substitutionsreaktion. Um die Isopropylgruppe am Pyrazol-Ring oder den Pyrazol-Ring selbst zu varriieren, musste bereits direkt zu Beginn der Synthese mit den entsprechenden Reagenzien gearbeitet werden.

4.2 Synthese des LDC-Inhibitors und Derivaten

Für die Synthese der in dieser Arbeit hergestellten unterschiedlichen Derivate wurde ein Syntheschema verwendet. Dieses soll im Folgenden genauer beschrieben werden.

4.2.1 Synthese des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts

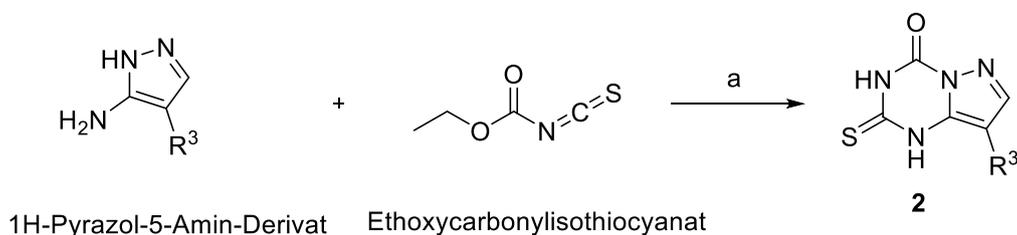


Abb. 14: Synthese des bityklischen Rings 2. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i) DCM, rt, 2 h; ii) K₂CO₃, ACN, 90 °C, 2 h.

Der erste Schritt zur Synthese von **1** und dessen Derivaten war der Aufbau des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts. Dazu wurde ein 1H-Pyrazol-5-Amin, mit einem gewünschten Rest in Position 4, beispielsweise 4-Isopropyl-1H-Pyrazol-5-Amin, mit Ethoxycarbonylisothiocyanat umgesetzt (Abb. 14). Der Rest R³ bildet somit die Gruppe C in dem finalen Inhibitor. Mechanistisch addiert die freie Aminogruppe am Pyrazol zuerst nukleophil am Kohlenstoffatom des Thiocyanats, sodass sich die erste kovalente Bindung ausbildet. Im zweiten Schritt greift das sekundäre Amin des Pyrazols dann nukleophil am Carbonyl-Kohlenstoff der Esterfunktion an, sodass es unter Abspaltung von Ethanol zu einem Ringschluss kommt.

Somit wird bereits in der ersten Stufe der Synthese das Grundgerüst für den Pyrazolotriazin-Kern etabliert und die Gruppe C integriert. Im Gegensatz zu den Gruppen A und B wurde Gruppe C somit nicht durch eine Substitution an dem Molekül eingeführt, sondern befindet sich bereits am Pyrazol-Ring, aus dem das Grundgerüst aufgebaut wird. Das bedeutet: Um diese Gruppe zu variieren, wurde das entsprechende 1H-Pyrazol-5-Amin, mit einem gewünschten Rest R in Position 4, kommerziell erworben, so dass die Synthese von Derivaten der Gruppe C an die kommerziell-erhältlichen 1H-Pyrazol-5-Amin-Derivate gebunden war. Für die Derivate mit einem anderen Grundgerüst, beispielsweise einem Triazol-Ring statt einem Pyrazol-Ring (siehe Verbindung **35**), galt diese Einschränkung ebenfalls; auch hier musste die Modifizierung der Gruppe C direkt im ersten Schritt der Synthese eingeführt werden. Aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen in späteren Stufen wurden bei der Synthese von Derivaten der Gruppe C zusätzliche Einschränkungen gemacht, da chemische Modifikationen, die unter den in späteren Stufen verwendeten Reaktionsbedingungen nicht stabil waren, auch nicht als Ausgangssubstanzen verwendet wurden.

Trotz dieser Einschränkungen bei der Substratwahl verlief die Synthese dabei sehr gut, so dass die Rohprodukte dieser Stufe in LC/MS- und NMR-Analysen bereits so rein waren, dass sie ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Stufe umgesetzt werden konnten.

4.2.2 Methylierung des Schwefels

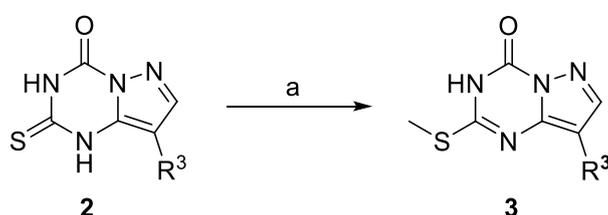


Abb. 15: Methylierung des Schwefels. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) MeI, 2 M NaOH, EtOH, 0 °C → rt, 18 h.

In der nächsten Stufe wurde eine Methylierung des Schwefels durchgeführt. Als Methylierungsreagenz wurde Methyljodid unter basischen Bedingungen eingesetzt. Die Base sorgt für die Deprotonierung des Schwefels, der dann in einer S_N2-Reaktion das Methyljodid angreift. Der Vorteil von Methyljodid ist, dass es bei Raumtemperatur

flüssig ist, während Methylbromid und Methylchlorid gasförmig vorliegen und damit schwer zu handhaben sind. Von den Halogenidionen besitzt Iodid die geringste Basizität, sodass es unter den Halogenidmethanen, aufgrund der leichten Verdrängbarkeit der Methylgruppe, mit Abstand am reaktivsten ist. Die hohe Reaktivität hat eine hohe Toxizität zur Folge, denn Methyljodid ist sogar in der Lage, DNA zu methylieren. Da Methyljodid bei dieser Reaktion im Überschuss eingesetzt wurde, wurde daher nicht-umgesetztes Methyljodid zunächst mit Ammoniak gequenchet, bevor die Aufarbeitung und Reinigung erfolgte. Die Reaktion verlief bei den umgesetzten Verbindungen mit relativ guten Ausbeuten zwischen 77 und 95 %.

4.2.3 Phosphorylierung und Substitutionsreaktion zur Einführung der Gruppe A

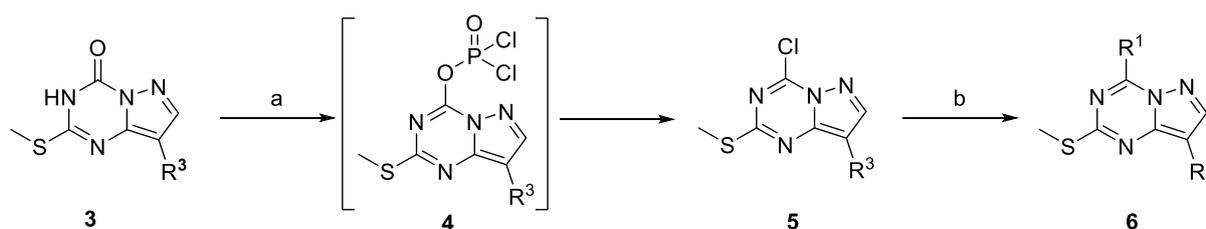


Abb. 16: Einbringung der funktionellen Gruppe R¹. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) POCl₃, N,N-Diethylanilin, 90 °C, 3-18 h. (b) Benzylamin-Derivat, DIPEA, ACN, rt, 18 h.

Um im nächsten Schritt eine funktionelle Gruppe in Position A einzubringen, musste zunächst eine gute Abgangsgruppe generiert werden (Abb. 16). Dazu wurde eine Chlorierung der Carbonylgruppe durchgeführt. Als Reagenz und Lösungsmittel wurde Phosphorylchlorid und als Base das tertiäre Amin N,N-Diethylanilin eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 90 °C durchgeführt. Durch die Zugabe des starken Elektrophils Phosphorylchlorid kommt es unter basischen Bedingungen zunächst zur Bildung eines Phosphat-Intermediates **4**. Das während der Phosphorylierung entstandene N,N-Diethylanilin-Hydrochlorid liefert im nächsten Schritt das benötigte Chlorid-Ion zur Bildung des Endprodukts. Dabei kommt es zur Substitution des Di-Chloro-Phosphats durch das Chlorid.^[113]

Mittels LC/MS-Analysen wurden Reaktionskontrollen durchgeführt, nach denen sich, in Abhängigkeit vom Substrat, Reaktionszeiten zwischen 3 und 18 Stunden ergaben. Bei einigen Reaktionen konnte nach einigen Stunden kein weiterer Umsatz des Edu-

ktes **3** zum Chlorid **5** beobachtet werden, sodass mit einem Gemisch aus Edukt und Produkt weitergearbeitet werden musste. Da es sich bei der Phosphorylierung um eine exotherme Reaktion handelt,^[113] für die weitere Umsetzung zum Chlorid das Reaktionsgemisch jedoch erhitzt werden musste, könnte es sein, dass die exotherme Reaktion in einigen Ansätzen eine weitere Bildung des Phosphat-Intermediates **4** unterdrückte. Die chlorierten Produkte **5** sind zudem, wiederum in Abhängigkeit vom Substrat, Hydrolyse-empfindlich. Mittels LC/MS-Analysen konnte für einige Verbindungen, die nach Beenden der Reaktion und Trocknen am Hochvakuum nicht umgehend weiter umgesetzt wurden, eine Rückbildung nach einigen Tagen zum Edukt **3** beobachtet werden. Daher wurde die Reaktion im Allgemeinen so durchgeführt, dass über Reaktionskontrollen der Fortschritt der Reaktion beobachtet wurde, um dann nach dem gewünschten Substratumsatz lediglich das Lösungsmittel zu entfernen, das Rohprodukt am Hochvakuum für einige Stunden zu trocknen und es dann direkt weiter umzusetzen. Das Rohprodukt bestand dabei größtenteils aus einem Produkt/Edukt-Gemisch. Da die Carbonylverbindung **3** jedoch keine unerwünschten Nebenreaktionen mit den Benzylamin-Derivaten in der nächsten Stufe eingehen konnte, konnte das Rohproduktgemisch aus der Chlorierung nach Trocknung einfach weiter umgesetzt werden.

Bei chemisch-reaktiven Seitenketten in Position C, beispielsweise einer Cyanogruppe, verlief die Reaktion unter Bildung teilweise komplexer Produkt-Gemische. Aufgrund der Instabilität des chlorierten Produktes **5** mussten aber auch diese komplexen Rohproduktgemische direkt weiter umgesetzt werden. In der Tat gehörte dieser Reaktionsschritt aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen, der Anfälligkeit für Nebenreaktionen und der Instabilität der Produkte zu den limitierenden Faktoren bei der Auswahl möglicher Derivate für Gruppe C und führte zu den größten Ausbeuteverlusten in der Reaktionssequenz zur Darstellung der finalen Produkte.

In der nächsten Stufe fand die Substitution des Chlorids mit einem Benzylamin-Derivat (Gruppe A) statt. Unter basischen Bedingungen wurde ein Benzylamin-Derivat im Überschuss hinzugegeben. Die Base Diisopropylethylamin (DIPEA) katalysiert die nukleophile Substitution, indem es zunächst selbst das Chlorid substituiert wodurch sich ein Ammoniumchlorid-Intermediat bildet, welches anschließend mit dem primären Amin des Benzylamin-Derivates zum Produkt **6** reagiert. Die Reaktion wurde über Nacht bzw. mehrere Tage (zwischen 17 und 72 Stunden) bei Raumtemperatur durchgeführt. Mittels Säulenchromatographie wurde das Produkt **6** von den

hauptsächlich während der Chlorierung aufgetretenen Nebenprodukten, sowie der nicht-reagierten Carbonylverbindung **3** und dem in dieser Reaktion im Überschuss eingesetzten Benzylamin-Derivat getrennt. Die kommerziell erworbenen Benzylamin-Derivate, sowie ein selbst synthetisiertes Benzylamin-Derivat mit einer funktionellen Gruppe in *meta*-Position, konnten erfolgreich umgesetzt werden. Die Ausbeuten über 2 Stufen (Chlorierung und Substitution (Abb. 16)) fielen mit Werten zwischen 17 und 83 % sehr unterschiedlich aus. Die stark schwankenden Ausbeuten sind dabei wahrscheinlich auf die unterschiedliche Stabilität und Anfälligkeit für Nebenreaktionen während der Chlorierung zurückzuführen.

4.2.4 Oxidation des Thioethers

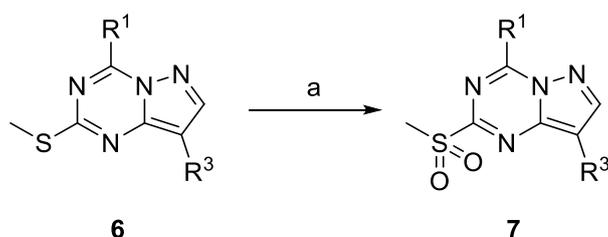


Abb. 17: Oxidation des Thioethers 6 zum Sulfon 7. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) mCPBA, DCM, rt, 1 h.

Durch die Oxidation des Thioethers **6** zu einem Sulfon **7** (Abb. 17) wird eine gute Abgangsgruppe für die anschließende Substitution generiert. Hierzu wurde *meta*-Chlorperbenzoesäure (*meta-chloroperbenzoic acid*, mCPBA), eine Persäure, als Oxidationsmittel eingesetzt. Die Oxidation erfolgt in zwei Stufen. Zunächst wird der Thioether zu einem Sulfoxid oxidiert: Der Schwefel greift den terminalen Sauerstoff der Peroxid-Gruppe an und spaltet dabei *meta*-Chlorperbenzoesäure ab, die in dem verwendeten Lösemittel Dichlormethan unlöslich ist. Im zweiten Schritt erfolgt analog dazu, erneut unter Freisetzung von *meta*-Chlorperbenzoesäure, die Oxidation vom Sulfoxid zum Sulfon **7**. Um die Säure aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, wurde dieses mit verdünnter Natronlauge gewaschen. In einigen Testansätzen mit 9.3-14.8 μmol eines Thioethers **6** konnte keine Oxidation oder nur eine teilweise Oxidation zum Sulfoxid beobachtet werden. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu 70 h sowie eine Erhöhung der Menge des Oxidationsmittels hatten keinen Einfluss auf die Reaktionsumsetzung. Nur durch leichtes Erwärmen auf maximal 40 °C, dem

Siedepunkt des Lösungsmittels Dichlormethan, konnte in Reaktionsansätzen dieser Größenordnung eine Umsetzung bis zum Sulfon beobachtet werden. Interessanterweise konnte das Problem der unvollständigen Oxidation jedoch in den Standard-Ansätzen (ab einem Reaktionsansatz von 76 μmol) nicht beobachtet werden. Die Reaktion zum Sulfon verlief hier sehr effizient, sodass nach der Aufarbeitung gemäß den durchgeführten LC/MS- und NMR-Analysen nicht gereinigt werden musste und das Sulfon direkt weiter umgesetzt werden konnte. Die Ausbeuten lagen in einem Bereich zwischen 86 und 96 %. Für das Isoindol-Derivat **130** (mit 4-Methoxyisoindolin als Gruppe A) wurde, möglicherweise wegen des kleineren Ansatzes von 47 μmol , jedoch nur eine geringere Ausbeute von 59 % erhalten.

4.2.5 Substitution der Sulfon-Gruppe und Generierung der Gruppe B

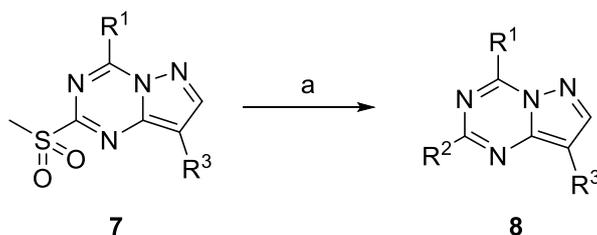


Abb. 18: Substitution der Methylsulfon-Gruppe und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Aminopiperidin-Derivat, NMP, 120 °C, 18 h.

Die letzte Stufe zur Synthese des LDC-Inhibitors **1** und dessen Derivate war die Substitution der Methylsulfon-Gruppe durch ein Aminopiperidin-Derivat (Gruppe B) (Abb. 18). Die Reaktion wurde bei 120 °C in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) als Lösungsmittel durchgeführt. Wurde als Aminopiperidin-Derivat ein 4-Dimethylamino-Piperidin eingesetzt, konnte nach der Substitution das Produkt gereinigt werden und lag für die biologischen Untersuchungen bereit.

Für die meisten Derivate wurde jedoch ein 4-Aminopiperidin als Gruppe B eingesetzt, welches dann über das sekundäre Amin am Pyrazolotriazin gebunden ist. Da bei der ungeschützten Form des 4-Aminopiperidins sowohl das primäre als auch das sekundäre Amin in der Lage sind, das Methylsulfon zu substituieren, musste ein Boc-geschütztes Aminopiperidin, 4-*N*-Boc-Aminopiperidin, als Edukt eingesetzt werden. Dadurch wurde gewährleistet, dass nur das ungeschützte sekundäre Amin die Substitution durchführte. Durch den Einsatz von Boc-geschützten Derivaten verlängerte

sich die Synthese um eine Stufe, nämlich die anschließende Abspaltung der Schutzgruppe.

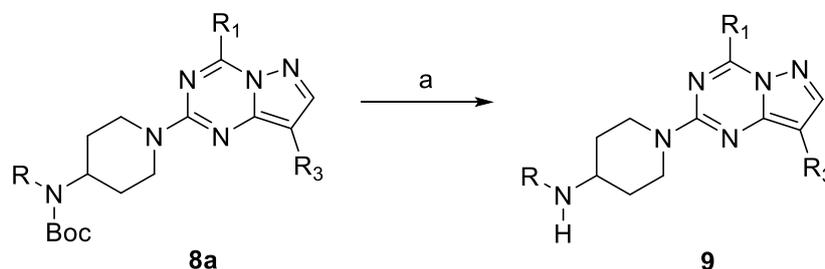


Abb. 19: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe. Wurden Boc-geschützte Amine zur Substitution der Methylsulfon-Gruppe eingesetzt, musste anschließend eine Abspaltung der Schutzgruppe durchgeführt werden. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) TFA, rt, 2 h.

Nach der Substitution musste daher die säurelabile Boc-Gruppe mit Trifluoroessigsäure (*trifluoroacetic acid*, TFA) abgespalten werden (Abb. 19). Die Endprodukte wurden vom Lösungsmittel befreit und konnten mittels präparativer HPLC in reiner Form dargestellt werden. Die Ausbeuten für die letzte Stufe, inklusive der Boc-Abspaltung für die Derivate, lagen für die meisten Verbindungen über 70 %. Lediglich das Azid-Derivat konnte nur mit einer Ausbeute von 2.8 % isoliert werden. Die hohe Temperatur während der Substitution oder die stark sauren Bedingungen während der Boc-Abspaltung könnten zur Zersetzung des Azids geführt haben, wodurch die niedrige Ausbeute zu erklären wäre.

4.2.6 Synthese von Benzylamin-Derivaten

Für die Synthese der Benzylamin-Derivate wurden Alkylierungen an einem 3-(Boc-aminomethyl)phenol durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde Aceton verwendet und als Base Kaliumcarbonat eingesetzt. Als Alkylierungsmittel wurden die entsprechenden Alkylhalogenide, hier Benzylbromid (Reaktionsschema Abb. 20) und Iodoethan eingesetzt.

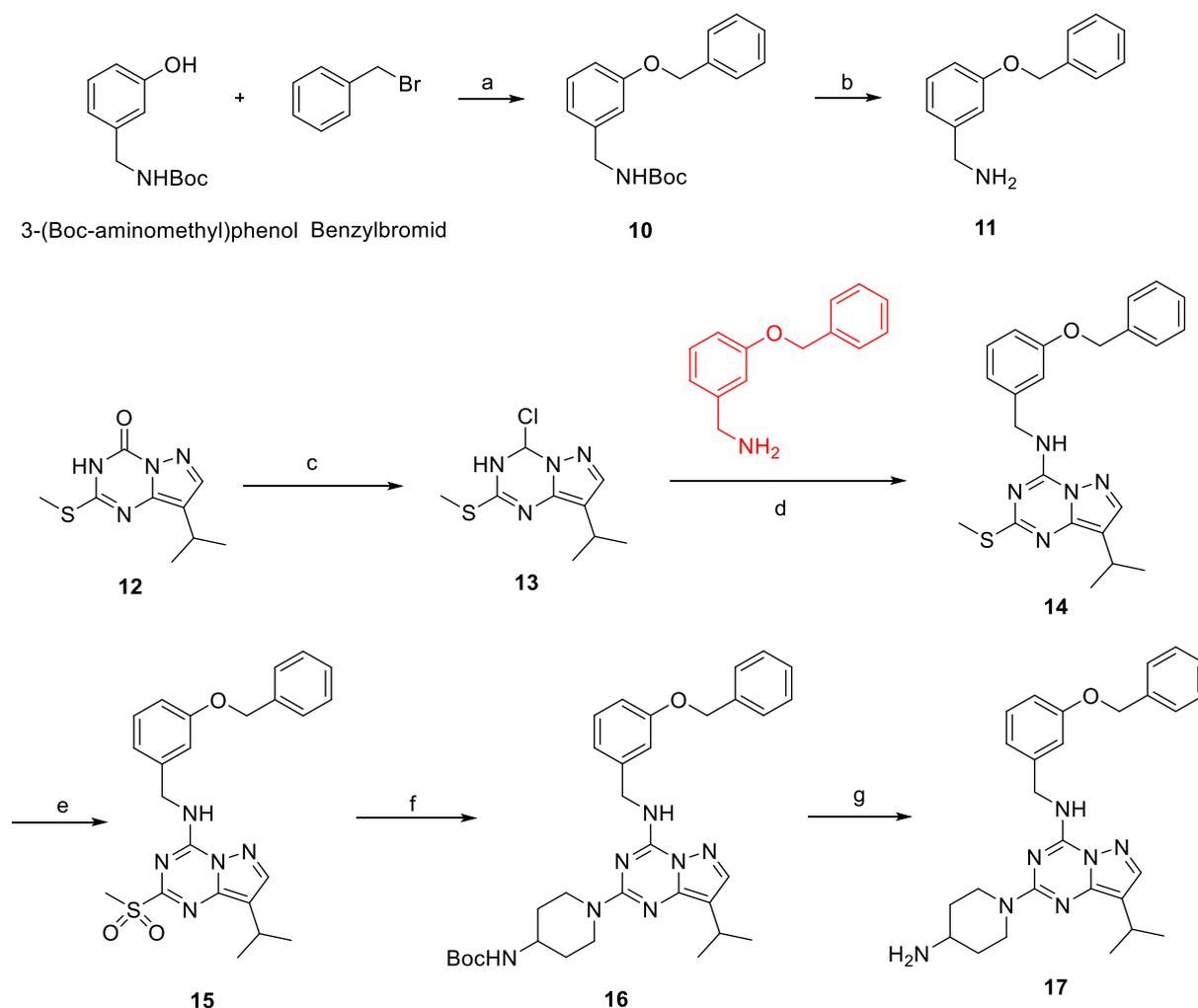


Abb. 20: Synthese eines Benzylamin-Derivates (11) und dessen Verwendung in der Synthesesequenz. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) K_2CO_3 , Aceton, rt, 18 h, 90.9 %. (b) TFA, rt, 2 h, 99,5 %. (c) $POCl_3$, N,N-Diethylanilin, 90 °C, 3-18 h. (d) DIPEA, ACN, rt, 18 h, 41 % über 2 Stufen. (e) mCPBA, rt, 2 h, 86 %. (f) 4-(N-Boc-Amino)Piperidin, NMP, 120 °C, 18 h. (g) TFA, rt, 2 h, 83 % über 2 Stufen.

Durch die basischen Bedingungen wird der Alkohol deprotoniert, der anschließend mit dem Alkylhalogenid zum Produkt reagiert. Das dabei entstandene Kaliumhalogenid fiel als unlösliches Salz aus und konnte in der Aufarbeitung durch Waschen mit wässrigen Lösungen entfernt werden. Das Boc-geschützte Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt und konnte in guten Ausbeuten von über 90 % als Öl gewonnen werden. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte in Trifluoroessigsäure. Die Säure wurde mit Toluol koevaporiert, sodass möglichst keine Säurerückstände im Rohprodukt zurückblieben, da diese in der anschließenden Umsetzung unter basischen Bedingungen stören würden. Die bei der Abspaltung entstandenen Produkte Isobuten und Kohlenstoffdioxid sind flüchtig, sodass es zu keiner Verunreinigung des Produktes kam und daher keine weitere Reinigung nötig war. Die

Ausbeuten waren quantitativ. Die Benzylamin-Derivate wurden dann in der Substitution zur Einbringung der Gruppe A (Abb. 16) eingesetzt. Dabei wurden jedoch zunächst keine oder nur schlechte Umsätze mit Ausbeuten zwischen 4.1 % (für das *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**14**)) und 6.6 % (für das *N*-(3-ethoxybenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**135**)) erhalten. Möglicherweise wurde nicht genügend Base verwendet, um das nach der Boc-Abspaltung als TFA-Salz vorliegende Produkt zu deprotonieren. Denn für die Substitution wird das freie Amin benötigt. Daher wurde die Reaktion aus Abb. 20 mit Benzylbromid wiederholt und das Produkt **11**, nach Abspaltung der Boc-Gruppe durch 4 M Salzsäure in Dioxan, wässrig aufgenommen und mit verdünnter Natronlauge behandelt, bis ein basischer pH von 11 erreicht wurde. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert, wodurch das freie Amin in einer Ausbeute von 63 % erhalten werden konnte. In der anschließenden Substitutionsreaktion konnte daraufhin eine Ausbeute in Höhe von 41 % des reinen Produktes **14** erhalten werden.

4.3 Synthetisierte Derivate und deren biologische Evaluation

Anhand der Derivate, die während dieser Arbeit hergestellt und in biologischen Assays von Jens Bongard (AG Ehrmann, Universität Duisburg-Essen) getestet wurden, und den Derivaten, die bereits zuvor am LDC getestet wurden, konnte ein erster Eindruck über den Einfluss des Grundgerüsts und der Gruppen A-C auf die biologische Aktivität von DegS gewonnen werden. Bei den hierzu durchgeführten biologischen Assays handelte es sich um Gel-basierte Analysen des DegS-vermittelten Abbaus von RseA. Hierzu wurde das Enzym DegS in einem Puffer mit einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Derivats und einem Aktivator Peptid (Boc-FFF-OH) vorinkubiert und anschließend das zu verdauende Substrat RseA hinzugegeben. Zu definierten Zeitpunkten fand eine Probenentnahme statt. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) durchgeführt. Die aufgetrennten Peptide im Polyacrylamid-Gel wurden dann mit Coomassie Brilliantblau R 250 eingefärbt. Anhand dieser Gele ist es möglich, den zeitlichen Verlauf des Verdauens zu beobachten und eine Aussage über die DegS-Aktivität in Gegenwart der Inhibitoren zu machen. Das Protein DegS, welches für den Verdau von RseA zuständig ist, bleibt über den Versuch erhalten. Das Substrat RseA

wird von aktivem DegS verdaut, daher ist in den Gelen das Verschwinden von RseA und dafür das Auftauchen verschiedener Abbauprodukte zu beobachten. Wird DegS inhibiert, findet kein Verdau von RseA statt, daher bleibt es erhalten und es entstehen auch keine Abbauprodukte, die in den Gelen sichtbar wären. Im RseA-Proteolyse-Assay mit DegS und dem ursprünglichen Inhibitor **1** konnte eine Inhibition von DegS ab einer Inhibitor-Konzentration von $> 200 \mu\text{M}$ festgestellt werden (Abb. 21). Eine komplette Inhibition war bei einer Konzentration von $400 \mu\text{M}$ sichtbar.

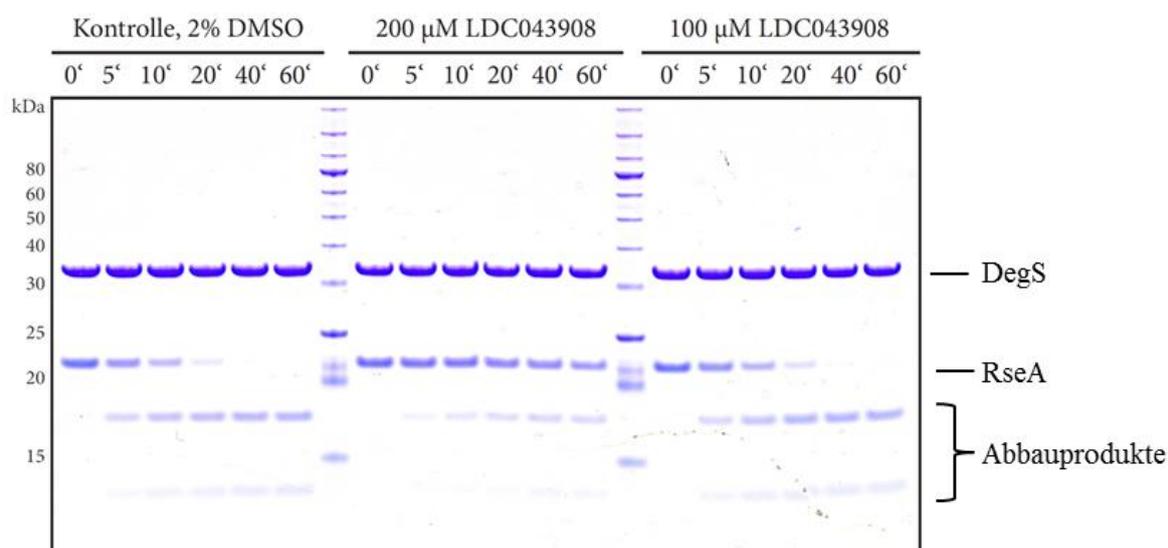


Abb. 21: RseA-Proteolyse-Assay mit dem ursprünglichen LDC-Inhibitor 1. Der Assay wurde in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ RseA, $5 \mu\text{M}$ DegS, $50 \mu\text{M}$ Boc-FFF-OH; Pufferbedingungen: $150 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 8.3), 380 mM NaCl und 10% Glycerin durchgeführt.

Basierend auf den Ergebnissen des RseA-Proteolyse-Assays mit den unterschiedlichen Derivaten konnten Inhibitoren mit einer um ein Vielfaches höheren Aktivität gegenüber DegS aus den Synthesen aufgefunden werden. Im Folgenden wird auf die biologische Relevanz der einzelnen funktionellen Gruppen genauer eingegangen, außerdem werden die Ergebnisse verschiedener biologischer Assays vorgestellt.

4.3.1 Derivate der Gruppe A

4.3.1.1 RseA-Proteolyse-Assays mit DegS

Die Derivate der Gruppe A wurden durch Substitution des Chlorids, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, in das Molekül eingebracht. Bei allen in dieser Arbeit und vom LDC synthetisierten Derivaten von Gruppe A handelt es sich um Gruppen, die über einen Stickstoff an das Pyrazolotriazin gebunden sind (Abb. 22).

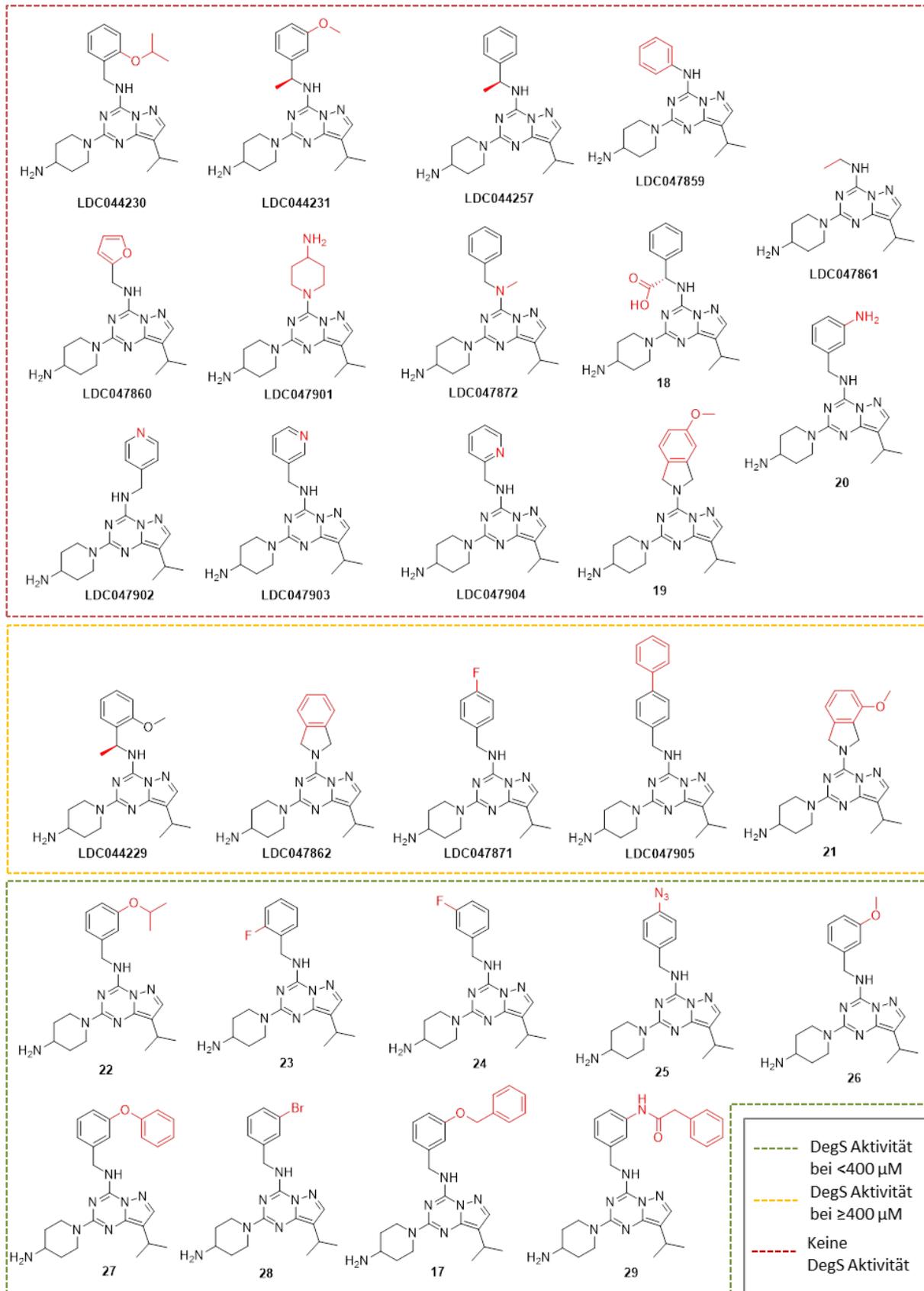


Abb. 22: Graphische Einteilung der Gruppe A-Derivate nach ihrer DegS-Aktivität. Die Einteilung erfolgte durch Auswertung der RseA-Proteolyse-Assays. Rot: Derivate zeigten keinerlei Inhibition. Orange: Derivate zeigten eine schwache DegS-Inhibition. Grün: Derivate zeigten eine bessere DegS-Inhibition als der ursprüngliche Inhibitor vom LDC.

Die vom LDC synthetisierten Derivate zeigten keine bis eine geringe Inhibition von DegS in den *in vitro* RseA-Proteolyse-Assays.

Derivate, denen die Benzylgruppe komplett fehlte und beispielsweise nur über eine Aminoalkylkette (LDC047861) oder ein 4-Aminopiperidin (LDC047901) verfügten, zeigten keinerlei Inhibition von DegS. Doch auch kleine Veränderungen wie zusätzliche Methylgruppen (LDC044257 oder LDC047872) oder die Substitution eines Kohlenstoffatoms im aromatischen Ring durch ein Stickstoffatom (LDC047902, LDC047903 oder LDC047904) führten zum kompletten Verlust der DegS-Inhibition. Modifizierungen am benzylichen Kohlenstoff (d. h. zwischen dem Pyrazolotriazin und dem Benzol) wie das Einbringen eines anionischen Restes (**18**) zeigten auch keinen positiven Effekt (Abb. 23). Im RseA-Proteolyse-Assay fand bis einschließlich einer Konzentration von 1000 μM **18** keine Inhibition statt. Man kann daher von einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirkung sprechen.

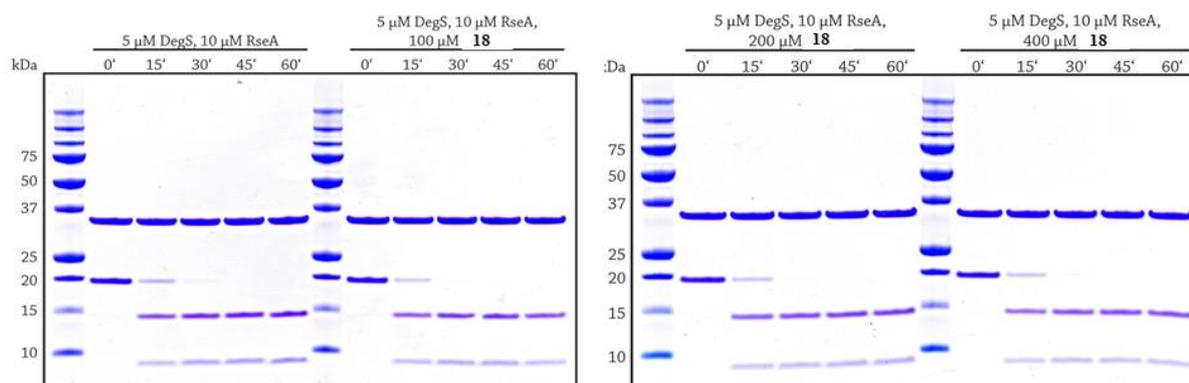


Abb. 23: RseA-Proteolyse-Assays mit Verbindung 18. Der Assay wurde in Gegenwart von 10 μM RseA, 5 μM DegS, 50 μM Boc-FFF-OH; Pufferbedingungen: 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl, 10 % Glycerin durchgeführt. In der Kontrollprobe wurde statt einem Inhibitor DMSO eingesetzt. Bis zu einer Konzentration von 400 μM fand keine Inhibition statt.

Bei einigen Derivaten konnte zwar eine inhibitorische Aktivität festgestellt werden (Abb. 22, orange), allerdings war diese nicht oder nur unwesentlich höher als bei dem ursprünglichen Inhibitor **1** vom LDC.

Bei den Derivaten, die in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position am Benzyl-Rest einen zusätzlichen Substituenten hatten, konnte jedoch eine signifikant bessere Inhibition im RseA-Proteolyse-Assay beobachtet werden. Mit den Derivaten **23**, **24** und LDC047871, die in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position ein Fluor substituiert hatten, konnte zudem ein direkter Vergleich des biologischen Einflusses der einzelnen Positionen am Ring durchgeführt werden. Alle drei Verbindungen inhibierten DegS, wie in

den RseA-Proteolyse-Assays zu sehen war, jedoch zeigten die Derivate mit Resten in *ortho*- und *meta*-Position (**23** und **24**) einen wesentlich größeren Effekt mit einer Inhibition bei einer Konzentration ab 100 μM (Abb. 24, links). Bei Verbindung **24** war in den Gelen sogar eine geringfügig stärkere Inhibition ab < 100 μM zu sehen (Abb. 24, rechts), sodass das Derivat mit einem Fluor-Rest in *meta*-Position am Benzyl-Rest der bis dahin stärkste Inhibitor war.

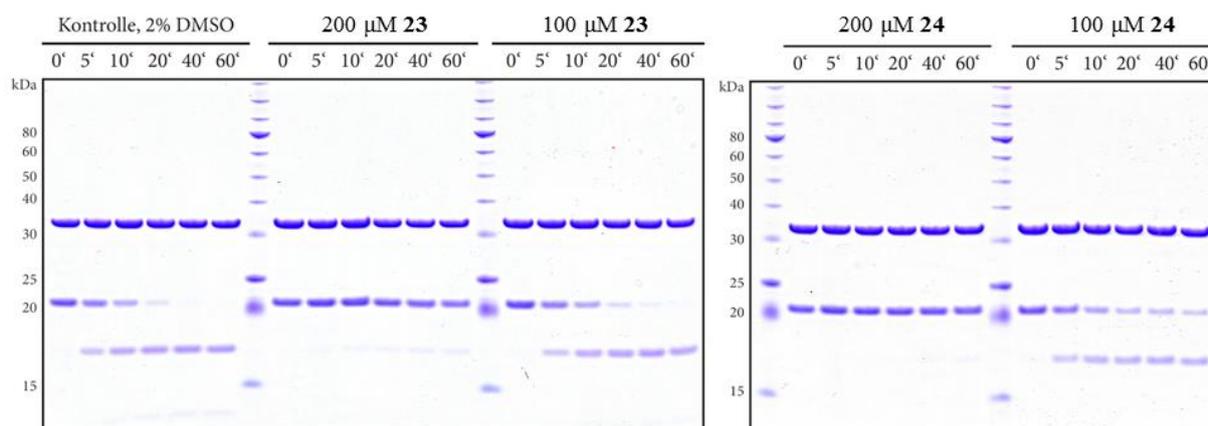


Abb. 24: RseA-Proteolyse-Assays mit den Inhibitoren 23 und 24. Der Assay wurde in Gegenwart von 10 μM RseA, 5 μM DegS, 50 μM Boc-FFF-OH; Pufferbedingungen: 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl, 10 % Glycerin durchgeführt. In der Kontrollprobe wurde statt einem Inhibitor DMSO eingesetzt. Nach über 20 min wurde das Substrat RseA (ca. 20 kDa) von DegS (ca. 32 kDa) vollständig verdaut (Abbauprodukte ca. 17 kDa). Bei 200 μM **23** oder **24** wurde der Abbau komplett inhibiert, daran zu erkennen, dass keine Abbauprodukte entstanden. Ab 100 μM **23** oder **24** ließ die Wirkung nach und RseA wurde langsam abgebaut. **24** ist jedoch aktiver, da bei 100 μM nach 60 min noch immer RseA (ca. 20 kDa) vorhanden war.

Anscheinend verbessern Reste in *meta*-Position den inhibitorischen Effekt des ursprünglichen Inhibitors (**1**). Um diese Vermutung zu unterlegen, wurden weitere Derivate mit unterschiedlich großen Resten in *meta*-Position am Benzyl-Rest synthetisiert (**22**, **26**, **27** und **28**) und biologisch getestet. Alle Derivate waren im RseA-Proteolyse-Assay um ein vielfaches aktiver als der ursprüngliche Inhibitor. Das Derivat mit einer Phenoxy-Gruppe am Benzyl-Rest (**27**) zeigte im RseA-Proteolyse-Assay eine Inhibition bei einer Konzentration ab < 50 μM . Die Derivate mit einer Methoxy- und Isopropoxy-Gruppe (**26** und **22**) waren ab 50 μM und ab 100 μM aktiv.

Um den Effekt von hydrophilen Substituenten in *meta*-Position am Benzyl-Rest zu bestimmen, wurde ein Derivat dargestellt, das in *meta*-Position eine polare Amino-Gruppe besaß (**20**). Im RseA-Proteolyse-Assay zeigte dieses Derivat keine Inhibition. Daher kann davon ausgegangen werden, dass zur Verbesserung der inhibitorischen Wirkung tatsächlich eine große unpolare Gruppe vorhanden sein muss.

Im nächsten Schritt wurden Derivate synthetisiert, die über einen etwas längeren Linker zwischen der Benzylgruppe und dem unpolaren Rest in *meta*-Position besaßen (**17** und **29**). Dadurch bekommt der unpolare Rest eine gewisse Flexibilität, die ihm möglicherweise erlaubt, noch besser mit der Bindestelle an DegS zu interagieren. Die *in vitro*-Experimente zeigten wieder eine Verbesserung der Inhibition. Verbindung **17** zeigte im RseA-Proteolyse-Assay bei einer Konzentration von 2.5 μM noch immer eine Inhibition (Abb. 25). Die unpolaren Gruppen am Molekül führten jedoch zu einer schlechteren Löslichkeit in dem verwendeten Puffer für den RseA-Proteolyse-Assay. Erst bei einer Konzentration von $\leq 6.25 \mu\text{M}$ löste sich der Inhibitor **17** vollständig. Für biochemische Inhibitionsassays stellte die unpolare Gruppe zunächst nur ein Problem der Löslichkeit und damit auch der exakten Konzentrationsbestimmung bei höher-konzentrierten Lösungen dar. In *in vivo*-Experimenten könnte dies jedoch Löslichkeitsprobleme bei der Applikation geben.

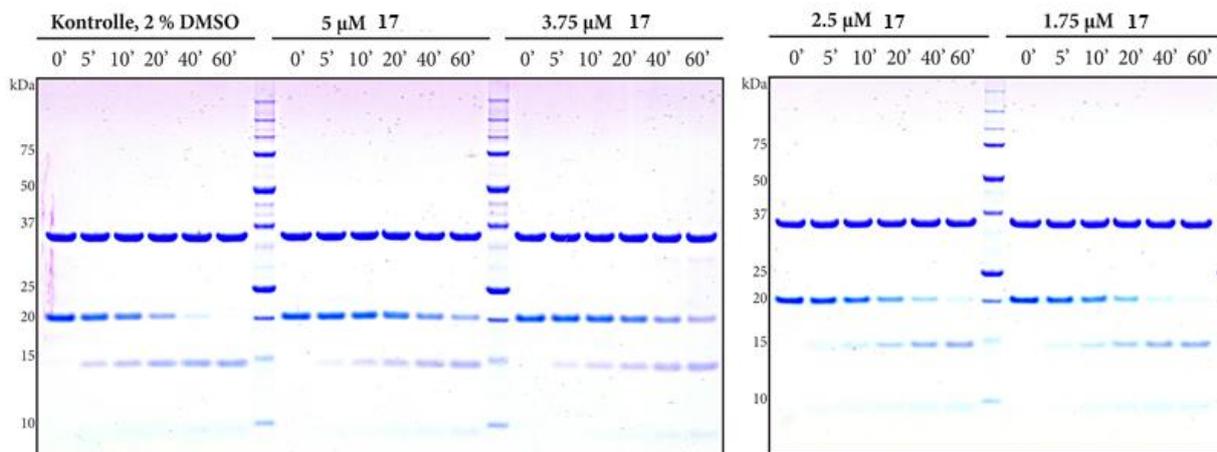


Abb. 25: RseA-Proteolyse-Assays mit dem Inhibitor 17. Der Assay wurde in Gegenwart von 10 μM RseA, 5 μM DegS, 50 μM Boc-FFF-OH; Pufferbedingungen: 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl, 10 % Glycerin durchgeführt. In der Kontrollprobe wurde statt einem Inhibitor DMSO eingesetzt. Bis 2.5 μM war eine Inhibition zu erkennen.

Die Ergebnisse der biochemischen Experimente zeigten, dass Variationen der Gruppe A vom ursprünglichen Inhibitor zielführend sein können, sofern der benzylische Kohlenstoff als auch der Benzolring erhalten bleiben. Durch die Substitution von flexiblen, unpolaren Gruppen in *meta*-Position am Benzyl-Rest konnte eine signifikante Verbesserung der inhibitorischen DegS-Wirkung beobachtet werden. Die Substitution durch polare Reste wirkte sich dagegen negativ auf die Inhibition aus. Anscheinend besteht somit an dieser Stelle ein großes Potential für die Verbesserung der inhibitorischen Wirkungen gegenüber DegS.

4.3.1.2 Weiterführende Experimente

Nach den ersten Untersuchungen der Inhibitoren in den RseA-Proteolyse-Assays wurden für die meisten Inhibitoren IC_{50} -Hemmwerte (Tab. 1) bestimmt, sowie zusätzlich *E. coli*-Wachstumskurven für die aktivsten Inhibitoren mittels Zellkulturexperimenten aufgenommen. Die IC_{50} -Werte wurden am LDC mittels eines HTRF (*homogeneous time-resolved fluorescence*)-Assays bestimmt. Eine verringerte Aktivität von Inhibitoren in biologischen Assays ist nicht unüblich, da der Inhibitor z. B. aufgrund einer höheren Affinität gegenüber anderen zellulären Proteinen nur in geringer Konzentration an das eigentliche Protein DegS binden kann oder weil der Inhibitor beispielsweise nicht in der Lage ist, durch die äußere Zellmembran zu diffundieren und an DegS zu binden. Daher ist bei den Gel-Analysen zu bedenken, dass die biochemischen Ergebnisse lediglich einen ersten Eindruck vermitteln, der gegebenenfalls *in vivo* nicht bestätigt werden könnte.

In der folgenden Tabelle (Tab. 1) sind die in dieser Arbeit synthetisierten Derivate der Gruppe A und deren DegS-Aktivitäten in den RseA-Proteolyse-Assays sowie die IC_{50} -Werte aus den HTRF-Assays, sofern diese bestimmt worden sind, zusammengefasst. Verbindung **17** war mit einer sichtbaren Inhibition bis 2.5 μ M in den RseA-Proteolyse-Assays der vielversprechendste Inhibitor. Der IC_{50} -Wert war mit 51.7 μ M fast 3-mal niedriger als der des ursprünglichen Inhibitors mit 150 μ M. Es ist offensichtlich, dass im biochemischen RseA-Proteolyse-Assays eine stärkere Verbesserung der Hemmwirkung beobachtet wird als im HTRF-Assay. Die Ursache hierzu ist jedoch unklar. Der beste Inhibitor **17** ist allerdings mit einem IC_{50} -Wert von 5 nM auch ein sehr potenter Kinase-Inhibitor.

Tab. 1: Biochemische Hemmdaten der Gruppe A-Derivate.

Verbindung	Inhibition im RseA-Proteolyse-Assay [μM]	IC_{50} -Wert [μM]
1	ab 200	150
17	bis 2.5	51.7
18	keine	n. d.
19	keine	n. d.
20	keine	n. d.
21	400*	n. d.
22	ab 100	n. d.
23	ab 100	134
24	ab < 100	141
25	ab 50	166
26	ab 50	n. d.
27	ab < 50	n. d.
28	bis 25	n. d.
29	ab 100	n. d.

Daten zu den RseA-Proteolyse-Assays wurden von Dr. Jens Bongard (AG Ehrmann, Universität Duisburg-Essen) und die IC_{50} -Werte vom LDC per HTRF-Assays generiert. Für Verbindungen, bei denen keine Bestimmung des IC_{50} -Wertes durchgeführt wurden, wurde n. d. (nicht durchgeführt) eingetragen, mit * markierte Werte zeigten bis zu dieser Konzentration einen Effekt, Experimente mit höheren Verdünnungen stehen noch aus.

Um einen Eindruck vom Verhalten der Inhibitoren in bakteriellen Zellkulturen zu bekommen, wurden Wachstumsversuche in *E. coli*-Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Inhibitors durchgeführt. Durch die stündliche Bestimmung der optischen Dichte (OD) als Maß für die Zelldichte kann das Wachstum der Bakterien beobachtet werden.

In den Wachstumsversuchen (Abb. 26) mit den Inhibitoren **26** und **27** bleibt die optische Dichte und damit die Zelldichte ab einer bestimmten Konzentration konstant niedrig. Das bedeutet, dass bei 100 μM **26** und bei 50 μM **27** kein Bakterienwachstum mehr stattfindet.

Der ursprüngliche Inhibitor **1** zeigte in den gleichen Wachstums-Experimenten eine Halbierung des Wachstums ab einer Konzentration von etwa 200 μM und erst bei höheren Konzentrationen (die nächsthöhere Konzentration war in diesem Versuch 400 μM) eine komplette Hemmung des Wachstums. Das bedeutet, dass der hier synthetisierte Inhibitor mit einer Phenoxy-Gruppe in *meta*-Position am Benzylring (**27**)

mit einer wachstumshemmenden Wirkung ab 50 μM mindestens um ein 4-faches besser inhibiert als der ursprüngliche Inhibitor.

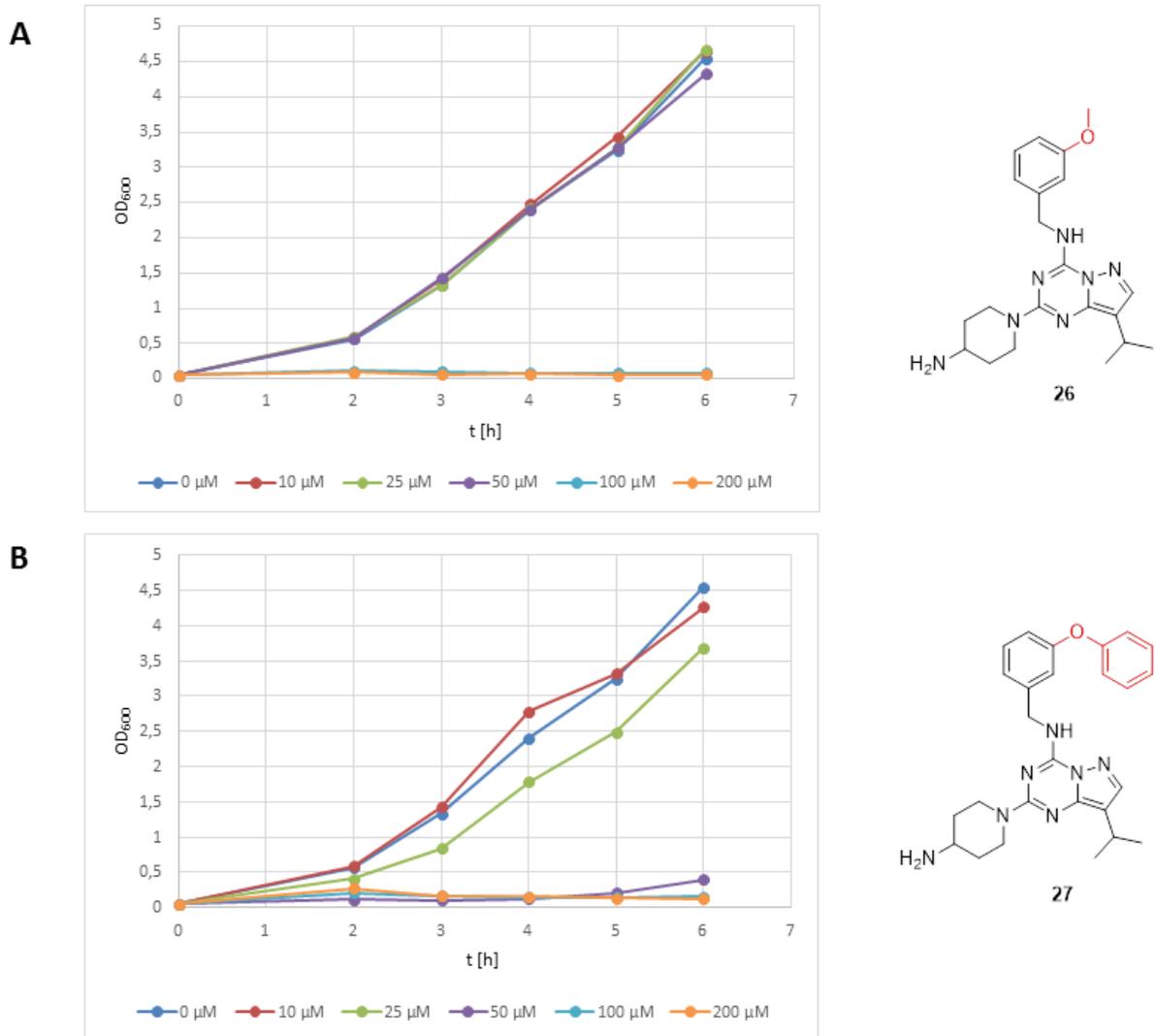


Abb. 26: Wachstumskurven von CAG16037 (WT-Stamm) in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor-Konzentrationen. (A) Wachstumskurven mit dem Inhibitor **26**. (B) Wachstumskurven mit dem Inhibitor **27**.

Damit bestätigt sich die Beobachtung aus den biochemischen Hemmexperimenten, dass Gruppe A entscheidenden Einfluss auf die Inhibitor-Aktivität nimmt und dass ein Rest in *meta*-Position sehr effektiv ist. Ein Vergleich dieser Reste lässt zudem den Schluss zu, dass ein großer unpolarer Rest (Vergleich von Phenoxy- und Methoxy-Gruppe) die größte Verbesserung für die Hemmung von DegS darstellt.

4.3.1.3 Verbesserung der DegS-Spezifität

Neben der Verbesserung der DegS-Inhibition sollte auch die Spezifität für DegS erhöht werden. Der ursprüngliche Inhibitor sowie die Derivate, die durch die Modifizierung von Gruppe A entstanden sind, sind Pyrazolotriazine und gehören damit zu einer Klasse von Molekülen, die für ihre gute Hemmung von humanen Kinasen bekannt ist.^[114-116] Die molekularen Interaktionen der Inhibitoren mit den verschiedenen Kinasen wurde mittels Co-Kristallisation und anschließender Röntgenstrukturanalysen untersucht. Es kommt zur Ausbildung von Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen bestimmten Aminosäuren der Kinasen und der Aminogruppe des Benzylamin-Restes sowie zwischen der Kinase und einem Stickstoffatom des Pyrazol-Rings (Abb. 27).^[117, 118] Die ursprüngliche Verbindung zeigte für die Kinasen CDK1, CDK2, CDK7 und CDK9 (*cyclin-dependent kinase*, CDK) eine besonders gute Inhibition mit IC₅₀-Werten im einstelligen µM-Bereich (CDK 1) bis einstelligen nM-Bereich (CDK7 und CDK9). Um die Inhibition von Kinasen zu schwächen, wurden daher Derivate synthetisiert, die statt einer Benzylamin-Gruppe eine Isoindol-Gruppe in Position A besitzen. Dadurch wird das freie Amin des Benzylamins, das zuvor eine Wasserstoff-Brücken-Bindung eingehen konnte, blockiert und die Interaktionen mit der Kinase möglicherweise geschwächt. Da aus den biologischen Untersuchungen der vorherigen Derivate bereits bekannt war, dass eine große hydrophobe Gruppe in *ortho*- oder *meta*-Position die Inhibition von DegS begünstigen, wurden zwei Derivate mit einer 5-Methoxy-2,3-Dihydro-1H-Isoindol-Gruppe (**19**) und einer 4-Methoxy-2,3-Dihydro-1H-Isoindol-Gruppe (**21**) in Position A synthetisiert (Abb. 27).

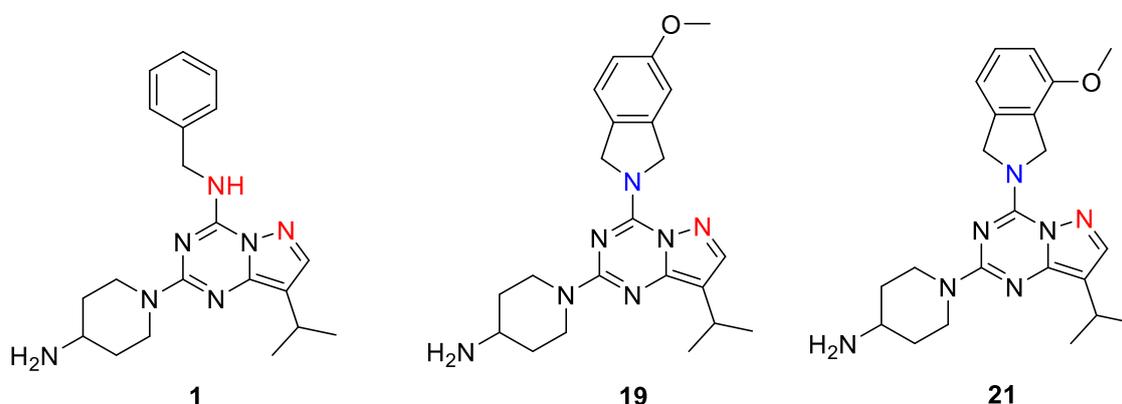


Abb. 27: Der LDC-Inhibitor und die Isoindol-Derivate. Rot markierte Atome interagieren mit Kinasen über eine Wasserstoff-Brücken-Bindungen. Blau markierten Atomen sind so Modifiziert, dass sie nicht mehr in der Lage sein sollten mit Kinasen zu Interagieren.

Bisher wurden nur erste biochemische RseA-Proteolyse-Assays durchgeführt. Die Aktivität gegenüber verschiedenen Kinasen wurden noch nicht getestet, daher kann vorerst keine Aussage darüber gemacht werden, ob eine derartige Modifizierung der Benzylamin-Gruppe zu einer Verringerung der Affinität gegenüber verschiedener Kinasen führt.

Verbindung **19** zeigte in den RseA-Proteolyse-Assays keine Inhibition. Verbindung **21** zeigte eine komplette Hemmung bei 400 μM . In nächsten Versuchen muss daher eine Titration zeigen, ob **21** auch bei geringeren Konzentrationen aktiv gegenüber DegS ist. Wenn gleichzeitig in biologischen Untersuchungen gezeigt werden kann, dass **21** keine oder zumindest eine geringere Hemmung gegenüber Kinasen ausübt als der ursprüngliche Inhibitor (**1**), kann von einem Fortschritt in der Verbesserung der Spezifität gesprochen werden.

4.3.1.4 DegS Inhibitoren in Kombination mit anderen Antibiotika

Während dieser Arbeit wurde eine Kooperation mit der Schweizer Firma BioVersys etabliert, die an der Entwicklung niedermolekularer Verbindungen arbeitet, die die immer häufiger auftretenden Resistenzen von Bakterienstämmen gegenüber existierenden Antibiotika ausschalten sollen. Der ursprüngliche Inhibitor sowie zwei in dieser Arbeit synthetisierte Inhibitoren wurden auf synergistische Effekte mit bereits etablierten Antibiotika getestet. Zunächst wurde die minimale Hemm-Konzentration (*minimal inhibitory concentration, MIC*) von *E. coli* (ATCC 25922) für ausgewählte Antibiotika (Tab. 2) sowie der synthetisierten Inhibitoren (Tab. 3) bestimmt. Bei der minimalen Hemm-Konzentration handelt es sich um die niedrigste Konzentration einer Verbindung, bei der das sichtbare Wachstum eines Bakteriums verhindert wird. Im Anschluss wurde für jedes Antibiotikum eine Konzentration bestimmt, die den akzeptierten CLSI-Bereich nicht überschreitet und die keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* mehr hatte.

Tab. 2: Minimale Hemm-Konzentrationen auf *E. coli* (ATCC 25922) verschiedener Antibiotika (durchgeführt von BioVersys).

Antibiotikum	MIC [$\mu\text{g/ml}$]	Akzeptierter CLSI Bereich* [$\mu\text{g/ml}$]	Konzentration für die Tests mit den DegS-Inhibitoren [$\mu\text{g/ml}$]
Colistin	0.25	0.03 – 0.25	0.03 = 1/8 MIC
Vancomycin	> 256	–	-
Gentamycin	≤ 0.25 oder 0.5	0.25 – 1	0.13 = 1/4 MIC
Penicillin G	128	–	16 = 1/8 MIC
Tetracyclin	1	0.5 – 2	0.06 = 1/16 MIC
Ciprofloxacin	0.008	0.004 – 0.015	0.001 = 1/8 MIC
Erythromycin	128	–	8 = 1/16 MIC
Chloramphenicol	4	2 – 8	0.5 = 1/8 MIC
Rifampicin	8	4 – 16	1 = 1/8 MIC

* Vom CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) festgelegte geltende Standards für die Sensibilitätstestung gegenüber Antibiotika.

Die minimale *E. coli*-Hemm-Konzentration der DegS-Inhibitoren wurde sowohl für den ursprünglichen Inhibitor (**1**) sowie für die getesteten Inhibitoren 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-isopropyl-*N*-(3-methoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**26**) und 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-isopropyl-*N*-(3-phenoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**27**) auf > 200 μM bestimmt.

Im nächsten Schritt wurde die minimale Hemm-Konzentration der Inhibitoren in Kombination mit den verdünnten MICs der acht Antibiotika bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass in Kombination mit sieben der acht Antibiotika die minimale Hemm-Konzentration identisch mit den minimalen Hemm-Konzentrationen der reinen DegS-Inhibitoren war. Hier fand durch Kombination demnach keine Verbesserung der inhibitorischen Wirkung gegenüber *E. coli* statt. Nur in Kombination mit dem Antibiotikum Colistin (0.03 $\mu\text{g/ml}$ = 1/8 MIC) war eine signifikante Reduzierung der minimalen Hemm-Konzentration für alle getesteten Inhibitoren zu beobachten (Tab. 3). Es scheint daher einen Synergieeffekt zwischen den DegS-Inhibitoren und Colistin zu geben. Colistin gehört zu den Polymyxinen und wird auch Polymyxin E genannt. Es besteht aus einem Heptapeptid-Ring, der sich aus einem Gemisch aus D- und L-Aminosäuren zusammensetzt (Abb. 28). Als Antibiotikum greift es die Membran von Gram-negativen Bakterien an. Zunächst kommt es zu elektrostatischen Interaktionen mit der äußeren Membran, indem sich Colistin in die Doppellipidschicht einfügt, dort

anreichert und zur Auflösung der äußeren Membran führt.^[119, 120] Anschließend erreicht es das Periplasma, wo es weiter mit der zytoplasmatischen Membran interagiert und zu einer erhöhten Permeabilität der Zellhülle führt. Der antibiotische Effekt wird jedoch nicht dieser induzierten Zellpermeabilität zugeschrieben, da schon bei geringeren Konzentrationen von Colistin das Wachstum der Bakterien gehemmt wird.^[121]

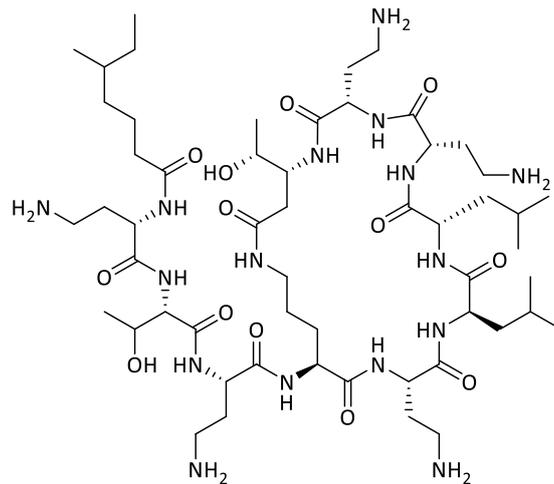


Abb. 28: Chemische Struktur des Antibiotikums Colistin.

Allerdings könnte die Auflösung der äußeren Zellmembran und die damit einhergehende Erhöhung der Zellpermeabilität eine Erklärung für den Synergieeffekt der DegS-Inhibitoren und des Colistin sein. Bereits in den RseA-Proteolyse-Assays konnte eine schlechte Löslichkeit einiger Derivate aufgrund der Vielzahl hydrophober Gruppen beobachtet werden. Auch bei der Bestimmung der MICs wurden mit über 200 μM vergleichsweise hohe Konzentrationen bestimmt. Das bestätigt die Vermutung, dass die Inhibitoren die äußere Zellmembran nur schlecht überwinden können. Bereits geringe Mengen Colistin (1/8 der minimalen Hemm-Konzentration), die keinen signifikanten biologischen Effekt zeigen, scheinen die äußere Zellmembran jedoch so weit zu schädigen, dass die Inhibitoren diese passieren und ins Periplasma eindringen können. Dort können sie dann mit dem *Target* DegS interagieren und das Wachstum von *E. coli* hemmen.

Tab. 3: Minimale Hemm-Konzentration der reinen DegS-Inhibitoren und in Kombination mit 1/8 MIC Colistin auf *E. coli* (ATCC 25922).

Verbindung	IC ₅₀ -Wert [µM]	DegS Inhibitor MIC [µM]	DegS Inhibitor MIC [µM] mit 1/8 MIC Colistin
1	150	> 200	50
26	n. d.	> 200	100
27	n. d.	> 200	12.5

n. d. = nicht durchgeführt

Aufgrund der guten synergistischen Effekte in *E. coli* wurden einige Pathogene aus den sogenannten ESKAPE-Organismen getestet um das Aktivitäts- und Synergie-Spektrum zu bestimmen. Zu den ESKAPE-Pathogenen gehören *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter species*.^[122] Sie gehören zu den Bakterien, die den größten Anteil der Krankenhausinfektionen verursachen, sie verbreiten sich zunehmend in Krankenhäusern und zeigen außerdem eine wachsende Resistenz gegenüber bekannten Antibiotika.^[123]

Analog zu den Experimenten mit *E. coli* wurde für jedes Pathogen je die minimale Hemm-Konzentration des DegS-Inhibitors und von Colistin bestimmt. Anschließend wurden die Verbindungen kombiniert, um Aufschluss über mögliche Synergieeffekte in den einzelnen Pathogenen zu bekommen. In *K. pneumoniae*, *E. cloacae* und *A. baumannii* agieren die Inhibitoren synergistisch mit Colistin. Dieser Effekt ist beim Inhibitor **27** am stärksten ausgeprägt. Die exakten Daten können der Tab. 4 entnommen werden. Darüber hinaus konnte sogar ein synergistischer Effekt von Inhibitor **27** mit Colistin in Colistin-resistenten *A. baumannii*-Isolaten beobachtet werden. In *P. aeruginosa* waren die Inhibitoren sowie die Kombinationen der Inhibitoren mit 1/8 MIC Colistin weniger aktiv bzw. inaktiv und es konnte kein Synergieeffekt beobachtet werden.

Tab. 4: Effekte der DegS-Inhibitoren 1, 26 und 27 auf verschiedene Pathogene.

Pathogen		Inhibitor		
		1	26	27
<i>A. baumannii</i>	MIC Colistin = 0.5 µg/ml			
	1/8 MIC Collistin = 0.0625 µg/ml			
	MIC Inhibitor [µM]	> 200	> 200	> 200
	Kombinierter MIC* [µM]	100	50	12.5
<i>E. cloacae</i>	MIC Colistin = 0.5 µg/ml			
	1/8 MIC Collistin = 0.0625 µg/ml			
	MIC Inhibitor [µM]	> 200	> 200	> 200
	Kombinierter MIC [µM]	25	25	≤ 3.125
<i>K. pneumoniae</i>	MIC Colistin = 0.5 µg/ml			
	1/8 MIC Collistin = 0.0625 µg/ml			
	MIC Inhibitor [µM]	> 200	> 200	> 200
	Kombinierter MIC [µM]	100	100 oder 200	25
<i>P. aeruginosa</i>	MIC Colistin = 0.5 µg/ml			
	1/8 MIC Collistin = 0.0625 µg/ml			
	MIC Inhibitor [µM]	> 200	> 200	> 200
	Kombinierter MIC [µM]	> 200	> 200	> 200

* Zur Bestimmung der kombinierten MICs wurden die Inhibitoren mit 1/8 der MICs von Colistin versetzt.

4.3.2 Derivate der Gruppe B

Die Derivate der Gruppe B wurden durch Substitution der Sulfon-Gruppe am Pyrazolotriazin durch ein Nukleophil, wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, hergestellt. Im ursprünglichen Inhibitor vom LDC befindet sich in dieser Position ein über das sekundäre Amin gebundenes 4-Aminopiperidin. Bei den Derivaten wurden unterschiedliche Gruppen substituiert, die jedoch ausnahmslos zum kompletten Verlust jeglicher Inhibition von DegS in den biochemischen RseA-Proteolyse-Assays führten. Sowohl eine Substitution von strukturell ähnlichen Heterozyklen (LDC043784, LDC044405, LDC045624 oder LDC047867), der Einbau einer Art Linker zwischen den Heterozyklen und dem Pyrazolotriazin (LDC047868 oder LDC047869), die eventuell für eine höhere Flexibilität hätten sorgen können, sowie strukturell sehr kleine Veränderun-

gen wie zusätzliche Methyl-Gruppen am primären Amin (**30** und **31**) waren nicht zielführend. Eine Veränderung der Gruppe B zur Verbesserung der inhibitorischen Wirkung scheint daher nicht möglich. Es scheint, dass der Aufbau dieser Gruppe essenziell für den Bindungs- und/oder Wirkungs-Mechanismus des Inhibitors ist.

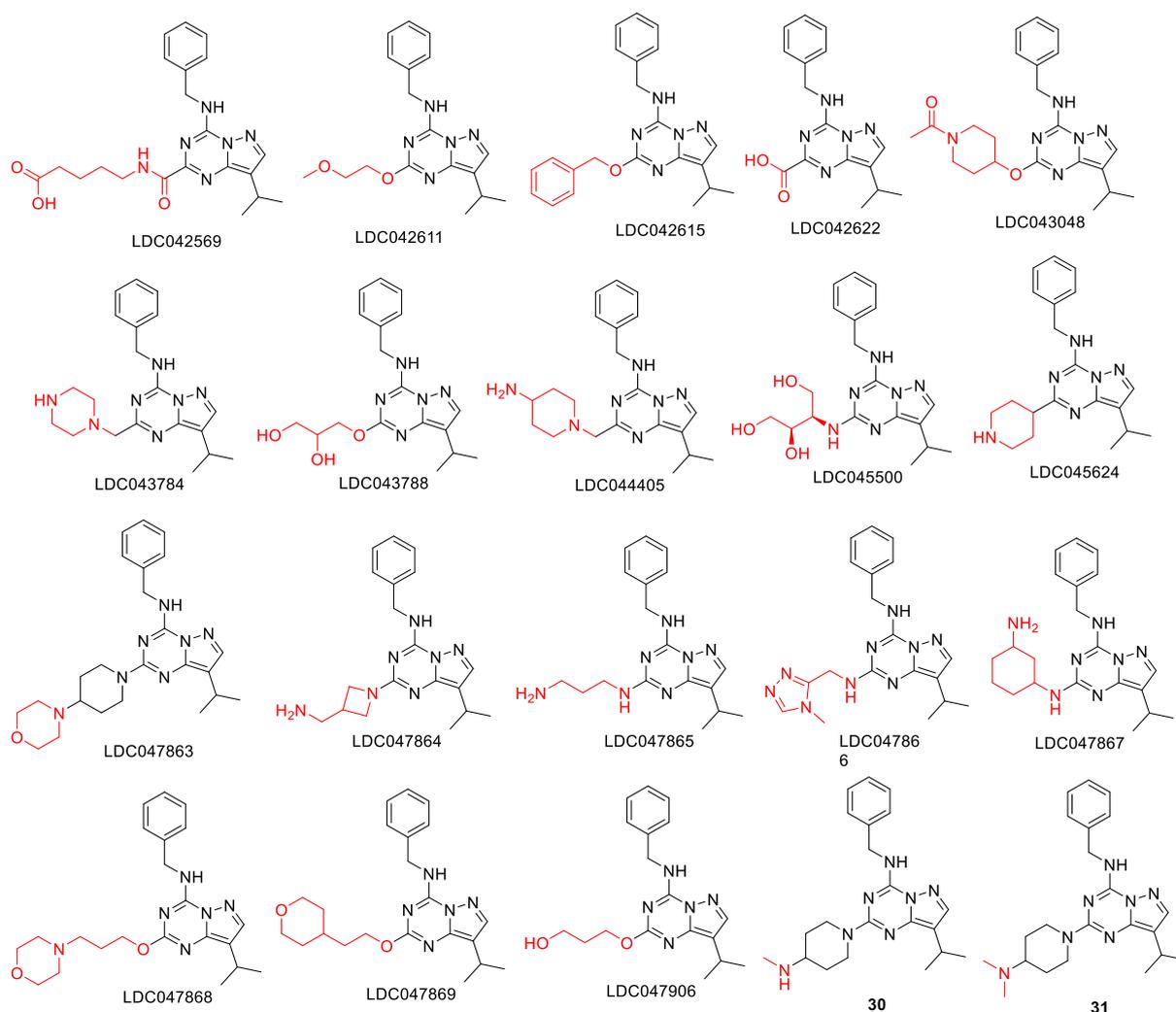


Abb. 29: Derivate der Gruppe B. Strukturelemente, die im Vergleich zum ursprünglichen Inhibitor variiert wurden, sind rot markiert.

4.3.3 Derivate der Gruppe C und des Pyrazol-Grundgerüsts

4.3.3.1 RseA-Proteolyse-Assays mit DegS

Zur Einbringung spezieller Gruppen in Position C am Pyrazolotriazin musste das entsprechende 1H-Pyrazol-5-amin mit der gewünschten Gruppe C in Position 4 am Pyrazol kommerziell erworben werden. Die Gruppe C befindet sich am Edukt zur Bildung des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts und muss daher bereits zu Beginn der Syn-

these eingeführt werden. Dadurch musste für jedes Derivat ein anderes Edukt in der ersten Stufe eingesetzt werden. Zudem musste die Gruppe C über die gesamte Synthese stabil sein. Spätestens unter den harschen Bedingungen der Chlorierung hatten sich jedoch einige Derivate zersetzt. Das schränkte die Derivate größtenteils auf Verbindungen mit Alkyl- und Aryl-Resten ein. Darüber hinaus fand eine Modifizierung des Grundgerüsts statt. Statt eines Pyrazols wurde ein Triazol eingesetzt, welches in Position 5 statt in Position 4 einen Alkyl-Rest hatte (**35**).

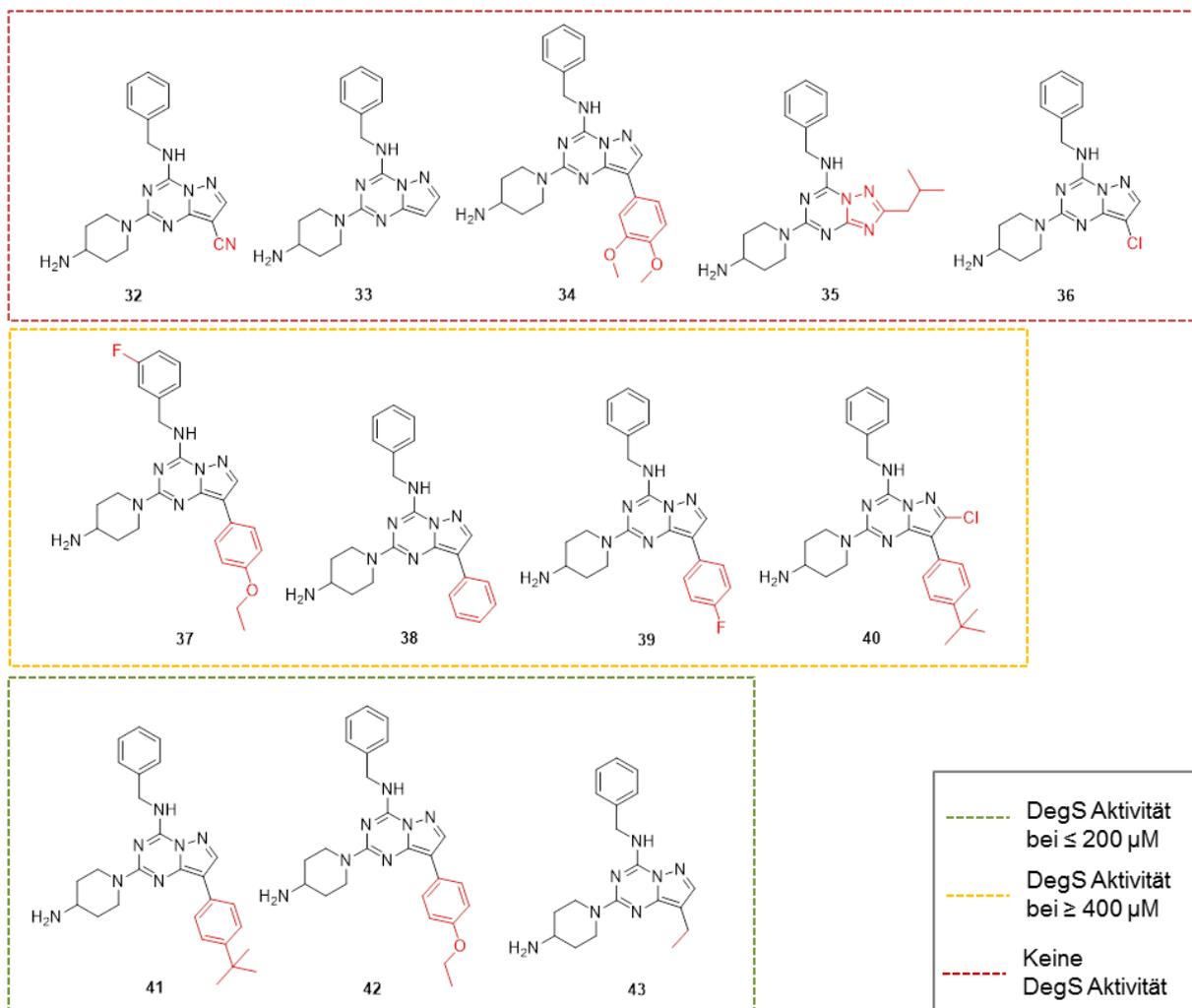


Abb. 30: Graphische Einteilung der Gruppe C-Derivate nach ihrer DegS-Aktivität. Einteilung erfolgte nach der Inhibition im RseA-Proteolyse-Assay. Rot: Derivate zeigten keinerlei Inhibition. Orange: Derivate zeigten eine schwache DegS-Inhibition. Grün: Derivate zeigten eine ähnliche bis bessere DegS-Inhibition als der ursprüngliche Inhibitor vom LDC.

Zunächst wurde untersucht, wie sich der Ersatz dieser Gruppe durch ein einfaches Wasserstoffatom auf die DegS-Hemmung auswirkt. Dazu wurde das Derivat 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**33**) synthetisiert. Im RseA-Proteolyse-Assay zeigte sich ein kompletter Verlust der inhibitorischen Wir-

kung gegenüber DegS. Daher war davon auszugehen, dass Gruppe C und dessen Struktur ebenfalls relevant für die Wirkung von DegS ist. Kleinere Veränderungen wie das Einbringen einer Ethyl-Gruppe statt der ursprünglichen Isopropyl-Gruppe hatte keinen Effekt zur Folge. Es konnte keine Verbesserung, aber auch keine signifikante Verschlechterung des Inhibitors beobachtet werden. In weiteren Ansätzen wurden größtenteils aromatische Reste in Position C eingebracht. Die Ergebnisse variierten stark, abhängig von der Größe und Anzahl der Substituenten am Aromaten. Ein Phenyl-Ring in Position C (**38**) zeigte einen inhibitorischen Effekt, der jedoch erst bei einer Konzentration ab 400 μM sichtbar war. Ein Fluor-Substituent in *para*-Position am Aromaten (**39**) zeigte die gleiche Aktivität wie der unsubstituierte Phenyl-Rest. Bei einem doppelt-substituierten Aromaten (**34**) wurde hingegen keine hemmende Wirkung mehr festgestellt. Allerdings waren zwei einfach-substituierte Aromaten sogar um ein vielfaches aktiver als der ursprüngliche Inhibitor. Die Verbindung 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**42**) zeigt bei bis zu einer Konzentration von 200 μM einen inhibitorischen Effekt. Auch das Derivat 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**41**) (Abb. 31) mit einer inhibitorischen Wirkung ab 50 μM ist um etwa 4-mal aktiver als der ursprüngliche Inhibitor.

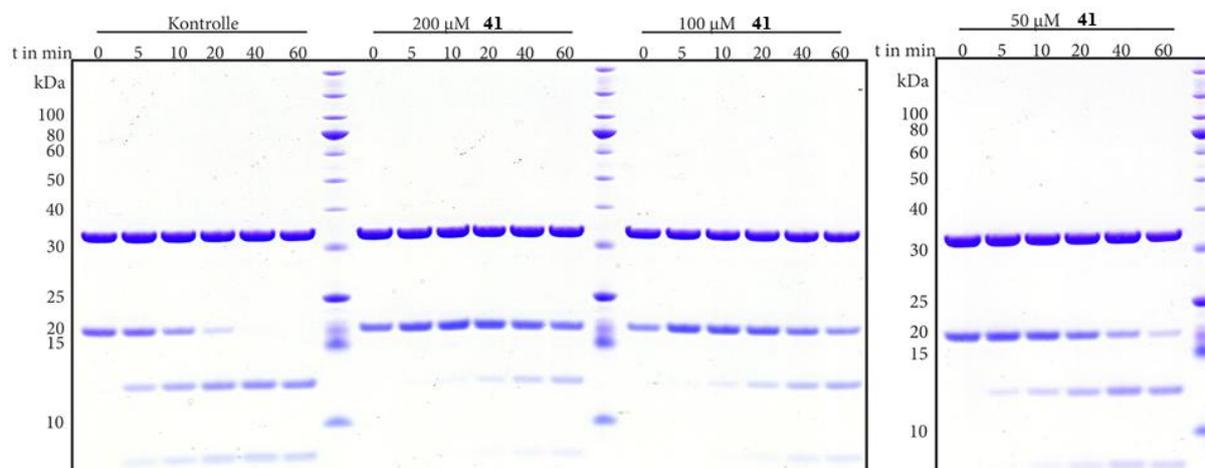


Abb. 31: RseA-Proteolyse-Assays mit dem Inhibitor 41. Der Assay wurde in Gegenwart von 10 μM RseA, 5 μM DegS, 50 μM Boc-FFF-OH; Pufferbedingungen: 150 mM NaH_2PO_4 (pH 8.3), 380 mM NaCl, 10 % Glycerin durchgeführt. In der Kontrollprobe wurde statt einem Inhibitor DMSO eingesetzt. Bis 50 μM war eine Inhibition zu erkennen.

Anders als bei Gruppe B besteht bei der Derivatisierung von Gruppe C demnach das Potential, den Inhibitor zu verbessern. Substituierte Aromaten scheinen einen positiven Einfluss zu haben, sofern sie nicht mehrfach-substituiert sind. Die hier syntheti-

sierten und getesteten Derivate besitzen ausschließlich Substituenten in *para*-Position. Ob die Position der Substituenten, wie bei Gruppe A die Substituenten an der Benzylgruppe, einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Aktivität nehmen, konnte aufgrund mangelnder Derivatisierungsmöglichkeiten bisher nicht überprüft werden. Mit dem Derivat 5-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-2-isobutyl-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-7-amin (**35**) wurde das erste Mal eine Veränderung des Grundgerüsts durchgeführt. Statt aus einem Pyrazolotriazin besteht dieses nun aus einem Triazolotriazin, das in Position 4 einen Alkylrest besitzt. Es konnte jedoch keine Inhibition von DegS in den RseA-Proteolyse-Assays beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass eine Veränderung des Grundgerüsts einhergehend mit einer Positionsänderung der Gruppe C nicht zu dem gewünschten Ergebnis führt. Von denen im HTRF-Assay getesteten Inhibitoren zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes zeigte nur Verbindung **42** mit 90 µM eine Verbesserung der inhibitorischen Wirkung (vgl. Tab. 5).

Tab. 5: Biologische Daten der Gruppe B-Derivate.

Verbindung	Inhibition im RseA-Proteolyse-Assay [µM]	IC ₅₀ -Wert [µM]
1	≥ 200	150
32	keine	n. d.
33	keine	n. d.
34	keine	n. d.
35	keine	n. d.
36	keine	174
37	≥ 400	> 196
38	≥ 400	163
39	≥ 400	177
40	≥ 400	> 196
41	≥ 50	n. d.
42	≥ 200	90
43	200	144

Daten zu den RseA-Proteolyse-Assays wurden von Dr. Jens Bongard (AG Ehrmann, Universität Duisburg-Essen) und die IC₅₀-Werte vom LDC generiert. Für Verbindungen, bei denen keine Bestimmung des IC₅₀-Wertes durchgeführt wurde, wurde n. d. (nicht durchgeführt) eingetragen.

4.3.3.2 Verbesserung der DegS-Spezifität

Das Einbringen eines aromatischen Restes in Position C führte zu einer leichten Verbesserung der inhibitorischen Wirkung des Moleküls. Das Derivat **42**, als das mit dem niedrigsten IC_{50} -Wert unter den Gruppe C-Derivaten, wurde darüber hinaus auf die mit DegS eng verwandten Serinproteasen DegP, HtrA1 und HtrA2 getestet. In der für DegS relevanten Konzentration konnte in den RseA-Proteolyse-Assays keine Inhibition beobachtet werden. Auch gegenüber den HtrA-Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase scheint die Verbindung **42** inaktiv zu sein. Eine der größten Herausforderungen war jedoch die Beseitigung der hohen Affinität des Inhibitors **1** gegenüber den humanen Kinasen CDK2, CDK7 und CDK9. Der ursprüngliche Inhibitor hemmte im unteren μM - bis unteren nM-Bereich sehr effektiv humane Kinasen (Tab. 6). Mit dem Inhibitor **42** konnte die Kinase-Aktivität jedoch stark unterdrückt werden. Der sterisch anspruchsvolle aromatische Rest am Pyrazol scheint die Interaktionen zwischen dem Molekül und der Bindestelle der Kinasen so stark zu beeinträchtigen, dass das Molekül nicht mehr in der Lage ist, an die Kinase zu binden und diese zu inhibieren. Die biologischen Untersuchungen wurden bis zu einer Konzentration von 30 μM durchgeführt. Da bis zu dieser Konzentration ein inhibitorischer Effekt kaum noch nachweisbar war, scheint der Inhibitor **42** auf alle getesteten Kinasen als inaktiv zu bewerten zu sein.

Tab. 6: IC_{50} -Werte der Inhibitoren **1** und **42** gegenüber relevanten Kinasen.

Kinase	IC_{50} -Werte des Inhibitors 1 [μM]	IC_{50} -Werte des Inhibitors 42 [μM]
AXL	> 30	> 30
c-MET	> 30	> 30
CDK1/cyclin B	1.34	27.30
CDK2/cyclin A	0.11	> 30
CDK7/cyclin H	< 0.001	> 30
CDK9/cyclin T1	0.03	> 30
CHK1	> 30	24.30
EGFR	> 30	> 30
FER	8.42	28.50
P38a/MAPK14	> 30	> 30
RON/MST1R	> 30	24.20

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde vom kommerziellen Anbieter *Reaction Biology Corp.* (Malvern, USA) durchgeführt.

Cyclin-abhängige Kinasen, wie CDK2, CDK7 oder CDK9, kontrollieren den Zellzyklus und spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung sowie bei der Transkription. Eine Fehlfunktion, verursacht durch Inhibition, kann daher zu verhängnisvollen Schäden an der Zelle führen.^[124, 125] Für die Entwicklung eines neuen Antibiotikums oder eines Additivs für ein Antibiotikum ist die höhere Spezifität des Derivats **42** gegenüber DegS ein großer Fortschritt, da Nebenwirkungen durch die Hemmung von humanen Kinasen vermieden werden können.

Der synthetisierte Inhibitor weist zwar eine hohe Spezifität gegenüber DegS auf, besonders im Vergleich zum ursprünglichen Inhibitor, allerdings ist die Aktivität gegenüber DegS im Vergleich zum ursprünglichen Inhibitor nicht verbessert worden.

4.3.3.3 Synthese eines potentiellen, spezifischen Inhibitors

Mit dem Derivat 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**42**) konnte die Spezifität gegenüber DegS signifikant erhöht werden. Die inhibitorische Wirkung war jedoch ähnlich der des ursprünglichen Inhibitors. Bei der Synthese von Gruppe-A-Derivaten konnten jedoch einige potente DegS-Inhibitoren synthetisiert werden. Diese besaßen wiederum noch immer eine hohe Affinität gegenüber Cyclin-abhängigen Kinasen. Zur Verbesserung der Spezifität und der inhibitorischen Aktivität gegenüber DegS wurden daher die Derivate **24**, mit einem Fluor in *meta*-Position am Benzyl-Rest in Position A, und **42**, mit einer Ethoxyphenyl-Gruppe in Position C, (Abb. 32) miteinander kombiniert.

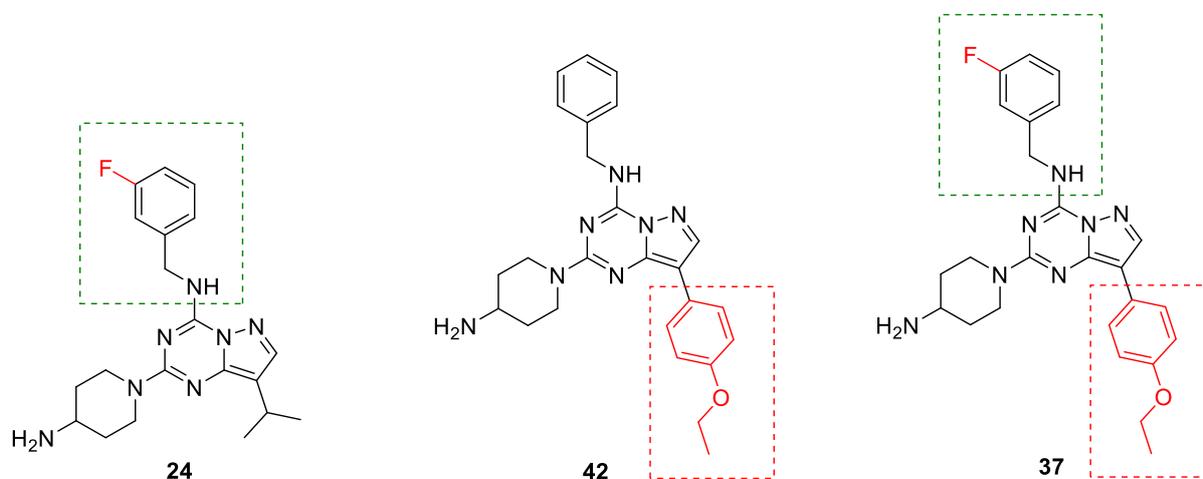


Abb. 32: Struktur der Derivate 24, 42 und deren Kombination 37. Die Gruppen A und C sind grün und rot umrandet, die strukturellen Veränderungen im Vergleich zu **1** sind rot dargestellt.

In der Synthese wurde 4-(4-Ethoxyphenyl)-1H-pyrazol-5-amin eingesetzt, um in Position C die Ethoxyphenyl-Gruppe zu erhalten, und für die Substitution zur Generierung der Gruppe A wurde 3-Fluorobenzylamin eingesetzt. Das resultierende Derivat 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-(4-ethoxyphenyl)-N-(3-fluorobenzyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**37**) zeigte jedoch in den RseA-Proteolyse-Assays nur eine sehr schwache Aktivität. Erst ab einer Konzentration von 400 μM konnte eine hemmende Wirkung beobachtet werden. Die Inhibitoren **24** und **42** zeigten ab 100 μM und 200 μM bereits Wirkung. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den vom LDC bestimmten IC_{50} -Werten wieder. Während den Inhibitoren **24** und **42** mit 141 μM und 90 μM eine zum Teil stärkere Aktivität gegenüber DegS zugeschrieben werden konnte als dem ursprünglichen Inhibitor, konnte für das Derivat **37** bei der maximal gemessenen Konzentration von 196 μM kein Effekt beobachtet werden. Während sich separat bestimmte Modifizierungen der Gruppen A und C positiv auf die inhibitorische Wirkung sowie auf die Spezifität auswirkten, so führte eine Kombination dieser positiven Modifizierungen im Endmolekül zu einer Verschlechterung der Aktivität gegenüber DegS. Sterische Konflikte der beiden Gruppen scheinen aufgrund der räumlichen Distanz sowie deren unterschiedliche räumliche Ausrichtung als Ursache für den Verlust der inhibitorischen Wirkung jedoch nicht von Belang. Die molekulare Ursache für diesen unerwarteten Effekt ist daher unbekannt.

4.4 Ansätze zur Bestimmung der Inhibitor-Bindestelle

4.4.1 Photocrosslinking-Experimente

Ein Problem zur rationalen Verbesserung der inhibitorischen Wirkung durch Derivatisierung war, dass die Bindestelle des Inhibitors unbekannt war. Daher wurde während der Synthese der Derivate, die zu Beginn per *Trial-and-Error* erfolgte, zusätzlich ein Azid-markiertes Derivat hergestellt. Ein Benzylamin mit einer Azid-Gruppe in *para*-Position wurde dazu per Substitution in Position A in das Molekül eingebracht. In den RseA-Proteolyse-Assays konnte anschließend eine geringfügig bessere Aktivität gegenüber DegS im Vergleich zum Inhibitor **1** nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Bindungsstelle wurde 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-N-(4-azidobenzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**25**) mit dem Protein DegS inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Das Azid zerfällt dabei und es entsteht unter

Abspaltung von Stickstoff ein hochreaktives Nitren, welches aufgrund seiner chemischen Reaktivität in C-H-Bindungen insertieren und somit eine irreversible kovalente Bindung aufbauen kann. Anschließend wird ein Verdau des Proteins durch Trypsin durchgeführt. Die tryptischen Peptide können dann durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert werden. Die Peptide, in die die Verbindung **25** insertiert hat, sollten eine reduzierte Intensität aufweisen. Ein Vergleich der unbehandelten Probe mit der behandelten Probe sollte somit einen Aufschluss über die Bindestelle des Inhibitors geben. Nach dem Trypsin-Verdau in der Analyse der Peptid-Fragmente konnte jedoch keine reduzierte Intensität beobachtet werden. Die Ursache hierfür ist unklar, möglicherweise ist die Bindungsaffinität für eine gerichtete Markierung des Zielproteins nicht ausreichend. Daher konnte über diese Methode bisher keine Kenntnis zur DegS-Bindestelle der Inhibitoren gewonnen werden.

Die effizienteste Methode, um die Bindestelle sowie Orientierung des Inhibitors festzustellen, wäre jedoch eine Co-Kristallisation des Inhibitors mit der Serinprotease DegS und die anschließende Aufklärung der Struktur über eine Röntgenstrukturanalyse. Bisher scheiterte dieser Ansatz jedoch bei der Kristallisation, da hier zumeist amorphe Kristalle entstanden, die Röntgenstrukturanalyse jedoch an Einkristallen durchgeführt werden sollte, um zuverlässige Ergebnisse zu liefern.

4.4.2 Molekulares Docking

Molekulares Docking wird zur Modellierung von Interaktionen zwischen niedermolekularen Verbindungen und Proteinen auf atomarem Level eingesetzt. Dadurch können Voraussagen über die Konformation von Liganden sowie Position und Orientierung der niedermolekularen Verbindung an der Bindungsstelle des Zielproteins gemacht werden. Für die Entwicklung von Wirkstoffen hat dieses Verfahren zunehmend Bedeutung, da virtuell sehr viele Substanzen auf Bindung mit dem Zielprotein getestet werden können.^[126]

In den RseA-Proteolyse-Assays mit DegS- Δ PDZ (einer DegS-Mutante, der die PDZ-Domäne fehlt) konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Inhibitoren DegS nicht mehr hemmten. Das ließ darauf schließen, dass die Inhibitoren mit der PDZ-Domäne interagieren müssen, um die Aktivierung der Protease zu unterbinden.^[112] In weiteren Experimenten konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Hemmung von DegS durch diese Inhibitoren nach Zugabe starker Aktivatorpeptide abnimmt. Das lässt darauf

schließen, dass die Inhibitoren an der gleichen Bindestelle wie die Aktivatoren binden und somit als „Aktivator-Antagonisten“ wirken.

Um einen Einblick auf die Orientierung und Ausrichtung der hier synthetisierten Inhibitoren an der Bindestelle von DegS zu bekommen, wurden von Dr. Kenny Rodriguez (AG Ehrmann, Universität Duisburg-Essen) zwei Bindemodelle mittels Molekulardynamik-Kalkulation berechnet, eines für die Bindung eines Aktivatorpeptids und eines für die Bindung des LDC-Inhibitors (1) an der PDZ-Domäne (Abb. 33).

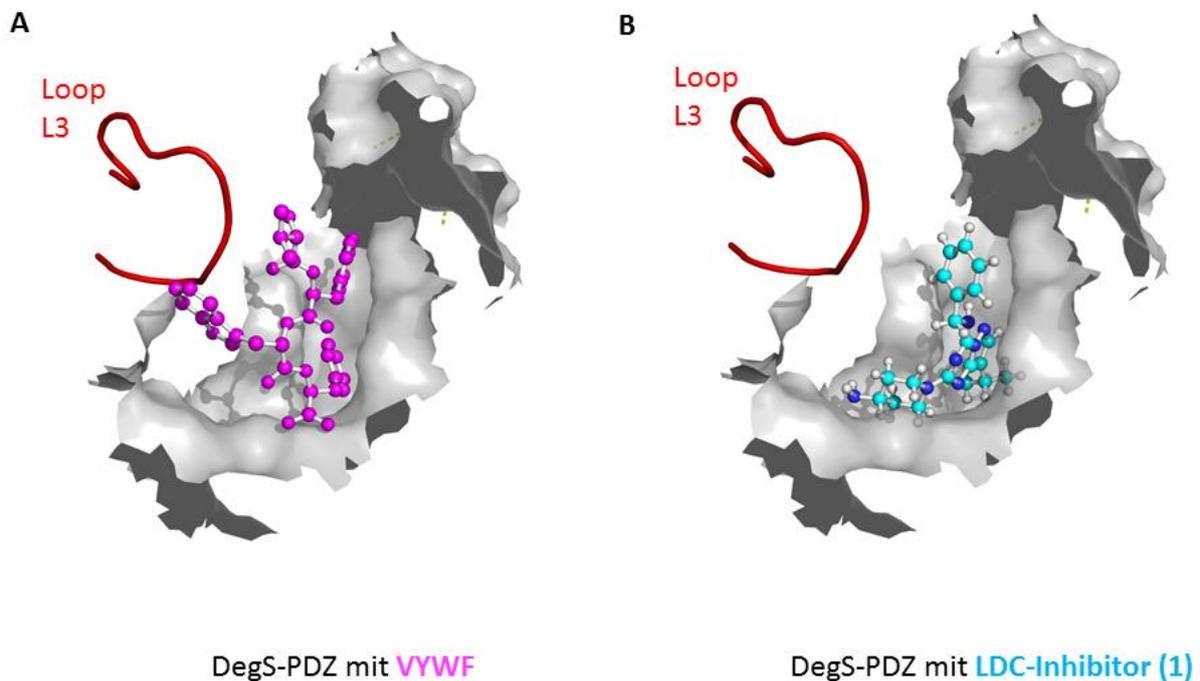


Abb. 33: Ergebnisse eines molekularen Dockings an die PDZ-Domäne von DegS. (A) Orientierung des Aktivator-Peptids VYWF an der Bindestelle von DegS. (B) Ausrichtung und Orientierung des Inhibitors 1 an der Bindestelle von DegS.

In dem Modell mit einem Aktivator-Peptid ist zu erkennen, wie das Peptid mit der Sequenz VYWF an die PDZ-Domäne bindet und durch Interaktion des Tyrosinrestes mit dem Loop L3 Konformationsänderungen einleitet, die dann für die Aktivierung der Protease sorgen. Grundlegend neue Erkenntnisse können aus diesem Modell nicht gewonnen werden, allerdings bestätigt sich hier möglicherweise noch einmal die Beobachtung, dass die Erweiterung der Benzylamin-Gruppe in Position A einen positiven Einfluss auf die Stärke des Inhibitors hat. Alle Derivate, die am aromatischen Rest einen großen hydrophoben Substituenten besaßen, zeigten eine wesentlich höhere DegS-Hemmwirkung in den RseA-Proteolyse-Assays sowie bei der biochemischen Bestimmung der IC_{50} -Werte mittels des HTRF-Assays. In Experimenten mit

unterschiedlichen Resten am aromatischen Ring zeigte sich, dass Derivate mit einem großen hydrophoben Rest sehr aktiv, mit einem kleinen hydrophilen Rest jedoch inaktiv sind. Am Bindungsmodell (Abb. 33, B) ist zu erkennen, dass oberhalb des aromatischen Restes noch Raum zu sein scheint. Durch die strukturelle Erweiterung des Moleküls in diese Richtung könnten zusätzliche Interaktionen mit der PDZ-Domäne stattfinden und dadurch die Bindung zwischen Inhibitor und Protein begünstigen und stärken.

4.5 Ansätze zur Syntheseoptimierung

4.5.1 Syntheseoptimierung der Gruppe A

Die größten Ausbeuteverluste bei der Synthese der Derivate fanden bei der Chlorierung der Carbonylfunktion (Kapitel 4.2.3) statt. Diese Stufe war jedoch nötig, um anschließend einen Substituenten in Position A einzubringen. Die chlorierte Verbindung stellte sich zudem als hydrolyseempfindlich heraus und konnte somit nicht einfach gereinigt und für spätere Ansätze im größeren Maßstab synthetisiert und gelagert werden. Um die Synthese zum einen zu verkürzen, den Schritt mit den höchsten Ausbeuteverlusten nicht für jedes Derivat wiederholen zu müssen und eine Verbindung zu erhalten, die gelagert und bei Bedarf weiter umgesetzt werden kann, wurde daher überlegt, ein Derivat zu synthetisieren, das nach der Chlorierung und Substitution in Position A noch weiter modifizierbar ist, um somit den Syntheseaufwand für die Generierung von Derivaten an der Gruppe A zu verringern. Aus den biologischen Experimenten war bekannt, dass sich eine Modifizierung in *meta*-Position am Benzylring für die Hemmung von DegS positiv auswirkt. Daher wurde spezifisch an einer Verbindung gearbeitet, die nach der Substitution in *meta*-Position am Benzyl-Rest modifizierbar ist.

4.5.1.1 Modifizierung über eine OH-Gruppe am Benzylamin

Ein Benzylamin mit einer Hydroxyl-Gruppe in *meta*-Position könnte durch eine Alkylierung mit einem gewünschten Alkylhalogenid wie in Abb. 20 noch nach der Substitution an das Pyrazolotriazin modifiziert werden. Dazu musste der Alkohol zunächst geschützt werden. Da sich bereits eine säurelabile Boc-Schutzgruppe am Amin des 3-(Boc-aminomethyl)phenol befand, sich die Schutzgruppen später jedoch unabhän-

gig voneinander abspalten lassen sollten (orthogonale Schutzgruppen), konnte für die Schützung des Alkohols keine säurelabilen Schutzgruppen wie Triphenylmethyl (Tr), *tert*-Butyl oder Methoxymethyl (MOM) verwendet werden. Daher wurden die folgenden zwei Schutzgruppen getestet: eine Benzyl-Schutzgruppe und eine Silyl-Schutzgruppe. Die Einführung der Benzyl-Schutzgruppe und die anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zur Generierung des (3-(Benzyloxy)phenyl)methanamin (**11**) erfolgte wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben. Die anschließende Substitution wurde analog zur beschriebenen Methode in Kapitel 4.2.3 durchgeführt. Die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe erfolgt reduktiv durch eine katalytische Hydrierung.^[127] Daher wurde nach erfolgreicher Substitution das säulenchromatographisch gereinigte Produkt **14** in entgastem Lösungsmittel und unter trockenen Bedingungen hydriert. Mittels LC/MS-Analysen wurden Reaktionskontrollen durchgeführt, die jedoch keinen Umsatz zeigten. Auch in weiteren Ansätzen konnte keine Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe erreicht werden.

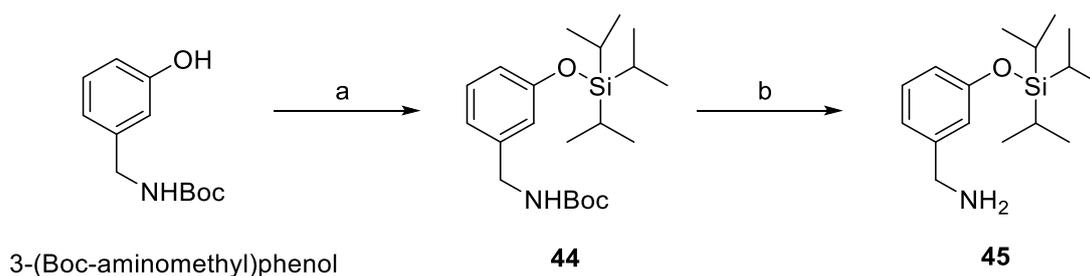


Abb. 34: Synthese der TIPS-geschützten Verbindung 45. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Chloro-(triisopropyl)silan, Imidazol, DMF, rt, 24 h, 77 %. (b) 4 M HCl in Dioxan, rt, 2 h, 77 %.

Zur Einbringung der Triisopropylsilyl-Schutzgruppe wurden 3-(Boc-aminomethyl)phenol, Chloro-(triisopropyl)silan und Imidazol in Dimethylformamid (DMF) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 34). Überschüssige Base wurde durch Waschen mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und verdünnter Kaliumhydrogensulfat-Lösung entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung von *tert*-Butyl (3-((triisopropylsilyl)oxy)benzyl)carbamat (**44**) konnte eine Ausbeute von bis zu 77 % erhalten werden. Die Boc-Schutzgruppe am Amin wurde mit einer 25 %-igen Trifluoroessigsäure-Lösung in Dichlormethan oder mit 4 M Salzsäure in Dioxan abgespalten. Stark saure Bedingungen wurden vermieden, da sie zur Abspaltung der Silyl-Schutzgruppe hätten führen können.^[127] In der anschließenden Substitution durch das Silyl-geschützten Benzylamin-Derivat (3-((Triisopropylsilyl)oxy)phenyl)methanamin (**45**) fand jedoch kein Umsatz statt.

Die Verwendung einer Hydroxyl-Gruppe zur Modifizierung der Gruppe A in *meta*-Position scheint nicht zielführend. Die Synthese scheiterte entweder bei der Substitution der Silyl-geschützten Verbindung **45** oder bei der Verwendung der Benzyl-Schutzgruppe im Schritt nach der Substitution bei der Abspaltung der Schutzgruppe zur Generierung der freien Hydroxyl-Gruppe **47** (Abb. 35).

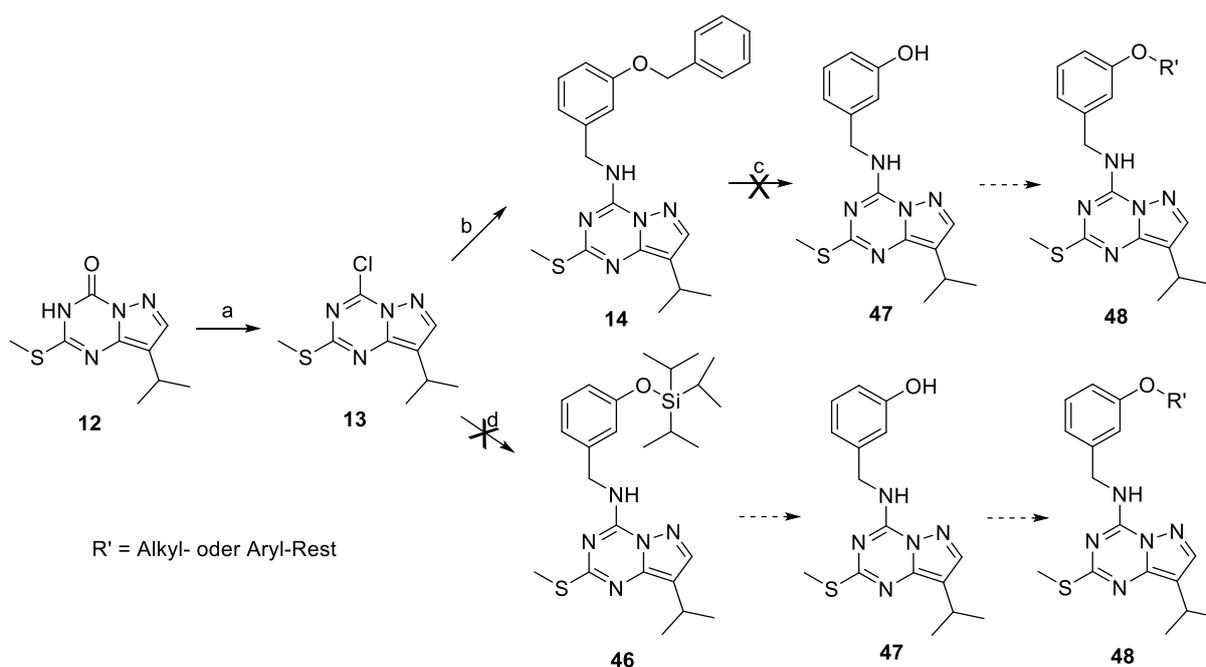


Abb. 35: Geplante Optimierung der Synthese durch Einbringung einer geschützten Hydroxyl-Gruppe zur späteren Modifizierung. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) POCl_3 , N,N-Diethylanilin, $90\text{ }^\circ\text{C}$, 3-18 h. (b) **11**, DIPEA, ACN, rt, 18 h. (c) Pd/C, H_2 , MeOH/DCM, rt, 20 h. (d) 3-((triisopropylilyl)oxy)phenyl)methanamin, DIPEA, ACN, rt, 18 h.

4.5.1.2 Modifizierung über eine NH_2 -Gruppe am Benzylamin

Eine andere Möglichkeit, Verbindungen in Position A nach der Chlorierung zu modifizieren, besteht in der Einbringung eines Amins. Dieses kann durch eine Amidkuppelung effizient strukturell erweitert werden. In der Synthese wurde daher *tert*-Butyl 3-(aminomethyl)phenylcarbammat zur Substitution des Chlorids eingesetzt (Kapitel 4.2.3). Für die Chlorierung und die Substitution konnten gute Ausbeuten mit bis zu 84 % erreicht werden (Abb. 36).

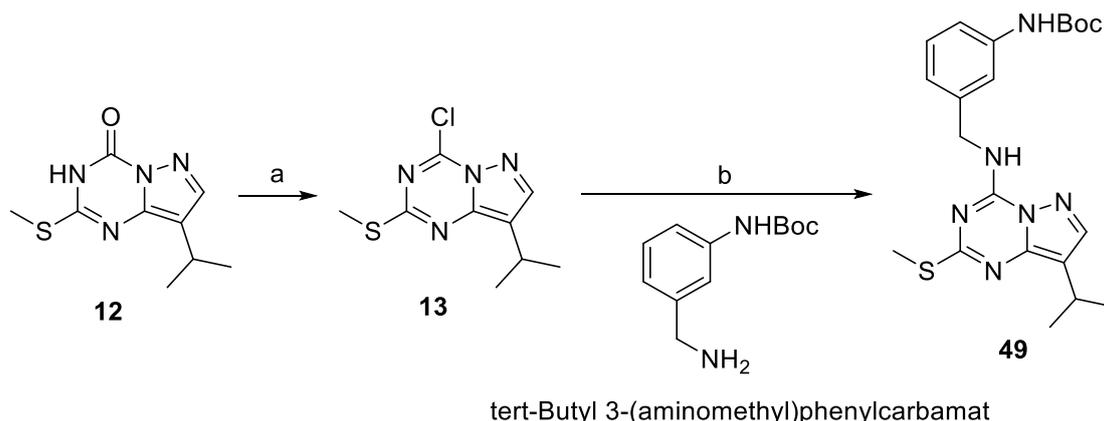


Abb. 36: Optimierung der Synthese durch Einbringung einer geschützten Aminogruppe. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) POCl_3 , N,N-Diethylanilin, 90°C , 3-18 h. (b) DIPEA, ACN, rt, 18 h, 84 % über 2 Stufen.

Anschließend wurde die Oxidation des Schwefels mit *meta*-Chlorperbenzoesäure durchgeführt, die mit 84 % eine gute Ausbeute lieferte. Um die Synthese so weit wie möglich zu verkürzen ist es sinnvoll, die Amidkupplung so spät wie möglich durchzuführen. Auf diese Weise können in möglichst wenigen Schritten in einer wesentlich kürzeren Zeit Derivate hergestellt werden. Für die Boc-Entschützung des Amins **49** wurde verdünnte Salzsäure verwendet. Für die Kupplung an das nun freie Amin wurde das Säurechlorid Phenylacetylchlorid eingesetzt, da für die Umsetzung lediglich Base hinzugegeben werden musste und somit keine zusätzlichen Kupplungs- und Aktivierungs-Reagenzien, wie es bei Carbonsäuren üblich ist, eingesetzt werden mussten. Zudem würden mehr Reagenzien das Produktgemisch zusätzlich verunreinigen. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Zugabe von Diisopropylethylamin durchgeführt (Abb. 37).

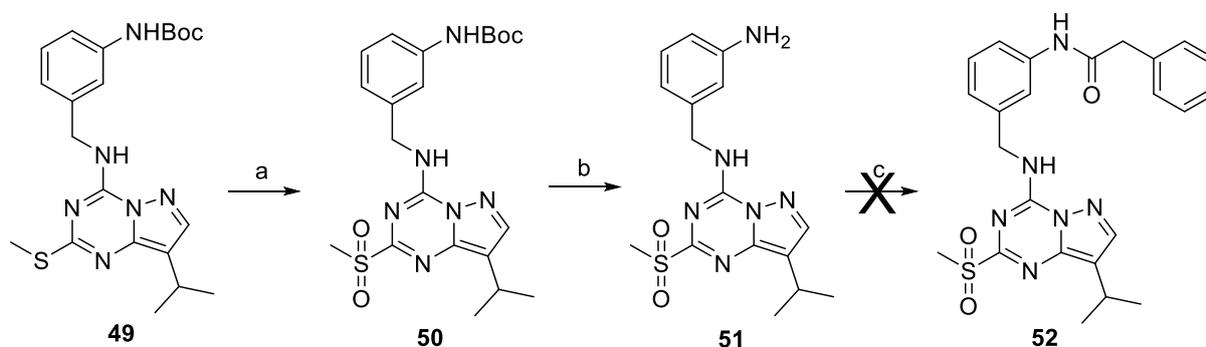
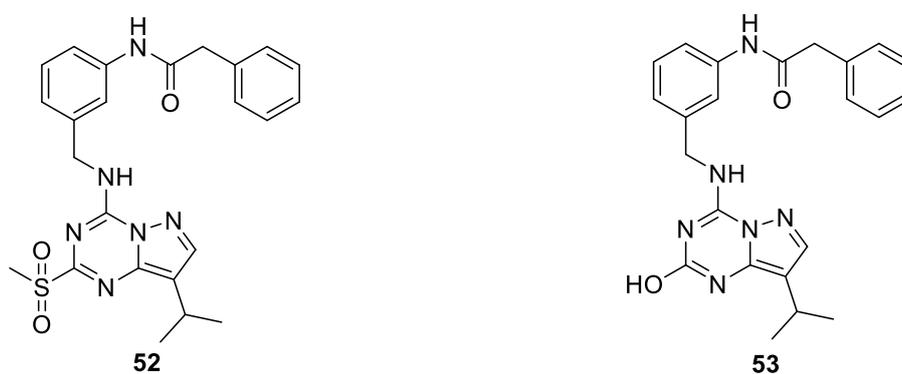


Abb. 37: Erster Ansatz zur Modifizierung des Benzylamin-Restes über ein Amin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) mCPBA, DCM, rt, 1 h. (b) 4 M HCl in Dioxan, rt, 4 h. (c) Phenylacetylchlorid, DIPEA, DCM, DMF, rt, 18 h.

Anschließende LC/MS-analytische Untersuchung des Produktes ergab, dass die Amidkupplung zwar stattgefunden hatte, das Sulfon unter diesen Bedingungen jedoch nicht stabil war und hydrolysierte. Für das gewünschte Produkt **52** in protonierter Form $C_{24}H_{27}N_6O_3S^+$ $[M+H]^+$ wurde eine Masse von 479.19 berechnet. In der LC/MS-Analyse konnte ein deutlicher Peak mit einer Masse von 417.23 gefunden werden. Dies entspricht der Masse des hydrolysierten Produktes **53** für welches in protonierter Form $C_{23}H_{25}N_6O_2^+$ $[M+H]^+$ eine Masse von 417.20 berechnet worden ist (Abb. 38).



Masse berechnet für $C_{24}H_{26}N_6O_3S^+$ $[M+H]^+$: 479.19 Masse berechnet für $C_{23}H_{24}N_6O_2^+$ $[M+H]^+$: 417.20

Abb. 38: Struktur und berechnete Massen des gewünschten Produktes 52 und des tatsächlich entstandenen Produktes 53.

Um die Hydrolyse des Sulfons während der Amidkupplung zu vermeiden, mussten also zunächst die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und die Kupplung des Säurechlorids stattfinden und erst anschließend die Oxidation zum Sulfon durchgeführt werden (Abb. 39). Die Boc-Abspaltung erfolgte wie bereits im vorherigen Ansatz mit verdünnter Salzsäure. Nach Trocknen des Produktes wurde direkt die Kupplung des Säurechlorids unter basischen Bedingungen durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt und konnte über zwei Stufen mit einer Ausbeute von 64 % isoliert werden. Die Oxidation des Schwefels wurde wie üblich mit *meta*-Chlorperbenzoesäure durchgeführt (Kapitel 4.2.4). Das Produkt wurde mit verdünnter Natronlauge und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und bedurfte keiner weiteren Reinigung. Die Ausbeute betrug 86 %.

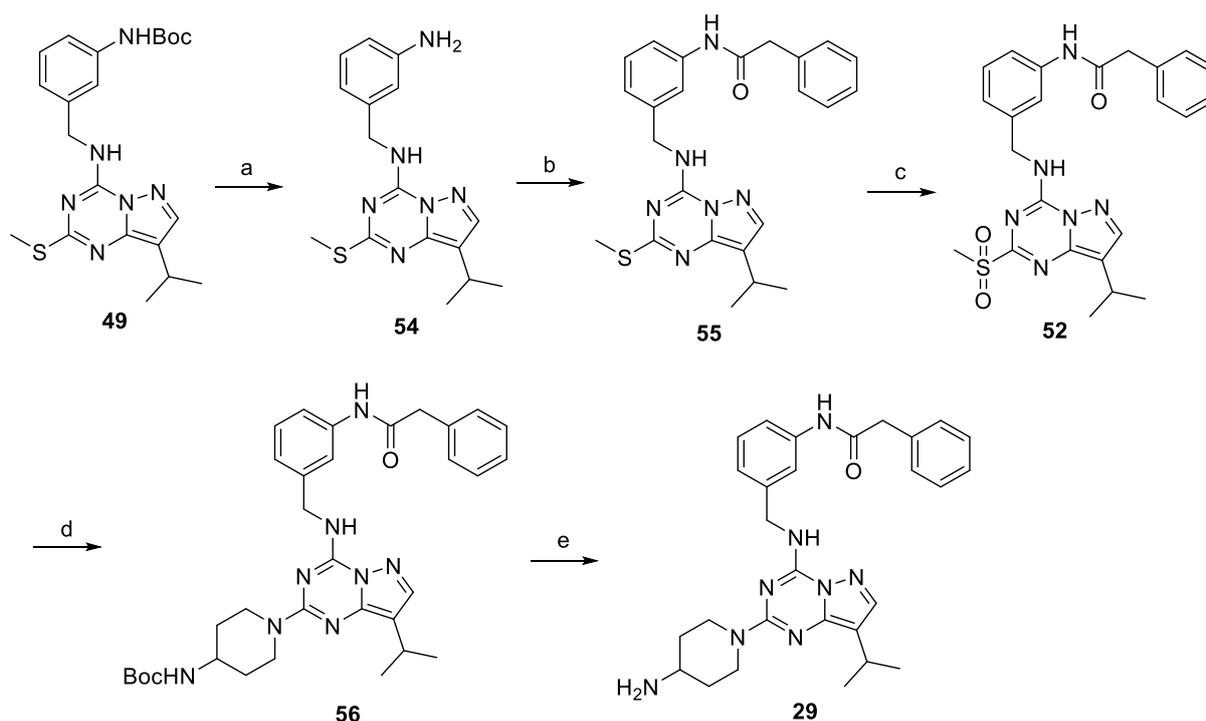


Abb. 39: Modifizierte Synthese zur Derivatisierung des Benzylamin-Restes über ein Amin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 4 M HCl in Dioxan, rt, 3.5 h. (b) Phenylacetylchlorid, DIPEA, DCM, rt, 18 h. (c) mCPBA, DCM, rt, 2.5 h. (d) 4(N-Boc-amino)piperidin, NMP, 120 °C, 18 h. (e) TFA, rt, 3 h, 17 % über 2 Stufen.

Über diesen Ansatz konnte bisher ein Derivat (**29**) erfolgreich synthetisiert werden (Abb. 39). Prinzipiell scheint dieser Ansatz eine sinnvolle Optimierung der Synthese zu sein. Die Synthese verkürzt sich von ursprünglich 7 Stufen auf 5 Stufen. Die gewonnenen 2 Stufen scheinen auf den ersten Blick nur eine geringfügige Verbesserung zu sein, allerdings handelt es sich bei den neuen Synthesen um vergleichsweise einfache Reaktionen, die gute Ausbeuten lieferten. Die unter extremen Bedingungen ablaufende Chlorierung mit Phosphorylchlorid, die zu den meisten Nebenreaktionen und damit einhergehenden Ausbeuteverlusten geführt hat, muss nicht für jedes Derivat erneut durchgeführt werden, da die Substitution am Ring bereits stattgefunden hat. Über Verbindung **49** könnten durch Amidkupplungen mit Säurechloriden und theoretisch auch mit Carbonsäuren unter Verwendung entsprechender Kupplungsreagenzien viele Modifizierungen in *meta*-Position am Benzylamin-Rest durchgeführt werden. Bei 2 dieser 5 Stufen handelt es sich um die Abspaltung von Boc-Schutzgruppen. Also um quantitativ ablaufende Reaktionen, bei denen für gewöhnlich keine weitere Reinigung des Produktes notwendig ist. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass mittels dieser veränderten Syntheseroute sowohl die Anzahl

der Synthesestufen verringert werden konnte als auch der Aufwand und die Komplexität der einzelnen Syntheseschritte vergleichsweise gering ist.

4.5.2 Syntheseoptimierung der Gruppe C

Um in Position C unterschiedliche Gruppen einzuführen, musste das entsprechende Pyrazol-Derivat kommerziell erworben werden. Zum einen war nur eine stark beschränkte Auswahl an kommerziell erhältlichen Edukten verfügbar, zum anderen waren diese nicht kostengünstig. Daher waren die Derivatisierungs-Möglichkeiten der Gruppe C relativ stark eingeschränkt. Um also eine größere Vielfalt an Derivaten herstellen zu können, wurde versucht, über die Suzuki-Kupplung am Pyrazolotriazin unterschiedliche Gruppen in Position C zu generieren. Mit dem 4-Chloro-1H-pyrazol-3-ylamin wurde dazu zunächst das Pyrazolotriazin-Grundgerüst aufgebaut, welches in Position C ein Chlor gebunden hatte. Anschließend wurden die Chlorierung und die Substitution mit Benzylamin durchgeführt, welche über zwei Stufen eine schlechte, aber für diese Reaktion nicht unübliche Ausbeute von 22.5 % lieferte. LC/MS-Analysen bestätigten, dass es zu einer Monosubstitution in Position A kam. Da es sich in Position C um ein Arylchlorid mit einer sehr stabilen Kohlenstoff-Chlor-Bindung handelt, war nicht von einer Substitution in dieser Position auszugehen.

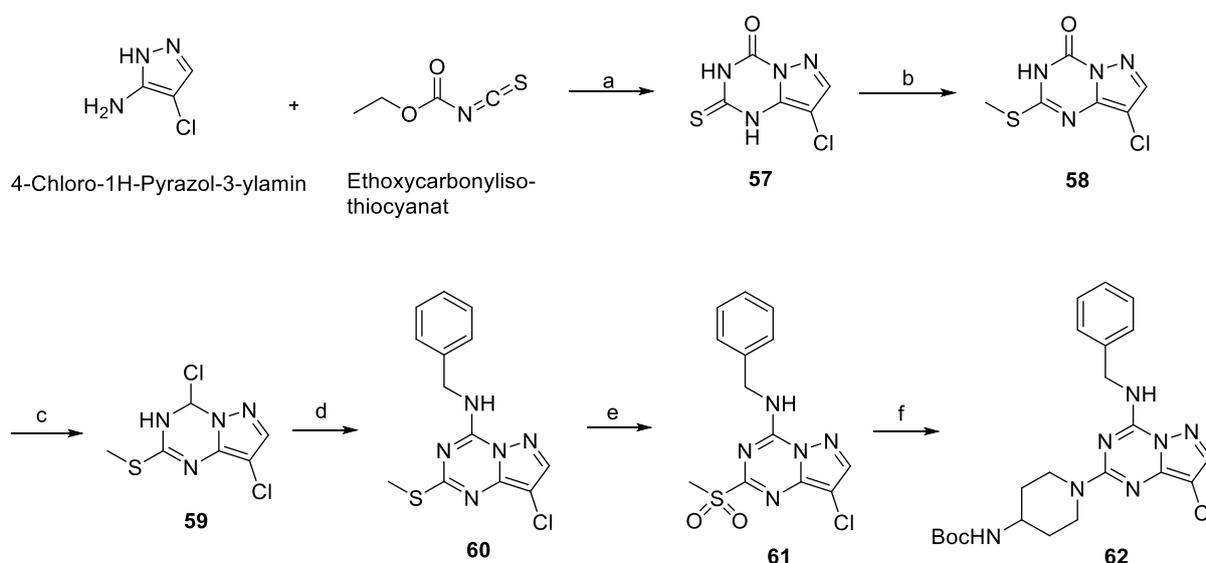


Abb. 40: Synthese des *tert*-Butyl (1-(4-(benzylamino)-8-chloropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbamats (62**).** Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i) DCM, rt, 2 h; ii) K₂CO₃, ACN, 90 °C. (b) MeI, 2 M NaOH, EtOH, 0 °C → rt, 18 h, 77 % über 2 Stufen. (c) POCl₃, N,N-Diethylanilin, 90 °C, 3-18 h. (d) Benzylamin, DIPEA, ACN, rt, 18 h, 22.5 % über 2 Stufen. (e) *m*CPBA, DCM, rt, 45 min. (f) 4-(N-Boc-amino)piperidin, NMP, 120 °C, 18 h.

Die Synthese wurde bis auf die letzte Stufe, die Boc-Entschützung des Amins in Position B, fortgesetzt (Abb. 40). Für die Suzuki-Kupplung wurde unter inerten Bedingungen und mit entgasten Lösungsmitteln gearbeitet. Für die Kupplung wurde der Katalysator Tetrakis-(triphenylphosphin)Palladium(0) verwendet. Bei der eingesetzten Organoboronsäure handelte es sich um *meta*-Tolylboronsäure (Abb. 41). Die Edukte und der Katalysator wurden gelöst und mit einer gesättigten Kaliumcarbonat-Lösung versetzt. Der Zusatz der Base ist essentiell für die Suzuki-Kupplung, da sie die intramolekulare Transmetallierung erleichtert. Dies geschieht durch die Umsetzung der Boronsäure zur reaktiveren Boronat-Spezies und durch die Substitution des Halogens im Palladium-Komplex zu einer elektrophileren Verbindung, die besser in der elektrophilen Transmetallierung reagiert.^[128] Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei 88 °C gerührt. Bei der Reaktionskontrolle zeigte sich jedoch, dass es zu keiner Umsetzung des Eduktes kam.

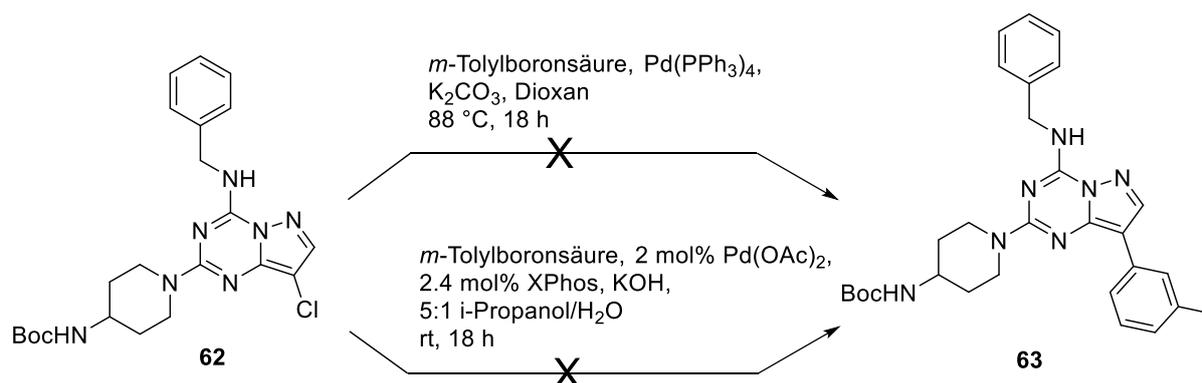


Abb. 41: 2 Varianten der durchgeführten Suzuki-Kupplungen zur Derivatisierung von Gruppe C.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Suzuki-Kupplung ist die oxidative Addition des Halogenaromaten und hängt damit stark von der Reaktivität des verwendeten Halogens ab. Die Geschwindigkeit der Addition nimmt in der Reihenfolge Iod > Brom >> Chlor ab. Um die Reaktivität von eher reaktionsträgen Arylchloriden zu erhöhen, werden daher sehr große, elektronenreiche Liganden eingesetzt, die die oxidative Addition und die reduktive Eliminierung beschleunigen sollen.^[128, 129] Daher wurden in einem neuen Ansatz die Edukte mit dem Katalysator Palladium(II)acetat, dem Liganden 2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl (XPhos) und Kaliumhydroxid umgesetzt. Unter diesen Bedingungen wurden in der Literatur bereits erfolgreiche Umsetzungen von sterisch anspruchsvollen Heteroarylchloriden unter

milden Bedingungen und mit kurzen Reaktionszeiten (15 min) mit Ausbeuten um die 90 % beschrieben.^[130] XPhos (Abb. 42) ist ein sperriger, elektronenreicher Ligand, der in der Lage ist, monoligierte L_1Pd -Intermediate zu stabilisieren. $L_1Pd(0)$ -Komplexe sind aufgrund ihrer geringeren Größe verglichen mit mehrfach-koordinierten Komplexen in der Lage, näher an das Substrat zu gelangen und dadurch schneller zu reagieren.^[128]

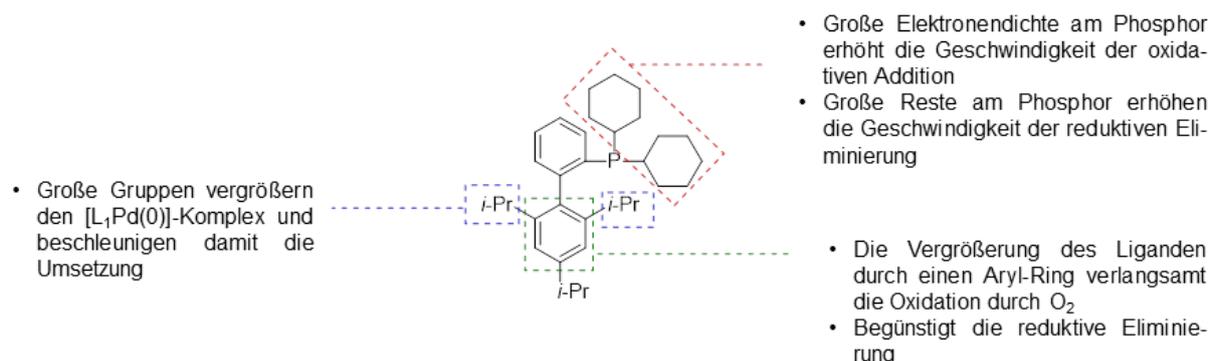


Abb. 42: Strukturelle Merkmale des Dialkylbiarylphosphins XPhos und deren Einflüsse auf die Effektivität von Pd-Katalysatoren.^[128]

Für die Reaktion wurde wie zuvor unter inerten Bedingungen gearbeitet und entgaste Lösungsmittel eingesetzt. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur über 18 h statt. Allerdings konnte auch hier kein Umsatz des Eduktes mittels LC/MS nachgewiesen werden. Es wurden darüber hinaus Edukte, Reaktionsbedingungen und Reagenzien variiert, jedoch mit demselben Ergebnis: kein Umsatz zum Produkt (Tab. 7). Da nicht einmal Spuren des gewünschten Produktes (**63**) in den LC/MS-Analysen gefunden werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Ausgangsverbindung **62** für eine Suzuki-Kupplung ungeeignet ist. Auch die Zugabe des elektronenreichen Liganden XPhos führte zu keiner oxidativen Addition des reaktionsträgen Arylchlorids an den Katalysator.

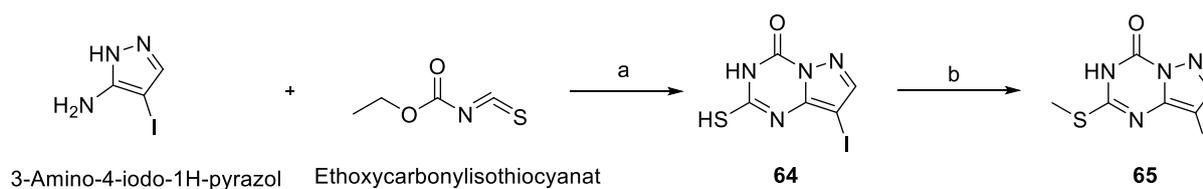


Abb. 43: Synthese der Verbindung 65 als Ausgangsverbindung für die Suzuki-Kupplung. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i) DCM, rt, 1.5 h; ii) K_2CO_3 , ACN, 90 °C, 2 h. (b) MeI, 2 M NaOH, EtOH, 0 °C \rightarrow rt, 18 h.

Da Iod als wesentlich größeres Halogenid aufgrund der geringeren Bindungsstärke zwischen dem Arylkohlenstoff und dem Iod besser reagieren sollte, wurde die Verbindung **65** synthetisiert (Abb. 43) und in verschiedenen Variationen der Suzuki-Kupplung eingesetzt. Mittels LC/MS wurde das Produktgemisch untersucht, jedoch wurde auch hier nach 17-24 h Reaktionszeit nur die Masse des Eduktes gefunden. Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen sowie Reagenzien und Katalysatoren in den durchgeführten Suzuki-Kupplungen können der Tab. 7 entnommen werden.

Tab. 7 (folgende Seite): Verwendete Reaktionsbedingungen und Reagenzien für die Suzuki-Kupplung.

Halogenid	Boronsäure	Katalysator	Ligand	Base	Lösungsmittel	Reaktionszeit [h]	Temperatur [°C]	Ausbeute [%]
62	<i>m</i> -Tolylboronsäure	[Pd(PPh ₃) ₄]	-	K ₂ CO ₃	Dioxan/H ₂ O	18	88	0
62	<i>m</i> -Tolylboronsäure	[Pd(PPh ₃) ₄]	-	K ₂ CO ₃	Dioxan/H ₂ O	18 + 24	88 → 100	0
62	<i>m</i> -Tolylboronsäure	Pd(OAc) ₂	XPhos	KOH	Isopropylol/H ₂ O	18	rt	0
62	Butylboronsäure	Pd(OAc) ₂	XPhos	KOH	Isopropylol/H ₂ O	18	rt	0
62	(2-Methylpropyl)-boronsäure	Pd(OAc) ₂	XPhos	KOH	Isopropylol/H ₂ O	18	rt	0
62	Phenylboronsäure	Pd(OAc) ₂	XPhos	CsOH	<i>n</i> -BuOH/H ₂ O	15 min	rt	0
62	Phenylboronsäure	Pd(OAc) ₂	XPhos	KOH	Isopropylol/H ₂ O	18	85	0
3-Amino-4-iodo-1H-pyrazol	Phenylboronsäure	[Pd(PPh ₃) ₄]	XPhos	Cs ₂ CO ₃	THF/H ₂ O	18	70	0
4-Chloro-1H-pyrazol-3-ylamin	Phenylboronsäure	[Pd(PPh ₃) ₄]	XPhos	Cs ₂ CO ₃	THF/H ₂ O	18	70	0
65	Phenylboronsäure	[Pd(PPh ₃) ₄]	-	K ₂ CO ₃	Dioxan/H ₂ O	24	90	0
65	Phenylboronsäure	Pd(OAc) ₂	XPhos	CsOH	<i>n</i> -BuOH/H ₂ O	24	rt	0
65	Phenylboronsäure	[Pd(PPh ₃) ₄]	-	NaOH	THF/H ₂ O	17	90	0
65	Phenylboronsäure	Pd(OAc) ₂	Dicyclohexylamin	Cs ₂ CO ₃	Dioxan/H ₂ O	17	90	0

5 Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund wachsender Resistenzen von Bakterien gegenüber Antibiotika wird an der Entwicklung neuer Verbindungen gearbeitet, die helfen, die Abwehrmechanismen der Pathogene auszuschalten oder zu umgehen bzw. neue *Targets* adressieren. Von HtrA-Proteasen ist bereits bekannt, dass sie eine wichtige Rolle in vielen biologisch relevanten Prozessen spielen. Zu den prokaryotischen HtrA-Proteasen gehört auch das im Periplasma lokalisierte, als Stresssensor agierende DegS, welches bis dato noch nicht für eine Wirkstoffsynthese synthetisch evaluiert wurde. Als Stresssensor bindet DegS ungefaltete oder fehlerhafte Proteine im Periplasma und wird dadurch proteolytisch aktiv. Daraufhin kommt es zu einer Kaskade von Reaktionen, die die Freisetzung des Sigmafaktors σ^E zur Folge haben, der wiederum die Transkription von Stressgenen induziert. Aufgrund seiner essentiellen Funktionen unter Stressbedingungen, sowie der Tatsache, dass DegS in einer Vielzahl von Gram-negativen Bakterien zu finden ist, handelt es sich hierbei möglicherweise um ein potentielles *Target* für die Entwicklung neuer Antibiotika zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Diese Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Entwicklung DegS-spezifischer Inhibitoren und deren Anwendung in biologischen Assays getestet werden.

Vom LDC in Dortmund wurden im Vorfeld *Screenings* durchgeführt, um einen potentiellen Inhibitor für DegS zu finden. Dabei stieß man auf den Inhibitor 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**1**), der *in vivo* und in verschiedenen biochemischen Assays DegS inhibierte. Um die relativ schwache Inhibition und die DegS-Spezifität des Inhibitors zu verbessern, wurden im Rahmen dieser Arbeit chemische Synthesen von niedermolekularen Inhibitoren für die Serinprotease DegS durchgeführt. Anhand der synthetisierten Derivate war es somit erstmals möglich, eine Aussage über die Struktur-Wirkungsbeziehung für diese Inhibitorklasse aufzustellen. Der 4-Aminopiperidin-Substituent am Pyrazolotriazin scheint essentiell für die Wirkung des Inhibitors zu sein. Keines der synthetisierten Derivate, die in dieser Position variiert wurden, zeigte eine Aktivität. Geringste Veränderungen führten zu einem kompletten Verlust der Inhibition. Auch eine Veränderung des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts zu einem Triazolotriazin-Grundgerüst war nicht möglich. Die Isopropyl-Gruppe zeigte hingegen eine größere Flexibilität. Die Substitution durch große unpolare Gruppen zeigte zum einen eine Verbesserung des

inhibitorischen Effekts und darüber hinaus eine höhere Spezifität gegenüber DegS. Da eines der größten Defizite des LDC-Inhibitors (**1**) und strukturell-ähnlich aufgebauter Derivate die medizinisch-kritische starke Inhibition (im unteren nM-Bereich) von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) als *off-targets* ist, handelte es sich hierbei prinzipiell um eine wichtige Entdeckung zur Verbesserung der Spezifität des Inhibitors. Die Substitution der Isopropyl- durch eine 4-Ethoxyphenyl-Gruppe machte den Inhibitor 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**42**) mit > 30 μM nahezu inaktiv gegenüber den getesteten Kinasen.

Durch die Modifizierung der Benzylamin-Gruppe konnten ebenfalls wichtige Erkenntnisse in Bezug auf Struktur und Wirkung gewonnen werden: Große unpolare Reste verbessern die Inhibition von DegS signifikant. Bei der Untersuchung weiterer Derivate konnte sogar spezifisch die *meta*-Position am Benzylring als effektivste Substitutionsstelle identifiziert werden. Mit diesem Wissen konnte dann der bisher potenteste DegS-Inhibitor 2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**17**) synthetisiert werden. Die DegS-Aktivität in den RseA-Proteolyse-Assays konnte von 200 μM für den ursprünglichen Inhibitor (**1**) auf 2.5 μM für den Inhibitor **17** gesteigert werden. Auch die vom LDC per HTRF bestimmten IC_{50} -Werte zeigen, dass mit 51.7 μM für Inhibitor **17** im Gegensatz zu 150 μM für Inhibitor **1** eine deutliche Verbesserung der inhibitorischen Wirkung erreicht wurde. Obwohl die großen hydrophoben Reste die Inhibition von DegS sichtlich steigern, gehen sie jedoch mit einer Verschlechterung der pharmakologischen Eigenschaften der Inhibitoren einher, z. B. durch eine Erhöhung der unspezifischen Bindung an die äußere Zellmembran Gram-negativer Bakterien (Lipid-I-Bindung), welche die Konzentration der Inhibitoren im Periplasma als Zielorganelle reduziert. Bei der Synthese weiterer Derivate ist daher zu bedenken, dass sie noch in der Lage sein sollten, dieses Kompartiment in den benötigten Konzentrationen zu erreichen, um somit eine effiziente Hemmung von DegS zu ermöglichen. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 27 Derivate des LDC-Inhibitors hergestellt. Davon zeigten alle Verbindungen, die in *meta*-position am Benzyl-Ring einen nicht-hydrophilen Rest besaßen, eine bessere Inhibition als der ursprüngliche Inhibitor. Je größer und hydrophober dieser Rest war desto stärker die Inhibition in biochemischen Assays.

In Experimenten der Schweizer Firma BioVersys konnte außerdem ein Synergieeffekt zwischen dem etablierten Antibiotikum Colistin und den getesteten Inhibitoren

nachgewiesen werden. Die Inhibitoren alleine waren in Experimenten mit *E. coli* nur bei relativ hohen Konzentrationen von $> 200 \mu\text{M}$ aktiv. Durch Zugabe von $1/8$ MIC Colistin wurde die äußere Zellmembran jedoch so weit geschädigt, dass ein Eindringen der Inhibitoren in das Periplasma möglich war. Die IC_{50} -Werte konnten dadurch signifikant reduziert werden.

Um besonders *in vivo* noch niedrigere Inhibitor-Konzentrationen zu erreichen, ist es jedoch unausweichlich, die präzise Bindestelle des Inhibitors zu kennen. Experimente mit einem Azid-Derivat konnten beim Photocrosslinking keine verwertbaren Ergebnisse liefern. Derzeit werden am LDC in Dortmund Co-Kristallisationen mit der Protease DegS und dem Inhibitor **17** durchgeführt. Sollten dabei die gewünschten Einkristalle entstehen, können diese durch Röntgenstrukturanalyse Aufschluss über die DegS-Bindestelle des Inhibitors geben.

Für die Optimierung der Synthese von Benzylamin-Derivaten erwies sich das Einbringen einer Amino-Gruppe in *meta*-position am Benzyl-Ring am vielversprechendsten. Über dieses Derivat (**54**) konnte das Säurechlorid Phenylacetylchlorid erfolgreich gekuppelt werden. Auch andere Säurechloride sowie Carbonsäuren mit entsprechenden Kupplungsreagenzien können im Prinzip an dieses Amin gekuppelt werden. Vorteil dieser Synthese ist, dass die unter harschen Bedingungen ablaufende sowie schlechte Ausbeuten liefernde Chlorierung mit Phosphorylchlorid nicht für jedes Derivat erneut durchgeführt werden musste. Eine Optimierung zur Einbringung der Gruppe C mittels Suzuki-Kupplung war bisher erfolglos. Da man für die Derivatisierung der Gruppe C bisher durch die limitierte kommerzielle Verfügbarkeit verschiedener 1H-Pyrazol-5-Amine beschränkt ist, besteht hier Bedarf an einer Optimierung, sodass ein breiteres Spektrum an Derivaten in dieser Position synthetisiert und getestet werden kann, denn diese Gruppe ermöglicht die Erhöhung der DegS-Spezifität der Inhibitoren.

6 Summary and Outlook

Because of increasing resistance of bacteria against antibiotics new small molecules for disabling or bypassing defence mechanisms of pathogens or for addressing new protein targets are urgently required. It is known that HtrA-proteases play crucial roles in many biologically relevant processes. The stress sensor DegS, a prokaryotic HtrA protease located in the periplasm, has so far not been investigated as a target for chemotherapy development. This is surprising as the stress sensor DegS is the initial factor involved in periplasmatic stress response consisting of DegS-mediated sensing of unfolded or misfolded proteins in the periplasm, resulting in its proteolytic activation. DegS-mediated proteolysis of RseA results in a cascade of reactions that finally leads to the release of σ^E in the cytoplasm that induces transcription of stress genes. Because of its essential functions under stress conditions as well as the fact that DegS is found in many Gram-negative bacteria, DegS might represent a potential target for the development of new antibiotics against infectious disease. This hypothesis was tested in this thesis via the development of DegS inhibitors for biological application.

As a starting point, the LDC in Dortmund had performed prior to the experimental works of this thesis a high-throughput screen for identifying DegS inhibitors. From this screening campaign, they identified 2-(4-aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amine (**1**) as a potential DegS inhibitor in biochemical and *in vivo* assays. To improve the rather weak inhibition of DegS and its specificity, derivatives of this small molecule structure were synthesized and biochemically tested for DegS inhibition, enabling insights into the underlying structure-activity-relationships of DegS inhibition. The 4-aminopiperidine substituent attached to the pyrazolotriazine thereby turned out to be essential for the inhibitory effect as any modification of this group led to inactive derivatives. The same effect was observed upon modification of the pyrazolotriazine scaffold. In contrast, the isopropyl group was turned out to be modifiable under retention of bioactivity. Substitution by large nonpolar groups improved the inhibitory effect and led to a higher DegS specificity. As a major drawback of LDC compound **1** as well as of structurally related compounds is their off-target inhibition of cyclin dependent kinases. This discovery represents an important step for improving inhibitor specificity. Substitution of isopropyl by an 4-ethoxy phenyl led to an inhibitor 2-(4-aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-

ethoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amine (**42**) that displayed only weak inhibitory potential (with IC_{50} values $> 30 \mu\text{M}$) for tested kinases.

The modification of the benzylamine group allowed to gain insights into the structure-activity relationships at this site of the inhibitor. It turned out that large nonpolar groups improve the inhibition of DegS. Furthermore, it was found that the *meta* position on the benzene ring represents the most effective site for substitutions for improving inhibition. This finding enabled the synthesis of the most potent DegS Inhibitor so far: 2-(4-aminopiperidin-1-yl)-*N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amine (**17**). For this inhibitor, DegS inhibition rates could be improved from initial $200 \mu\text{M}$ for inhibitor **1** to $2.5 \mu\text{M}$ for inhibitor **17**. In the second biochemical assay, an improvement of the IC_{50} value of $150 \mu\text{M}$ for compound **1** to an IC_{50} value of $51.7 \mu\text{M}$ for compound **17** was observable. However, while large hydrophobic groups improve the inhibitory effect, they also decrease the pharmacological properties. This requires careful optimization of the binding affinity via increase of hydrophobicity as these inhibitors *in vivo* might be rather inactive, e.g. because their effective concentration in the periplasm in which DegS is located might be rather low. Overall, 27 derivatives of Inhibitor **1** were synthesized and tested. All derivatives with a hydrophobic group in *meta* position attached to the benzene have shown a better inhibitory effect than inhibitor **1** in biochemical assays.

In additional experiments performed by the Suisse-based company BioVersys, it could be shown that colistin and a subset of the synthesized inhibitors display a desirable synergistic behaviour. For further improvement of the inhibitors, it will however be highly desirable to identify the precise binding site which should allow structure-based inhibitor design. Experiments with an azide tagged derivative that may allow photocrosslinking experiments to map the binding site were tried in this thesis but turned out to be unsuccessful so far. Accordingly, first attempts to gain a co-crystal structure of inhibitor **17** and DegS were undertaken by collaborators but have not been working out so far within the time frame of this thesis.

An optimization of the synthesis route that may allow to generate structurally more complex benzylamine derivatives via a late-stage introduction at an amino group in *meta* position of the benzene ring turned out to be promising. The modification of the synthesis route enabled a late stage coupling of an acyl chloride to a *meta*-amino derivative. As this approach should also be compatible with the attachment of carboxylic acids via peptide coupling reagents, this alternative strategy represents a real

advance as the unfavourable POCl_3 reaction is no longer required in the synthesis of every derivative. Unfortunately, a second optimization approach for derivatization of the group C residues by a Suzuki coupling approach could not be established within this thesis. This limits the derivatisation of group C to those commercially available and POCl_3 -stable 1H-pyrazolo-5-amines. As modifications of this group however turned out to be more DegS specific, the development of an alternative approach in the future would be highly desirable.

7 Experimenteller Teil

7.1 Arbeitsmaterialien und Instrumente

7.1.1 Chemikalien

Es wurden Reagenzien und Lösungsmittel der Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Acros, ABCR, Alfa Aesar, Riedel de Hën, Iris, Carl Roth, Novabiochem und Fisher Scientific ohne weitere Reinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden in der besten verfügbaren Qualität von den gleichen Anbietern bezogen.

7.1.2 Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung von Produkten wurde in Glassäulen mit Kieselgel der Firma Acros (Partikelgröße 35 – 70 μm) durchgeführt.

7.1.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Kieselgel-beschichteten Aluminium-Platten (60 F₂₅₄) der Firma Merck durchgeführt. Das Detektieren der Spots erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder 366 nm oder durch Anfärben der DC-Platten mit einer Kaliumpermanganat-Lösung (1.5 g KMnO_4 , 10 g K_2CO_3 , 1.25 ml 10 % aq. NaOH in 200 ml Wasser) und anschließendem Erwärmen, um die Spots sichtbar zu machen. Die verwendeten Laufmittel und die ermittelten R_f -Werte sind in den entsprechenden Arbeitsvorschriften aufgeführt.

7.1.4 Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)

Die LC/MS-Analysen wurden an einem LC/MS-System der Firma Thermo Scientific mit einer Eclipse XDB-C18 (Partikelgröße 5 μm) Säule von Agilent (Signaldetektion bei 210 nm) und einem Thermo Scientific LCQ FleetTM ESI-Spektrometer durchgeführt. Für die Analysen im positiven Modus wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel B (0.1 % Ameisensäure in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure in Wasser) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Für die Analysen im negativen Modus wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel C (5 mM NH_4OAc

in Acetonitril) in Lösungsmittel D (5 mM NH₄OAc in Wasser) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Für beide Modi wurde der gleiche Gradient gefahren.

Gradient für den positiven Modus: 0 min (10 % B) → 1 min (10 % B) → 10 min (100 % B) → 12 min (100 % B) → 15 min (10 % B).

Gradient für den negativen Modus: 0 min (10 % C) → 1 min (10 % C) → 10 min (100 % C) → 12 min (100 % C) → 15 min (10 % C).

7.1.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Reinigung der Produkte erfolgte an einem HPLC-System von Shimadzu auf einer RP-C₁₈-Säule von Phenomenex (Phenomenex Luna® 5 µm C18(2), 100 x 21.20 mm) mit einer Signaldetektion bei 210 und 254 nm. Es wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel B (0.1 % TFA in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0.1 TFA in Wasser) bei einer Flussrate von 25 ml/min eingesetzt.

7.1.6 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung der Produkte wurde an einem Gefriertrockner ALPHA 2-4 LD plus (CHRIST) bei einer Eiskondensatortemperatur von -80 °C durchgeführt. Die wässrige Lösung der zu trocknenden Substanzen wurde mit flüssigem Stickstoff in einer rotierenden Bewegung eingefroren, um eine möglichst große Eis-Oberfläche zu erhalten. Der Trocknungsprozess wird durch eine große Eis-Oberfläche und eine geringe Eis-Dicke begünstigt. Nach ca. 24 h waren die Substanzen meist komplett lyophilisiert.

7.1.7 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance II 400 (400 MHz für ¹H-NMR und 100 MHz für ¹³C-NMR) aufgenommen und auf die charakteristischen Signale des undeuterten Lösungsmittels kalibriert. Die ¹H-NMR-Spektren sind wie folgt angegeben: Die chemische Verschiebung δ in ppm, die Multiplizität (s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; dd, Dublett von Dublett; dt, Dublett von Triplett; q, Quartett; m, Multiplett), der Kopplungskonstante J in Hz und der Anzahl der Protonen H.

Für die ¹³C-NMR-Spektren wird die chemische Verschiebung angegeben.

7.2 Allgemeine Methoden

7.2.1 Methode A: Synthese der Pyrazolotriazine

Zu einer im Eisbad gekühlten Lösung eines 1H-Pyrazol-5-Amin-Derivates (1 eq.) in DCM wurde tropfenweise eine Lösung aus Ethoxycabonylisothiocyanat (1 eq.) in DCM hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h gerührt, wobei man es sich auf Raumtemperatur erwärmen ließ. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in ACN aufgenommen. K_2CO_3 (1.2 eq.) wurde hinzugegeben und 2 h bei 90 °C gerührt. Mit verdünnter AcOH wurde die Lösung neutralisiert. Das organische Lösungsmittel wurde entfernt und der wässrige Rückstand mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel einrotiert. Das Produkt wurde am Hochvakuum getrocknet.

7.2.2 Methode B: Methylierung mit Methyljodid

Das Edukt (1 eq.) wurde in Ethanol und 2 N NaOH (2:1) gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad gekühlt und Methyljodid (1-2 eq.) tropfenweise hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Mit wenigen Tropfen NH_3 wurde überschüssiges Methyljodid gequench und die dann basische Lösung mit 6 N HCl angesäuert. Das Lösungsmittel wurde destillativ unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt am Hochvakuum getrocknet. Falls nötig wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt.

7.2.3 Methode C: Chlorierung mit Phosphorylchlorid

Die zu chlorierende Carbonylverbindung (1 eq.) wurde in 2-4 ml $POCl_3$ gelöst und N,N-Diethylanilin (3 eq.) hinzugegeben. Es wurde 2-18 h bei 90 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wurde umgehend weiter umgesetzt.

7.2.4 Methode D: Substitution des Chlorids durch ein Amin

Die Chlorverbindung wurde in 3-7 ml ACN gelöst und mit DIPEA (5-20 eq.) versetzt. Das Amin wurde hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 17-72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit EtOAc verdünnt und mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt.

7.2.5 Methode E: Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoesäure

Der zu oxidierende Thioether (1 eq.) wurde in DCM gelöst und *m*CPBA (2-4 eq.) wurde hinzugegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde erneut *m*CPBA (1-2 eq.) hinzugegeben und weitere 0.5-2 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM verdünnt und mit 2 N NaOH und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde am Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung, falls notwendig, erfolgte säulenchromatographisch.

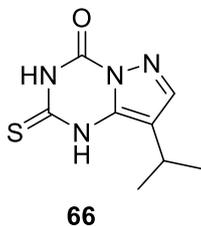
7.2.6 Methode F: Substitution des Methylsulfons

Das Sulfon (1 eq.) wurde in 1-3 ml NMP gelöst und das Amin (3 eq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde 18-20 h bei 120 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Hochvakuum durch zusätzliches Erhitzen bei 60 °C entfernt. Falls notwendig wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt.

7.3 Versuchsvorschriften

7.3.1 Synthese der Derivate mit Modifizierungen in Position B

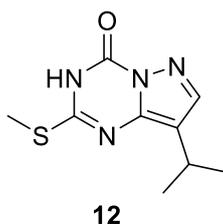
8-Isopropyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**66**)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 4-Isopropyl-1H-pyrazol-5-amin (500 mg, 4.00 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylthiocyanat (472.2 μ l, 4.00 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (662.8 mg, 4.80 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Das Produkt **66** konnte als gelber Feststoff gewonnen werden. Eine Reinigung des Produktes war nicht notwendig.

1H -NMR: (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 10.69 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 2.94 – 2.82 (m, 1H), 1.17 (d, J = 6.9 Hz, 6H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 170.99, 147.00, 144.74, 143.07, 111.69, 23.40, 22.85; LC/MS (ESI): t_R = 5.05 min, m/z 211.02 $[M+H]^+$, 210.06 berechnet für $C_8H_{10}N_4OS$.

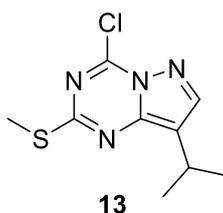
8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. 8-Isopropyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**66**, 4.00 mmol, 1 eq.) wurde in EtOH/2 N NaOH (16 ml, 3:1) gelöst und Methyljodid (248.8 μ l, 4.00 mmol, 1 eq.) hinzugegeben. Nach Ansäuern mit 6 N HCl wurde mit EtOAc extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 1:1). Es konnten 443.2 mg (1.98 mmol, 49 %) des Produktes **12** als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 1:1): $R_f = 0.25$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.90$ (s, 1H), 3.01 (p, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.54 (s, 3H), 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 155.32, 144.21, 144.12, 143.79, 116.73, 23.12, 22.96, 12.96; LC/MS (ESI): $t_R = 7.07$ min, m/z 225.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 224.07 berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$.

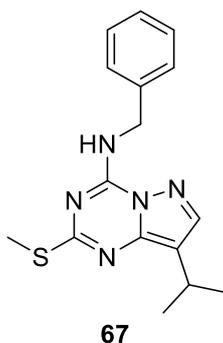
4-Chloro-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (13)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 100 mg, 0.45 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Diethylanilin (214.9 μl , 1.34 mmol, 3 eq) in POCl_3 (3 ml) gelöst. Das braune Öl wurde am Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung umgehend weiter umgesetzt.

LC/MS (ESI): $t_R = 10.09$ min, m/z 243.01 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 242.04 berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{S}$.

N-Benzyl-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (67)

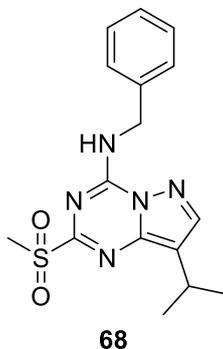


Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode D durchgeführt. 4-Chloro-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (**13**, 0.33 mmol, 1 eq.) wurde in ACN (3 ml) und DIPEA (291.5 μl , 1.67 mmol, 5 eq.) gelöst. Als Nukleophil wurde Benzylamin (109.7 μl , 1.00 mmol, 3 eq.) eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH/EtOAc = 15:1) konnte das Produkt **67** mit einer Ausbeute von 82 mg (0.26 mmol, 78 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 15:1): $R_f = 0.33$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9.32$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.41 – 7.20 (m, 5H), 4.65 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.04 (p, $J =$

6.9 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); LC/MS (ESI): $t_R = 11.06$ min, m/z 314.27 $[M+H]^+$, 313.14 berechnet für $C_{16}H_{19}N_5S$.

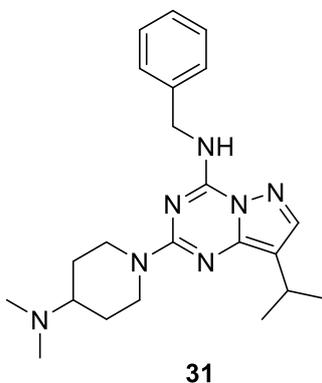
***N*-Benzyl-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (68)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-Benzyl-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**67**, 71.1 mg, 0.23 mmol, 1 eq) mit *m*CPBA (117.4 mg, 0.68 mmol, 3 eq.) in DCM (3 ml) umgesetzt. Das Produkt **68** wurde als weißer Feststoff isoliert, der keine weitere Reinigung benötigte. Es konnten 72.7 mg (0.21 mmol, 92 %) gewonnen werden.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 10.01$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.48 – 7.37 (m, 2H), 7.33 (dd, $J = 8.2, 6.5$ Hz, 2H), 7.30 – 7.26 (m, 1H), 4.76 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.14 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.31 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); LC/MS (ESI): $t_R = 8.71$ min, m/z 346.19 $[M+H]^+$, 345.13 berechnet für $C_{16}H_{19}N_5O_2S$.

***N*-Benzyl-2-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (31)**

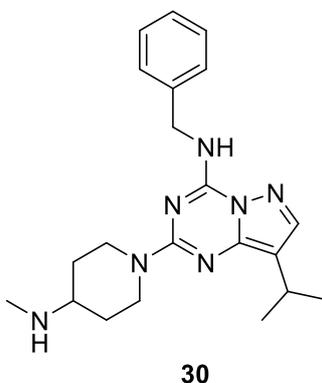


Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**68**, 40 mg, 0.12 mmol, 1 eq) wurden mit 4-(Dimethylamino)-piperidin (44.6 mg, 0.35 mmol, 3 eq.) über 18 h umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt

an der HPLC gereinigt. Es konnten 9.8 mg (0.025 mmol, 22 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.97 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 2H), 7.36 – 7.28 (m, 2H), 7.27 – 7.22 (m, 1H), 4.79 (d, J = 13.6 Hz, 2H), 4.61 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.40 (ddd, J = 11.9, 8.2, 4.7 Hz, 1H), 2.97 – 2.88 (m, 1H), 2.87 – 2.78 (m, 2H), 2.73 (d, J = 4.8 Hz, 6H), 2.06 – 1.95 (m, 2H), 1.45 (dd, J = 12.0, 4.2 Hz, 2H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 6.40 min, m/z 394.29 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 393.26 berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_7$.

***N*-Benzyl-8-isopropyl-2-(4-(methylamino)piperidin-1-yl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (30)**

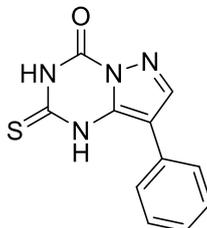


Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**68**, 40 mg, 0.12 mmol, 1 eq) wurden mit 4-*N*-Boc-4-*N*-methyl-aminopiperidin (74.5 mg, 0.35 mmol, 3 eq.) über 18 h umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde die Boc-Schutzgruppe über 3 h bei Raumtemperatur in 3 ml TFA abgespalten. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es konnten 55.1 mg (0.11 mmol, 96 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.03 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 13.5 Hz, 2H), 4.61 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.24 (dt, J = 11.5, 5.8 Hz, 1H), 3.01 – 2.82 (m, 2H), 2.57 (t, J = 5.3 Hz, 3H), 2.07 – 1.93 (m, 2H), 1.43 – 1.29 (m, 2H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 158.39, 157.96, 155.34, 148.25, 146.37, 143.04, 138.98, 128.25, 127.97, 126.98, 110.78, 55.26, 43.24, 41.94, 29.21, 27.21, 22.58; LC/MS (ESI): t_R = 5.88 min, m/z 380.31 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 379.25 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7$.

7.3.2 Synthese der Derivate mit Modifizierungen in Position C und des Pyrazolotriazin-Grundgerüsts

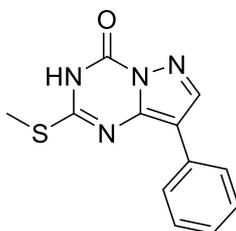
8-Phenyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**69**)



69

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 3-Amino-4-phenyl-1H pyrazol (100 mg, 0.63 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylthiocyanat (74 μ l, 0.63 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (104 mg, 0.75 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Nach 2 h Erhitzen wurde das Lösungsmittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt. LC/MS (ESI): t_R = 5.83 min, m/z 245.11 $[M+H]^+$, 244.04 berechnet für $C_{11}H_8N_4OS$.

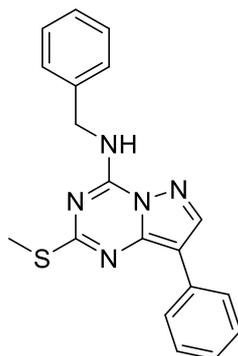
2-(Methylthio)-8-phenylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**70**)



70

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. 8-Phenyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**69**, 0.63 mmol, 1 eq.) wurde in EtOH/2 N NaOH (9 ml, 3.5:1) gelöst und Methyljodid (39 μ l, 0.63 mmol, 1 eq.) hinzugegeben. Nach Ansäuern der Reaktionsmischung mit 6 N HCl wurde mit EtOAc extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 8.17 (s, 1H), 7.40 – 7.27 (m, 4H), 7.09 (ddt, J = 8.7, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H); LC/MS (ESI): t_R = 7.32 min, m/z 259.03 $[M+H]^+$, 258.06 berechnet für $C_{12}H_{10}N_4OS$.

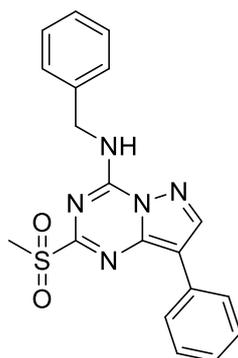
***N*-Benzyl-2-(methylthio)-8-phenylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (71)**

71

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Dazu wurde 2-(Methylthio)-8-phenylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**70**, 0.63 mmol, 1 eq.) in POCl₃ (3 ml) und *N,N*-Diethylanilin (299 μ l, 1.88 mmol, 3 eq.) gelöst.

Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Es wurden Benzylamin (205.4 μ l, 1.88 mmol, 3 eq.) und DIPEA (547.1 μ l, 3.14 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Die Reaktionszeit wurde jedoch um 3 h bei 90 °C verlängert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 7:1), sodass 141.8 mg (0.4 mmol, 65 %) des hellgelben Feststoffes isoliert werden konnten.

TLC (CH/EtOAc = 7:1): R_f = 0.25; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.52 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 4H), 7.34 (s, 2H), 7.21 (s, 2H), 4.70 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H).

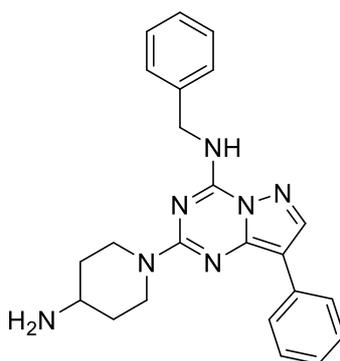
***N*-Benzyl-2-(methylsulfonyl)-8-phenylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (72)**

72

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Methode E. *N*-Benzyl-2-(methylthio)-8-phenylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**71**, 141.8 mg, 0.41 mmol, 1 eq.) und *m*CPBA (211 mg, 1.22 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Es konnten 124.2 mg (0.33 mmol, 80 %) des reinen Produktes gewonnen werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.17 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.47 (m, 4H), 7.31 (m, 4H), 4.80 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160.61, 149.65, 144.57, 142.49, 137.77, 130.91, 128.70, 128.38, 127.79, 127.21, 126.73, 125.91, 111.41, 55.14, 43.83; LC/MS (ESI): t_R = 8.87 min, m/z 380.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 379.11 berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-N-benzyl-8-phenylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (38)



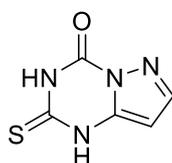
38

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-2-(methylsulfonyl)-8-phenylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**72**, 124.4 mg, 0.33 mmol, 1 eq.) wurde mit 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (295 mg, 1.47 mmol, 4.5 eq.) umgesetzt.

Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe in 4 N HCl in Dioxan (3 ml) über 1.5 h bei Raumtemperatur abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 86.2 mg (0.17 mmol, 51 %) des Produktes **38** als hellgelber Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.15 (t, J = 6.24 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.00 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.92 (s, 3H), 7.42 (m, 2H), 7.34 (m, 4H), 7.30 – 7.21 (m, 1H), 7.13 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 13.4 Hz, 2H), 4.65 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.32 (m, 1H), 3.01 (t, J = 11.8 Hz, 2H), 1.97 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 1.40 (m, 2H); LC/MS (ESI): t_R = 5.88 min, m/z 400.37 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 399.22 berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_7$.

2-Thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (73)

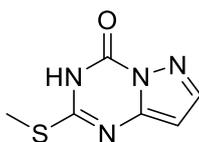


73

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 3-Aminopyrazol (100 mg, 1.20 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylisothiocyanat (142 μ l, 1.20 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (200 mg, 1.44 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Es konnten 36 mg (0.21 mmol, 18 %) des Produktes **73** als hellgelber Feststoff gewonnen werden.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 8.34 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 6.06 (d, J = 3.1 Hz, 1H).

2-(Methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**74**)

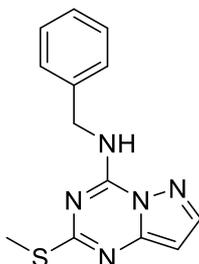


74

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurde 2-Thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**73**, 15 mg, 0.09 mmol, 1 eq.) mit Methyljodid (5.1 μ l, 0.09 mmol, 1 eq.) umgesetzt.

LC/MS (ESI): t_R = 6.40 min, m/z 182.89 $[M+H]^+$, 182.03 berechnet für $C_6H_6N_4OS$.

N-Benzyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**75**)



75

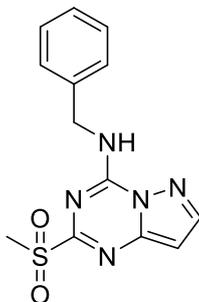
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 2-(Methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**74**, 197.2 mg 1.08 mmol, 1 eq.) in $POCl_3$ (4 ml) und N,N -Diethylanilin (451.0 μ l, 3.25 mmol, 3 eq.) gelöst.

Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (354 μ l, 3.25 mmol, 3 eq.) und DIPEA (920 μ l, 5.41 mmol, 5 eq.) hinzugegeben. Das Produkt **75** wurde säulenchromatographisch mit einem Lösungsmittelgradienten gereinigt ($CH/EtOAc$ = 30:1 \rightarrow $CH/EtOAc$ = 3:1), sodass 40.8 mg (0.15 mmol, 14 %) des roten Feststoffes isoliert werden konnten.

TLC ($CH/EtOAc$ = 2:1): R_f = 0.63; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.83 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.37 – 7.28 (m, 5H), 6.21 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.79 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.55 (s,

3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 145.56, 137.17, 130.05, 129.81, 129.23, 128.53, 128.39, 128.03, 94.98, 44.87, 16.64; LC/MS (ESI): t_{R} = 8.92 min, m/z 272.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 271.09 berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{S}$.

***N*-Benzyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (76)**

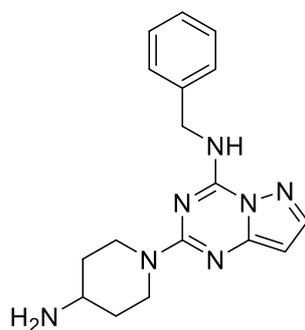


76

Die Oxidation erfolgte nach Methode E. Es wurde *N*-Benzyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**75**, 40.8 mg, 0.15 mmol, 1 eq) mit *m*CPBA (77.9 mg, 0.45 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Es konnten 5.2 mg (0.02 mmol, 11 %) des Produktes als hellgelber Feststoff gewonnen werden.

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.35 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.47 – 7.20 (m, 5H), 6.76 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 197.80, 187.36, 184.94, 184.30, 175.40, 166.18, 165.58, 165.11, 136.08, 81.69; LC/MS (ESI): t_{R} = 7.04 min, m/z 304.01 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.08 berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (33)



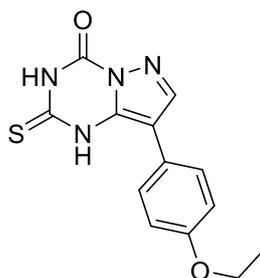
33

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**76**, 5.2 mg, 0.02 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (15.4 mg, 0.08 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt.

Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe in 4 N HCl in Dioxan (2 ml) über 2.5 h bei Raumtemperatur abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 2.1 mg (4.8 μ mol, 28 %) des Produktes **33** als orangener Feststoff isoliert.

LC/MS (ESI): t_R = 4.52 min, m/z 324.12 $[M+H]^+$, 323.19 berechnet für $C_{17}H_{21}N_7$.

8-(4-Ethoxyphenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (77)

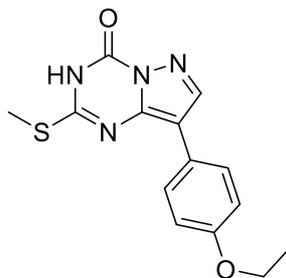


77

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 4-(4-Ethoxyphenyl)-1H-pyrazol-5-amin (100 mg, 0.49 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylisothiocyanat (58 μ l, 0.49 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (81.6 mg, 0.59 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Das Produkt konnte als hellgrüner Feststoff isoliert werden.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10.86 (s, 1H), 7.80 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.08 (s, 1H), 4.07 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.07 (s, 1H), 1.34 (t, J = 7.0 Hz, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 158.22, 157.73, 144.62, 144.37, 127.84, 114.08, 103.39, 98.70, 97.60, 63.08, 14.68; LC/MS (ESI): t_R = 6.75 min, m/z 289.04 $[M+H]^+$, 288.07 berechnet für $C_{13}H_{12}N_4O_2S$.

8-(4-Ethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (78)



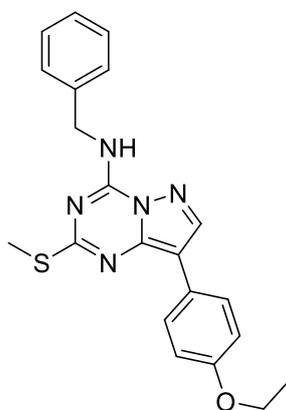
78

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurde 8-(4-Ethoxyphenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (77,

0.49 mmol, 1 eq.) mit Methyljodid (30.8 μ l, 0.49 mmol, 1 eq.) umgesetzt. 140.7 mg (0.47 mmol, 95 %) wurden als brauner Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.92 – 7.85 (m, 2H), 7.05 – 6.99 (m, 2H), 6.81 (s, 1H), 4.08 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.35 (t, J = 7.0 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 160.78, 159.63, 143.44, 127.53, 124.46, 114.48, 93.96, 63.21, 14.37, 12.53; LC/MS (ESI): t_R = 7.85 min, m/z 303.05 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 302.08 berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$.

N-Benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (79)

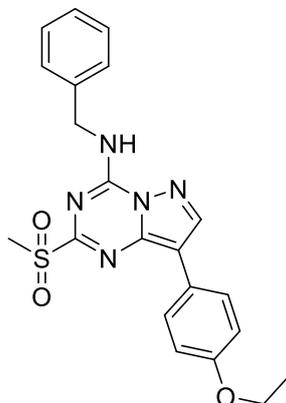


79

Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-(4-Ethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**78**, 140.7 mg, 0.47 mmol, 1 eq) und N,N-Diethylanilin (223 μ l, 1.40 mmol, 3 eq.) in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (203.3 μ l, 1.86 mmol, 4 eq.) und DIPEA (810 μ l, 4.65 mmol, 10 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 7:1). Es konnten 44 mg (0.11 mmol, 24 %) als roter Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 7:1): R_f = 0.28; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.26 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.26 (m, 1H), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 4.70 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.09 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.35 (t, J = 7.0 Hz, 3H); LC/MS (ESI): t_R = 11.14 min, m/z 392.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 391.15 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{OS}$.

***N*-Benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (80)**

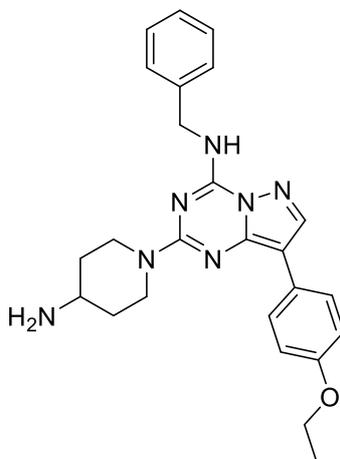


80

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-Benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**79**, 44 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (58 mg, 0.34 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als grüner Feststoff mit einer Ausbeute von 26 mg (0.06 mmol, 55 %) isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.05 – 7.99 (m, 2H), 7.49 – 7.45 (m, 2H), 7.39 – 7.32 (m, 2H), 7.30 – 7.26 (m, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.10 – 7.04 (m, 2H), 4.80 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.10 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 1.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (42)



42

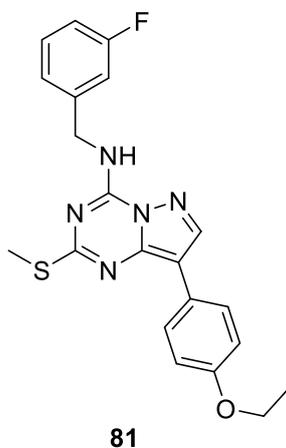
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-(4-ethoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**80**, 26 mg,

0.06 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (55 mg, 0.28 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt.

Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe in 4 N HCl in Dioxan (2 ml) über 2.5 h bei Raumtemperatur abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 19.6 mg (44.2 μ mol, 72 %) des Produktes **42** als lilafarbener Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.95 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.91 – 7.86 (m, 5H), 7.44 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.37 – 7.28 (m, 2H), 7.30 – 7.21 (m, 1H), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 4.64 (m, 5H), 4.08 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.38 – 3.23 (m, 1H), 3.01 – 2.88 (m, 2H), 1.92 (d, J = 9.9 Hz, 2H), 1.34 (t, J = 7.0 Hz, 3H), $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 160.00, 151.39, 148.64, 139.10, 128.28, 127.77, 127.57, 127.06, 124.16, 114.47, 99.71, 87.52, 63.68, 47.80, 43.82, 41.65, 29.50, 14.62; LC/MS (ESI): t_R = 6.15 min, m/z 444.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 443.24 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$.

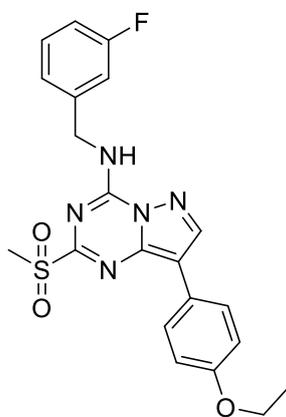
8-(4-Ethoxyphenyl)-*N*-(3-fluorobenzyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**81**)



Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-(4-Ethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**78**, 133.7 mg, 0.48 mmol, 1 eq) und *N,N*-Diethylanilin (231.2 μ l, 1.45 mmol, 3 eq.) in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 3-Fluorobenzylamin (120 μ l, 0.87 mmol, 1.9 eq.) und DIPEA (392.4 μ l, 2.25 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 3:1). Es konnten 128.9 mg (0.32 mmol, 70 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 3:1): $R_f = 0.75$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9.27$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.99 – 7.91 (m, 2H), 7.38 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 7.17 – 7.06 (m, 1H), 7.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 4.71 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.08 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.35 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 166.44, 159.81, 155.54, 149.82, 146.81, 130.21, 127.80, 124.30, 123.43, 114.75, 114.42, 114.20, 114.02, 90.41, 63.19, 42.30, 14.65, 13.66$; LC/MS (ESI): $t_R = 11.05$ min, m/z 410.39 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 409.14 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{OS}$.

8-(4-Ethoxyphenyl)-*N*-(3-fluorobenzyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (82)

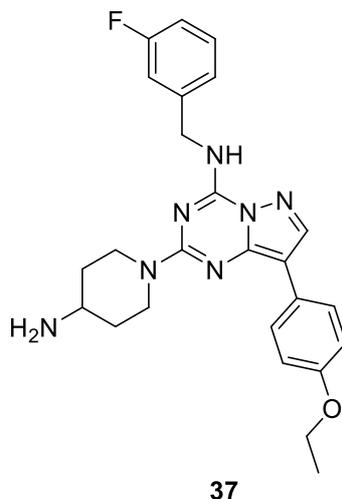


82

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde 8-(4-Ethoxyphenyl)-*N*-(3-fluorobenzyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**81**, 128.9 mg, 0.32 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (326.2 mg, 1.89 mmol, 6 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als grüner Feststoff mit einer Ausbeute von 117.8 mg (0.27 mmol, 85 %) isoliert werden.

LC/MS (ESI): $t_R = 9.31$ min, m/z 442.46 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 441.13 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{O}_3\text{S}$.

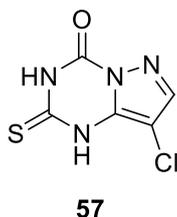
2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-(4-ethoxyphenyl)-*N*-(3-fluorobenzyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (37)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. 8-(4-Ethoxyphenyl)-*N*-(3-fluorobenzyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**82**, 117.8 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (240.6 mg, 1.20 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe in TFA (2 ml) über 2.5 h bei Raumtemperatur abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 41.9 mg (72.8 μ mol, 27 %) des Produktes **37** als weißer Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.97 = (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.8 Hz, 5H), 7.37 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.31 – 7.22 (m, 2H), 7.13 – 7.03 (m, 1H), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 4.71 – 4.57 (m, 4H), 4.08 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.39 – 3.20 (m, 1H), 2.94 (t, J = 11.9 Hz, 2H), 1.97 – 1.84 (m, 2H), 1.35 (t, J = 7.0 Hz, 5H); LC/MS (ESI): t_R = 6.28 min, m/z 462.27 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 461.23 berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{FN}_7\text{O}$.

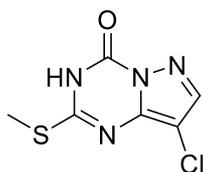
8-Chloro-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (57)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 4-Chloro-1H-pyrazol-3-ylamin (150 mg, 1.28 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylthiocyanat (150.8 μ l, 1.28 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (211 mg, 1.53 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Das Produkt **57** konnte als Feststoff isoliert werden.

LC/MS (ESI): $t_R = 3.62$ min, m/z 203.02 $[M+H]^+$, 201.97 berechnet für $C_5H_3ClN_4OS$.

8-Chloro-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**58**)

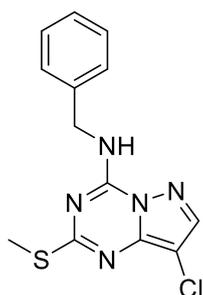


58

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurde 8-Chloro-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**57**, 1.28 mmol, 1 eq.) mit Methyljodid (87.8 μ l, 1.40 mmol, 1.1 eq.) umgesetzt. 212.4 mg (0.98 mmol, 77 %) des Produktes wurden als brauner Feststoff isoliert.

LC/MS (ESI): $t_R = 5.98$ min, m/z 216.98 $[M+H]^+$, 215.99 berechnet für $C_6H_5ClN_4OS$.

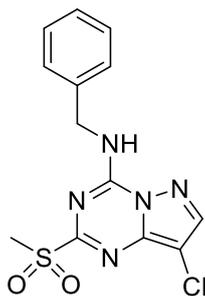
N-Benzyl-8-chloro-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**60**)



60

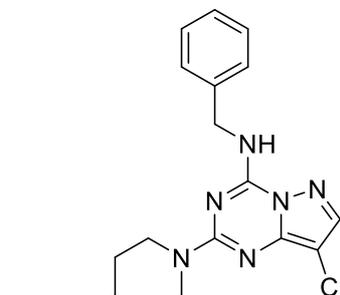
Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-Chloro-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**58**, 1.28 mmol, 1 eq) und N,N-Diethylanilin (609 μ l, 3.83 mmol, 3 eq.) in $POCl_3$ (4 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (1.11 ml, 10.21 mmol, 8 eq.) und DIPEA (1.77 ml, 10.21 mmol, 8 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1). Es konnten 87.4 mg (0.29 mmol, 23 %) als dunkelgrüner Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 3:1): $R_f = 0.59$; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 9.60$ (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.43 – 7.20 (m, 5H), 4.68 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.49 (s, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 167.88$, 147.36, 144.37, 143.22, 138.06, 128.36, 127.46, 127.17, 95.35, 43.50, 13.69; LC/MS (ESI): $t_R = 9.83$ min, m/z 306.19 $[M+H]^+$, 305.05 berechnet für $C_{13}H_{12}ClN_5S$.

***N*-Benzyl-8-chloro-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (61)****61**

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-Benzyl-8-chloro-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**60**, 87.4 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (148.3 mg, 0.86 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als grüner Feststoff isoliert werden.

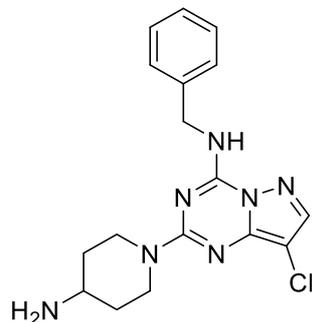
LC/MS (ESI): $t_R = 7.78$ min, m/z 338.05 $[M+H]^+$, 337.04 berechnet für $C_{13}H_{12}ClN_5O_2S$.

***tert*-Butyl (1-(4-(benzylamino)-8-chloropyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbammat (62)****62**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-chloro-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**61**, 87.4 mg, 0.29 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (332 mg, 1.66 mmol, 5.8 eq.) wurden eingesetzt. Das Produkt **62** wurde direkt weiter umgesetzt.

TLC (CH/EtOAc = 3:1): $R_f = 0.35$; LC/MS (ESI): $t_R = 10.26$ min, m/z 485.01 $[M+H]^+$, 457.20 berechnet für $C_{22}H_{28}ClN_7O_2$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-N-benzyl-8-chloropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (36)

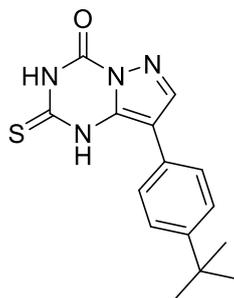


36

tert-Butyl (1-(4-(benzylamino)-8-chloropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbamat (**62**, 0.29 mmol) wurde über 2 h in 4 N HCl in Dioxan (1.5 ml) bei Raumtemperatur gerührt. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 8.9 mg (19 μ mol, 25 %) des Produktes **36** als weißer Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.22 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.83 (s, 2H), 7.40 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.25 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 4.73 – 4.58 (m, 4H), 3.37 – 3.24 (m, 1H), 2.95 (t, J = 12.8 Hz, 2H), 1.93 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 1.42 – 1.28 (m, 2H); LC/MS (ESI): t_R = 5.43 min, m/z 385.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 357.15 berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_7$.

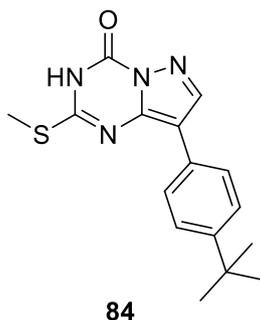
8-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (83)



83

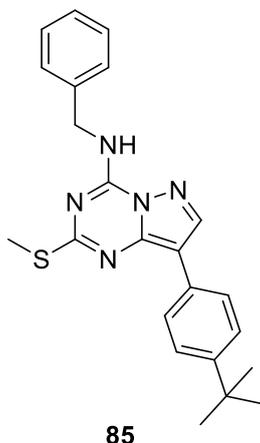
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 4-(4-*tert*-Butylphenyl)-1H-pyrazol-3-amin (100 mg, 0.46 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylthiocyanat (54.8 μ l, 0.46 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (77 mg, 0.56 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Das Produkt **83** konnte als Feststoff isoliert werden.

LC/MS (ESI): t_R = 10.56 min, m/z 301.05 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 300.10 berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$.

8-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (84)

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurden 8-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-2-thio-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**83**, 0.46 mmol, 1 eq.) und Methyljodid (32 μ l, 0.51 mmol, 1.1 eq.) eingesetzt. Das Produkt **84** wurde als Feststoff isoliert.

LC/MS (ESI): $t_R = 9.42$ min, m/z 315.14 $[M+H]^+$, 314.12 berechnet für $C_{16}H_{18}N_4OS$.

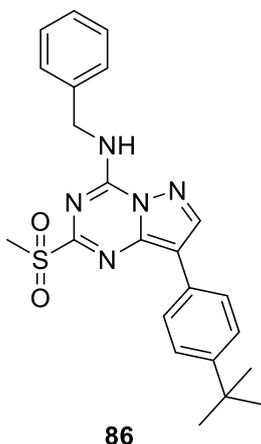
***N*-Benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (85)**

Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-(4-(*tert*-Butyl)phenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**84**, 0.46 mmol, 1 eq) und *N,N*-Diethylanilin (221.7 μ l, 1.39 mmol, 3 eq.) in $POCl_3$ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (151.9 μ l, 1.39 mmol, 3 eq.) und DIPEA (404.6 μ l, 2.32 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1). Es konnten 75 mg (0.19 mmol, 40 %) als hellgrüner Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): $R_f = 0.36$; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 9.49$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.48 – 7.36 (m, 4H), 7.34 (t, $J =$

7.4 Hz, 2H), 7.30 – 7.22 (m, 1H), 4.70 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.30 (s, 9H); LC/MS (ESI): $t_R = 12.15$ min, m/z 404.31 $[M+H]^+$, 403.18 berechnet für $C_{23}H_{25}N_5S$.

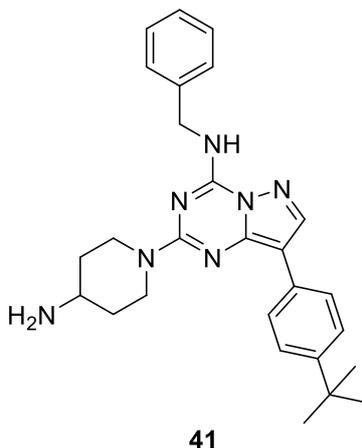
***N*-Benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (86)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-Benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**85**, 75 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (96.3 mg, 0.56 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als Feststoff isoliert werden.

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.95 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.54 – 7.17 (m, 8H), 4.76 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.85 (s, 3H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 149.04, 144.35, 143.72, 138.01, 128.35, 127.71, 127.25, 125.71, 125.45, 57.70, 43.78, 34.26, 31.09$; LC/MS (ESI): $t_R = 10.35$ min, m/z 436.17 $[M+H]^+$, 435.17 berechnet für $C_{23}H_{25}N_5O_2S$.

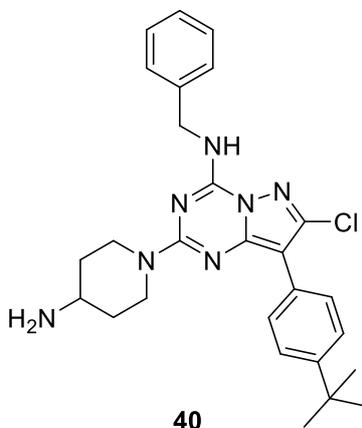
2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (41)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**86**, 0.19 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (111.8 mg, 0.56 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe in TFA (2 ml) über 2 h bei Raumtemperatur abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 70.5 mg (0.15 mmol, 83 %) des Produktes **41** als hellbrauner Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.97 = 9.12 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.49 – 7.21 (m, 7H), 4.73 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 4.64 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.33 (m, 1H), 3.00 (t, $J = 11.9$ Hz, 2H), 2.02 – 1.91 (m, 2H), 1.49 – 1.33 (m, 2H), 1.29 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 156.80, 148.70, 146.99, 146.76, 143.16, 139.02, 129.84, 128.22, 127.65, 125.40, 124.29, 103.76, 47.72, 43.41, 42.18, 34.11, 31.14, 29.23$; LC/MS (ESI): $t_R = 7.37$ min, m/z 456.37 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 455.28 berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_7$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-7-chloropyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**40**)

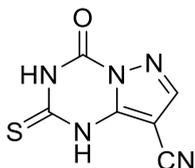


Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**86**, 0.40 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (160 mg, 0.8 mmol, 2 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde 3 h in 4 N HCl in Dioxan (3 ml) gerührt. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 10.3 mg (21.1 μmol , 5 %) des Produktes **40** als Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.97 = 9.21 – 9.09 (m, 1H), 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.30 – 7.21 (m, 1H), 7.19 – 7.07 (m, 1H), 6.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.66 (s, 4H), 3.31 (q, $J =$

7.0 Hz, 1H), 3.05 – 2.88 (m, 2H), 1.96 (s, 2H), 1.32 (s, 9H), 1.23 (s, 1H), 1.07 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H); LC/MS (ESI): $t_R = 8.42$ min, m/z 490.28 $[M+H]^+$, 489.24 berechnet für $C_{27}H_{32}ClN_7$.

4-Oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitril (**87**)

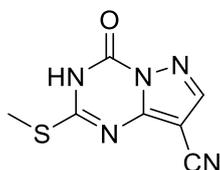


87

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 3-Aminopyrazol-4-carbonitril (100 mg, 0.93 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylthiocyanat (109.1 μ l, 0.93 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (153 mg, 1.11 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Das Produkt **87** konnte als Feststoff isoliert werden.

LC/MS (ESI): $t_R = 5.37$ min, m/z 194.00 $[M+H]^+$, 193.01 berechnet für $C_6H_3N_5OS$.

2-(Methylthio)-4-oxo-3,4-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitril (**88**)

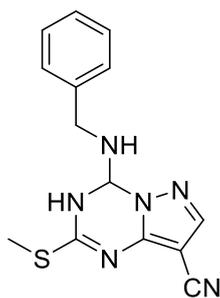


88

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurde 4-Oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitril (**87**, 0.93 mmol, 1 eq.) mit Methyljodid (63.6 μ l, 1.02 mmol, 1.1 eq.) umgesetzt. Das Produkt **88** wurde als gelber Feststoff isoliert.

LC/MS (ESI): $t_R = 5.13$ min, m/z 208.03 $[M+H]^+$, 207.02 berechnet für $C_7H_5N_5OS$.

4-(Benzylamino)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitril (**89**)

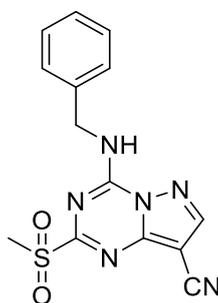


89

Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 2-(Methylthio)-4-oxo-3,4-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitril (**88**, 0.93 mmol, 1 eq) und N,N-Diethylanilin (441 μ l, 2.78 mmol, 3 eq.) in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (303.1 μ l, 2.78 mmol, 3 eq.) und DIPEA (805.6 μ l, 4.63 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1 \rightarrow CH/EtOAc = 3:1). Es konnten 29.8 mg (0.10 mmol, 11 %) als hellgrüner Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 3:1): R_f = 0.31; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.87 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.45 – 7.21 (m, 5H), 4.69 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 2.51 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 171.78, 152.10, 147.56, 146.73, 137.70, 128.40, 127.60, 127.07, 113.30, 78.45, 43.70, 13.88; LC/MS (ESI): t_R = 8.94 min, m/z 297.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 296.08 berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{S}$.

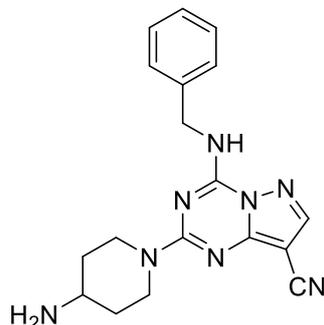
4-(Benzylamino)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitril (**90**)



90

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurden 4-(Benzylamino)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine-8-carbonitril (**89**, 29.8 mg, 0.10 mmol, 1 eq.) und *m*CPBA (52.3 mg, 0.30 mmol, 3 eq.) eingesetzt. Das Produkt konnte als Feststoff isoliert werden.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-4-(benzylamino)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-8-carbonitril (32**)**

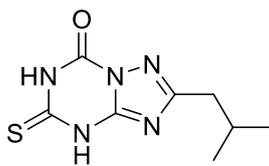


32

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. 4-(Benzylamino)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-8-carbonitril (**90**, 0.10 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (91.2 mg, 0.45 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde 2 h in 4 N HCl in Dioxan (2 ml) gerührt. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 0.2 mg (0.57 μ mol, 0.6 %) des Produktes **32** als Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.45 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.37 – 7.28 (m, 2H), 7.30 – 7.23 (m, 1H), 4.76 – 4.54 (m, 4H), 3.07 – 2.88 (m, 2H), 2.08 – 1.99 (m, 1H), 1.79 – 1.60 (m, 2H), 1.27 (m, 2H); LC/MS (ESI): t_R = 5.26 min, m/z 349.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 348.18 berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_8$.

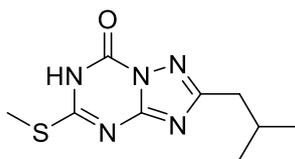
2-Isobutyl-5-thioxo-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7(4H)-on (91**)**



91

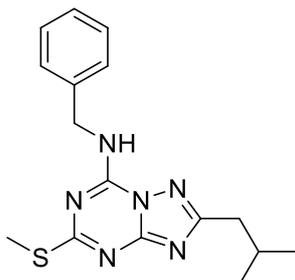
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 5-(2-Methylpropyl-4H-1,2,4-triazol-3-amin) (200 mg, 1.43 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonyliso-thiocyanat (168.3 μ l, 1.43 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (237 mg, 1.72 mmol, 1.7 eq.) eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH = 19:1 \rightarrow DCM/MeOH = 1:1) konnte das Produkt **91** als Feststoff isoliert werden.

LC/MS (ESI): t_R = 5.19 min, m/z 226.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 225.07 berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{OS}$.

2-Isobutyl-5-(methylthio)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7(6H)-on (92)

92

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurden 2-Isobutyl-5-thio-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7(4H)-on (**91**, 1.43 mmol, 1 eq.) und Methyljodid (89.4 μ l, 1.41 mmol, 1 eq.) umgesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH = 9:1) und konnte als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 63.5 mg (0.27 mmol, 19 %) isoliert werden. TLC (DCM/MeOH = 9:1): R_f = 0.37; LC/MS (ESI): t_R = 5.77 min, m/z 240.07 $[M+H]^+$, 239.08 berechnet für $C_9H_{13}N_5OS$.

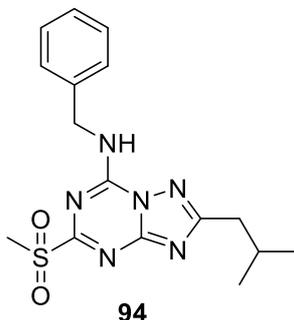
N-Benzyl-2-isobutyl-5-(methylthio)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amin (93)

93

Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 2-Isobutyl-5-(methylthio)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7(6H)-on (**92**, 63.5 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) und N,N-Diethylanilin (682 μ l, 4.29 mmol, 15.8 eq.) in $POCl_3$ (9 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (468.6 μ l, 4.29 mmol, 15.8 eq.) und DIPEA (1.25 ml, 7.15 mmol, 26.5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1). Es konnten 38.8 mg (0.12 mmol, 44 %) als gelber Feststoff isoliert werden.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 9.64 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.40 – 7.23 (m, 5H), 4.65 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 2.60 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.13 (m, 1H), 0.94 (d, J = 6.7 Hz, 6H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 172.55, 166.67, 156.82, 147.79, 138.02, 128.42, 127.62, 127.14, 113.63, 43.75, 27.34, 22.23, 23.83; LC/MS (ESI): t_R = 9.25 min, m/z 329.39 $[M+H]^+$, 328.15 berechnet für $C_{16}H_{20}N_6S$.

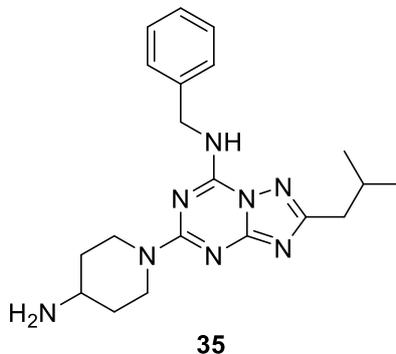
***N*-Benzyl-2-isobutyl-5-(methylsulfonyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amin (94)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurden *N*-Benzyl-2-isobutyl-5-(methylthio)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amin (**93**, 38.8 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (61.2 mg, 0.35 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgrüner Feststoff mit einer Ausbeute von 24.5 mg (68 μ mol, 58 %) isoliert werden.

LC/MS (ESI): t_R = 7.90 min, m/z 361.31 [M+H]⁺, 360.14 berechnet für C₁₆H₂₀N₆O₂S.

5-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-2-isobutyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amin (35)

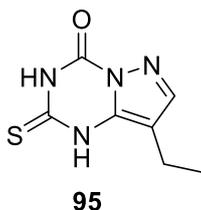


Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-2-isobutyl-5-(methylsulfonyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-7-amin (**94**, 24.5 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (61.4 mg, 0.31 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 2 h in TFA (2 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 18.2 mg (36.8 μ mol, 54 %) des Produktes **35** als hellgelber Feststoff isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.43 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 7.49 – 7.37 (m, 2H), 7.37 – 7.28 (m, 2H), 7.29 – 7.21 (m, 1H), 4.60 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 3.43 – 3.24 (m, 1H), 3.01 (t, J = 12.2 Hz, 2H), 2.54 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 2.09 (dt,

$J = 13.6, 6.8 \text{ Hz, 1H}$), $1.96 \text{ (d, } J = 12.6 \text{ Hz, 3H)}$, $1.46 - 1.28 \text{ (m, 1H)}$, $0.93 \text{ (d, } J = 6.7 \text{ Hz, 6H)}$; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 159.31, 158.37, 148.39, 138.44, 128.34, 127.91, 127.15, 51.17, 47.72, 42.70, 36.74, 29.35, 27.27, 22.32$; LC/MS (ESI): $t_R = 4.96 \text{ min}$, $m/z 381.49 \text{ [M+H]}^+$, 380.24 berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_8$.

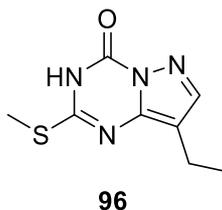
8-Ethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**95**)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 3-Amino-4-ethylpyrazol (50 mg, 0.45 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylthiocyanat (53.1 μl , 0.45 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (74.6 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Es wurde das Produkt **95** als hellgelber Feststoff isoliert.

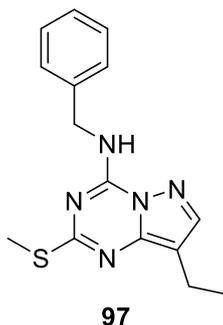
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.71 \text{ (s, 1H)}$, 7.57 (s, 1H) , $2.39 \text{ (q, } J = 7.5 \text{ Hz, 2H)}$, $1.12 \text{ (t, } J = 7.5 \text{ Hz, 3H)}$; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.28, 144.77, 127.89, 113.05, 106.43, 15.68, 14.44$; LC/MS (ESI): $t_R = 4.33 \text{ min}$, $m/z 197.02 \text{ [M+H]}^+$, 196.04 berechnet für $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$.

8-Ethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**96**)



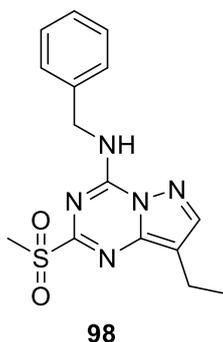
Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurde 8-Ethyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**95**, 0.45 mmol, 1 eq.) mit Methyljodid (28.14 μl 0.45 mmol, 1 eq.) umgesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH = 19:1) und konnte als dunkelgrüner Feststoff in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

TLC (DCM/MeOH = 19:1): $R_f = 0.41$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.90 \text{ (s, 1H)}$, $2.58 - 2.51 \text{ (m, 5H)}$, $1.20 \text{ (t, } J = 7.6 \text{ Hz, 3H)}$; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 155.22, 145.52, 144.76, 143.57, 112.15, 15.53, 12.31, 12.90$; LC/MS (ESI): $t_R = 6.35 \text{ min}$, $m/z 211.06 \text{ [M+H]}^+$, 210.06 berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{OS}$.

***N*-Benzyl-8-ethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (97)**

Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-Ethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**96**, 0.45 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Diethylanilin (214.8 μ l, 1.35 mmol, 3 eq.) in POCl₃ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (147.5 μ l, 1.35 mmol, 3 eq.) und DIPEA (391.9 μ l, 2.25 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1). Es konnten 93.9 mg (0.31 mmol, 70 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

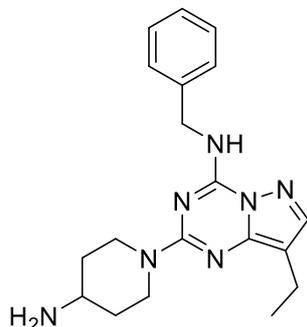
TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.33; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.32 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.34 (dt, J = 14.8, 7.3 Hz, 4H), 7.29 – 7.20 (m, 1H), 4.66 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 2.57 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 1.21 (t, J = 7.6 Hz, 3H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165.06, 147.54, 145.42, 144.63, 138.44, 128.31, 127.40, 127.02, 108.89, 43.07, 15.54, 14.61, 13.60; LC/MS (ESI): t_R = 10.52 min, m/z 300.24 [M+H]⁺, 299.12 berechnet für C₁₅H₁₇N₅S.

***N*-Benzyl-8-ethyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (98)**

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-Benzyl-8-ethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**97**, 93.9 mg, 0.31 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (162.3 mg, 0.94 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgelber Feststoff mit einer Ausbeute von 100.8 mg (0.30 mmol, 97 %) isoliert werden.

LC/MS (ESI): t_R = 8.21 min, m/z 332.22 [M+H]⁺, 331.11 berechnet für C₁₅H₁₇N₅O₂S.

**2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-N-benzyl-8-ethylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin
(43)**

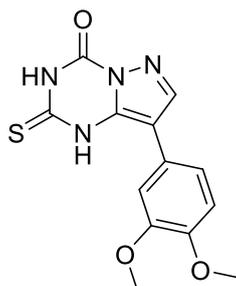


43

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-ethyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**98**, 100.8 mg, 0.30 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (283 mg, 1.41 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 2 h in 4 N HCl in Dioxan (2.5 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 94.4 mg (0.27 mmol, 88 %) des Produktes **43** als orangener Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.13 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.28 (s, 3H), 7.78 (s, 1H), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.27 – 7.19 (m, 1H), 4.71 – 4.56 (m, 4H), 3.34 – 3.21 (m, 1H), 3.06 – 2.88 (m, 2H), 1.96 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 1.60 – 1.34 (m, 2H), 1.15 (t, J = 7.5 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 158.70, 158.36, 148.47, 145.00, 138.40, 127.88, 127.04, 117.63, 114.73, 106.00, 47.93, 43.51, 42.38, 29.37, 15.63, 14.48; LC/MS (ESI): t_R = 5.18 min, m/z 352.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 351.22 berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_7$.

8-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (99)

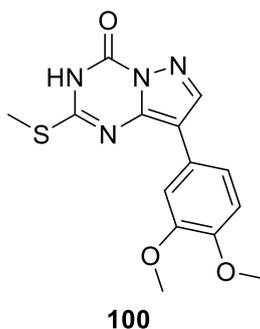


99

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)1H-pyrazol-5-amin (100 mg, 0.46 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylisothiocyanat (53.8 μ l, 0.46 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (75.6 mg, 0.55 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Es wurde das Produkt **99** als hellgelber Feststoff isoliert.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 8.20 (s, 1H), 7.63 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 6.94 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 173.08, 148.57, 146.63, 146.56, 144.62, 143.05, 126.05, 117.55, 112.10, 109.54, 104.34, 55.78, 55.63; LC/MS (ESI): t_R = 5.53 min, m/z 305.14 $[M+H]^+$, 304.06 berechnet für $C_{13}H_{12}N_4O_3S$.

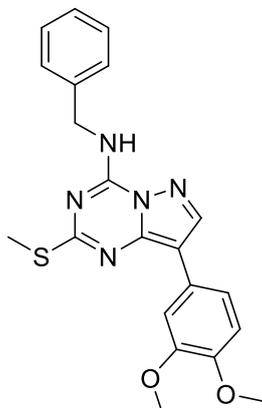
8-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (100)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurde 8-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**99**, 0.46 mmol, 1 eq.) mit Methyljodid (28.52 μ l, 0.46 mmol, 1 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als orangener Feststoff isoliert werden.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 8.51 (s, 1H), 7.79 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.64 (s, 3H); LC/MS (ESI): t_R = 6.51 min, m/z 319.20 $[M+H]^+$, 318.08 berechnet für $C_{14}H_{14}N_4O_3S$.

N-Benzyl-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (101)

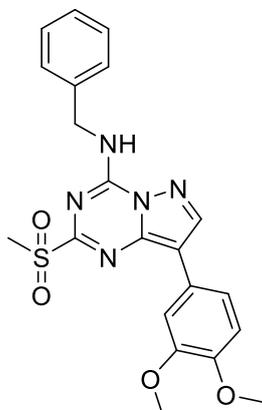


101

Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**100**, 0.46 mmol, 1 eq.) und N,N-Diethylanilin (173.4 μ l, 1.37 mmol, 3 eq.) in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (149.5 μ l, 1.37 mmol, 3 eq.) und DIPEA (397.2 μ l, 2.28 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1 \rightarrow CH/EtOAc = 3:1). Es konnten 43 mg (0.11 mmol, 23 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 3:1): R_f = 0.5; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.47 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.82 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.42 – 7.22 (m, 5H), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.55 (s, 3H); LC/MS (ESI): t_R = 10.39 min, m/z 408.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 407.14 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$.

***N*-Benzyl-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (102)**

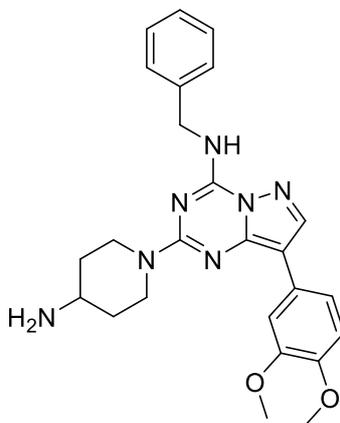


102

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-Benzyl-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**101**, 43 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (54.7 mg, 0.32 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als orangefarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 35.6 mg (81.1 μ mol, 77 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.14 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.71 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.39 – 7.24 (m, 3H), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.80 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.39 (s, 3H); LC/MS (ESI): t_R = 8.40 min, m/z 440.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 439.13 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(3,4-dimethoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (34)

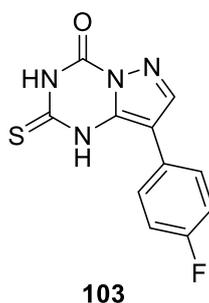


34

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**102**, 35.6 mg, 0.08 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (73 mg, 0.37 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 2 h in TFA (2 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 20 mg (34.9 μ mol, 43 %) des Produktes **34** als dunkellilane Feststoff isoliert.

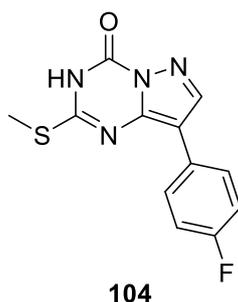
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.13 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.97 – 7.87 (m, 3H), 7.75 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.28 – 7.22 (m, 1H), 6.95 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 13.4 Hz, 2H), 4.64 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.37 – 3.27 (m, 1H), 3.01 (t, J = 11.9 Hz, 2H), 1.94 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 1.47 – 1.22 (m, 1H); LC/MS (ESI): t_R = 5.88 min, m/z 460.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 459.24 berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_2$.

8-(4-Fluorophenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**103**)



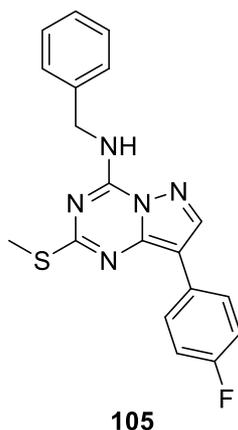
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode A durchgeführt. Es wurden 5-Amino-4-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol (100 mg, 0.56 mmol, 1 eq.), Ethoxycarbonylthiocyanat (66.6 μ l, 0.56 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (93.6 mg, 0.68 mmol, 1.2 eq.) eingesetzt. Das Produkt **103** wurde als Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.20 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 9.0, 5.6 Hz, 2H), 7.22 – 7.11 (m, 2H); LC/MS (ESI): t_R = 6.08 min, m/z 263.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 262.03 berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{FN}_4\text{OS}$.

8-(4-Fluorophenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (104)

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode B durchgeführt. Es wurde 8-(4-Fluorophenyl)-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(1H)-on (**103**, 0.56 mmol, 1 eq.) mit Methyljodid (35.3 μ l, 0.56 mmol, 1 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgelber Feststoff mit einer Ausbeute von 142.7 mg (0.52 mmol, 92 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.51 (s, 1H), 8.06 (dd, J = 8.9, 5.5 Hz, 2H), 7.25 (t, J = 9.0 Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 157.48, 144.17, 143.69, 143.30, 127.74, 127.68, 127.76, 127.49, 115.61, 115.22, 108.89, 13.21; LC/MS (ESI): t_R = 7.53 min, m/z 277.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 276.05 berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{FN}_4\text{OS}$.

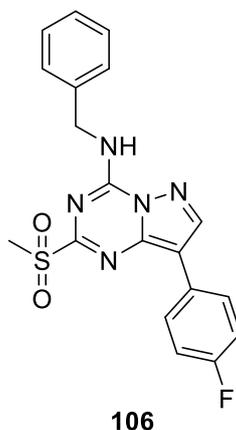
N-Benzyl-8-(4-fluorophenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (105)

Die Chlorierung wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. Es wurden 8-(4-Fluorophenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**104**, 133.7 mg, 0.48 mmol, 1 eq.) und N,N-Diethylanilin (231.2 μ l, 1.45 mmol, 3 eq.) in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Benzylamin (158.7 μ l, 1.45 mmol, 3 eq.) und DIPEA (421.8 μ l, 2.42 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt

(CH/EtOAc = 9:1). Es konnten 67.3 mg (0.18 mmol, 38 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 3:1): $R_f = 0.56$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9.52$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.09 (dd, $J = 9.0, 5.5$ Hz, 2H), 7.43 – 7.36 (m, 2H), 7.38 – 7.29 (m, 2H), 7.30 – 7.20 (m, 3H), 4.70 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.54 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 167.76, 147.67, 144.73, 143.13, 138.43, 129.31, 128.51, 127.62, 127.07, 115.63, 115.39, 111.38, 105.89, 43.12, 13.83$; LC/MS (ESI): $t_R = 11.08$ min, m/z 366.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 365.11 berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}_5\text{S}$.

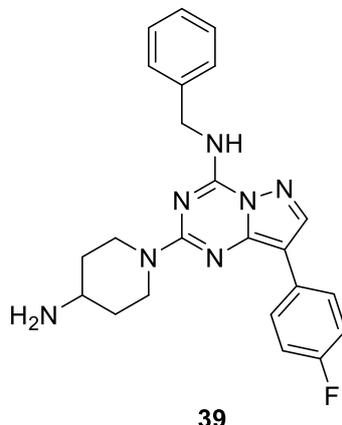
***N*-Benzyl-8-(4-fluorophenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (106)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-Benzyl-8-(4-fluorophenyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**105**, 76.3 mg, 0.18 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (95.4 mg, 0.55 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgrüner Feststoff mit einer Ausbeute von 70.2 mg (0.18 mmol, 96 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.18$ (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.10 (dd, $J = 9.0, 5.5$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.38 – 7.23 (m, 5H), 4.80 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.38 (s, 3H); LC/MS (ESI): $t_R = 8.96$ min, m/z 398.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 397.10 berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-benzyl-8-(4-fluorophenyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**39**)

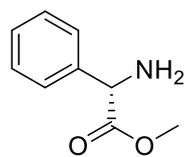


Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-Benzyl-8-(4-fluorophenyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**106**, 70.2 mg, 0.18 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (159.3 mg, 0.80 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 2.5 h in TFA (2 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 59 mg (0.11 mmol, 63 %) des Produktes **39** als weißer Feststoff isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.15 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.9, 5.6 Hz, 2H), 7.95 (s, 3H), 7.42 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.29 – 7.14 (m, 3H), 4.72 (d, *J* = 13.4 Hz, 2H), 4.64 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.40 – 3.27 (m, 1H), 3.09 – 2.90 (m, 2H), 1.97 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.50 – 1.32 (m, 2H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 156.72, 148.50, 146.67, 143.23, 139.11, 128.56, 127.64, 127.10, 126.16, 119.18, 115.48, 115.05, 103.12, 47.57, 43.62, 42.00, 29.46; LC/MS (ESI): *t*_R = 6.36 min, *m/z* 418.29 [M+H]⁺, 417.21 berechnet für C₂₃H₂₄FN₇.

7.3.3 Synthese der Derivate mit Modifizierungen in Position A

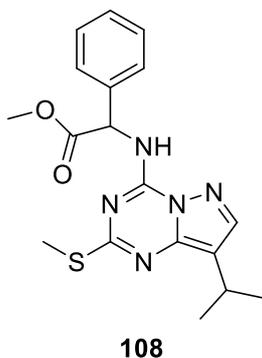
Phenylglycinmethylester (**107**)



107

Phenylglycin (1.5 g, 9.9 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH suspendiert und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Über einen Tropftrichter wurde langsam SOCl₂ (1.4 ml, 19.8 mmol, 2 eq.) hinzugegeben. Anschließend wurde 15 min bei Raumtemperatur und 30 °min unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt in quantitativer Ausbeute als weißer Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.27 (s, 3H), 7.59 – 7.50 (m, 2H), 7.48 – 7.38 (m, 3H), 5.23 (s, 1H), 3.69 (s, 3H); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.78, 132.62, 129.48, 128.96, 128.32, 55.31, 53.12; LC/MS (ESI): t_R = 2.51 min, *m/z* 165.77 [M+H]⁺, 165.08 berechnet für C₉H₁₁NO₂.

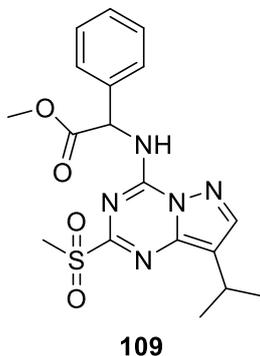
Methyl 2-((8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)-2-phenylacetat (**108**)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 100 mg, 0.41 mmol, 1 eq.), POCl₃ (4 ml) und N,N-Diethylanilin (197 µl, 1.23 mmol, 3 eq) wurden eingesetzt. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Phenylglycinmethylester (**107**, 269.2 mg, 1.34 mmol, 3 eq.) und DIPEA (388.7 µl, 2.32 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1). Es konnten 130.2 mg (0.35 mmol, 79 %) als Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.32; LC/MS (ESI): t_R = 11.12 min, *m/z* 372.24 [M+H]⁺, 371.14 berechnet für C₁₈H₂₁N₅O₂S.

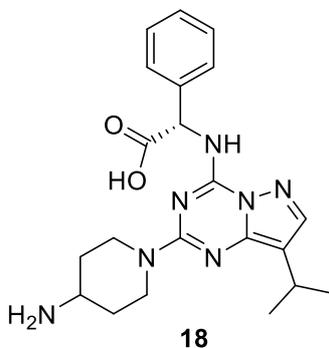
Methyl 2-((8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)-2-phenylacetat (109)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurden Methyl 2-((8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)-2-phenylacetat (**108**, 130 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) und *m*CPBA (181 mg, 1.05 mmol, 3 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 3:1) und konnte als Feststoff mit einer Ausbeute von 78.3 mg (0.19 mmol, 55 %) isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 3:1): $R_f = 0.30$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.18$ (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.66 – 7.52 (m, 2H), 7.38 (q, $J = 7.3, 6.5$ Hz, 3H), 6.06 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.16 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.31 (dd, $J = 7.0, 3.5$ Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 169.65, 158.31, 148.97, 145.05, 143.36, 135.37, 128.68, 128.43, 119.17, 99.51, 57.55, 52.71, 23.11, 23.07$.

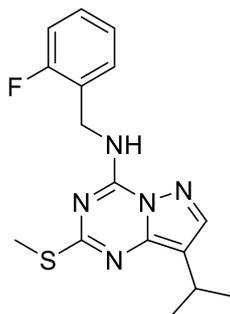
(S)-2-((2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)-2-phenylacetic acid (18)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. Methyl 2-((8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)-2-phenylacetat (**109**, 20 mg, 0.05 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (45 mg, 0.23 mmol,

4.5 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurden die säurelabilen Schutzgruppen bei Raumtemperatur über 2.5 h in 4 N HCl in Dioxan (3 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 0.4 mg (1 μ mol, 2 %) des Produktes **18** als weißer Feststoff isoliert.

***N*-(2-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (110)**

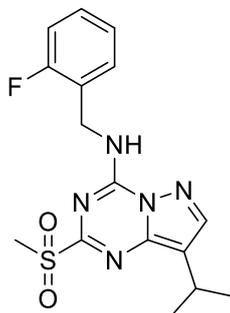


110

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 50 mg, 0.20 mmol, 1 eq.), und *N,N*-Diethylanilin (98.5 μ l, 0.61 mmol, 3 eq) wurden in POCl₃ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 2-Fluorobenzylamin (70.25 μ l, 0.61 mmol, 3 eq.) und DIPEA (357 μ l, 2.04 mmol, 10 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 7:1). Es konnten 56.8 mg (0.17 mmol, 86 %) als hellorangefarbener Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 7:1): R_f = 0.44; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.31 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.43 – 7.28 (m, 2H), 7.24 – 7.11 (m, 2H), 4.72 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.05 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H), 1.29 (d, J = 6.8 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 11.11 min, m/z 332.26 [M+H]⁺, 331.13 berechnet für C₁₆H₁₈FN₅S.

***N*-(2-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (111)**

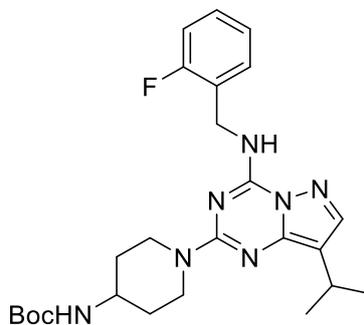


111

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-(2-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**110**, 56.8 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (88.8 mg, 0.51 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als gelber Feststoff in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

LC/MS (ESI): $t_R = 8.69$ min, m/z 364.24 $[M+H]^+$, 363.12 berechnet für $C_{16}H_{18}FN_5O_2S$.

***tert*-Butyl (1-(4-((2-fluorobenzyl)amino)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbammat (112)**

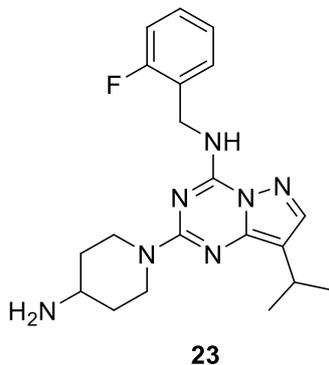


112

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-(2-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**111**, 117.4 mg, 0.32 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (290.4 mg, 1.45 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 5:1). Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 87.8 mg (0.18 mmol, 56 %) isoliert.

TLC (CH/EtOAc = 5:1): $R_f = 0.55$; LC/MS (ESI): $t_R = 11.06$ min, m/z 484.25 $[M+H]^+$, 483.28 berechnet für $C_{25}H_{34}FN_7O_2$.

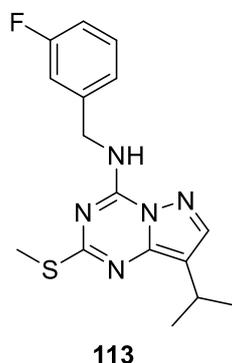
2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-N-(2-fluorobenzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (23)



tert-Butyl (1-(4-((2-fluorobenzyl)amino)-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbamate (**112**, 87.8 mg, 0.18 mmol) wurde über 2.5 h bei Raumtemperatur in 4 N HCl in Dioxan (2 ml) gerührt. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 76.3 mg (0.15 mmol, 84 %) des Produktes **23** als weißer Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.97 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 7.88 (s, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.47 – 7.38 (m, 1H), 7.36 – 7.24 (m, 1H), 7.21 – 7.09 (m, 2H), 4.67 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.61 (d, J = 13.4 Hz, 2H), 3.34 – 3.20 (m, 1H), 2.99 – 2.84 (m, 3H), 1.89 (d, J = 9.9 Hz, 2H), 1.41 – 1.26 (m, 2H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 5.83 min, m/z 384.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 383.22 berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{FN}_7$.

N-(3-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (113)

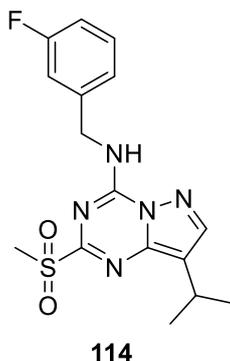


Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 50 mg, 0.20 mmol, 1 eq.), und N,N-Diethylanilin (98.5 μl , 0.61 mmol, 3 eq) wurden in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 3-

Fluorobenzylamin (70.25 μl , 0.61 mmol, 3 eq.) und DIPEA (357 μl , 2.04 mmol, 10 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 7:1) und konnte in quantitativer Ausbeute als hellorangefarbener Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 7:1): $R_f = 0.37$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.35$ (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.24 – 7.16 (m, 2H), 7.09 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.05 (p, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.28 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H); LC/MS (ESI): $t_R = 11.06$ min, m/z 332.24 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 331.13 berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{S}$.

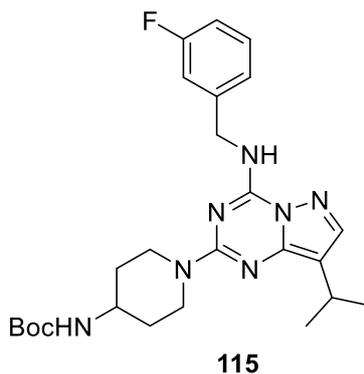
***N*-(3-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (114)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-(3-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**113**, 73.3 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (114.6 mg, 0.66 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

LC/MS (ESI): $t_R = 8.69$ min, m/z 364.23 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 363.12 berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}$.

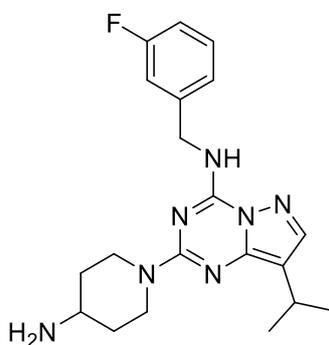
***tert*-Butyl (1-(4-((3-fluorobenzyl)amino)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbammat (115)**



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-(3-Fluorobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**114**, 102.9 mg, 0.28 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (255.4 mg, 1.28 mmol, 4.5 eq.) wurden eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 5:1). Es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 69.5 mg (0.18 mmol, 50 %) isoliert.

TLC (CH/EtOAc = 5:1): $R_f = 0.45$; LC/MS (ESI): $t_R = 10.93$ min, m/z 484.27 $[M+H]^+$, 483.28 berechnet für $C_{25}H_{34}FN_7O_2$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-(3-fluorobenzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**24**)

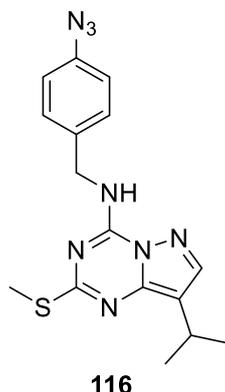


24

tert-Butyl (1-(4-((3-fluorobenzyl)amino)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbamat (**115**, 69.5 mg, 0.14 mmol) wurde über 2 h bei Raumtemperatur in 4 N HCl in Dioxan (2 ml) gerührt. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 70.6 mg (0.14 mmol, 99 %) des Produktes **24** als hellorangefarbener Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9.03$ (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 7.91 (s, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.41 – 7.30 (m, 1H), 7.27 – 7.18 (m, 2H), 7.07 (td, $J = 8.5, 2.6$ Hz, 1H), 4.67 – 4.57 (m, 4H), 3.36 – 3.23 (m, 1H), 2.99 – 2.85 (m, 3H), 1.90 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H), 1.43 – 1.27 (m, 2H), 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); LC/MS (ESI): $t_R = 5.92$ min, m/z 384.28 $[M+H]^+$, 383.22 berechnet für $C_{20}H_{26}FN_7$.

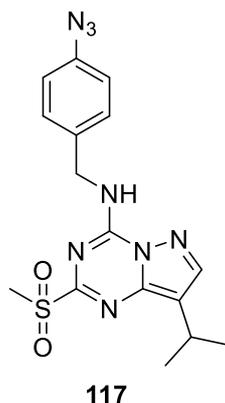
***N*-(4-Azidobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (116)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.), und *N,N*-Diethylanilin (106.7 μ l, 0.67 mmol, 3 eq) wurden in POCl₃ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 4-Azidobenzylamin (66.08 μ l, 0.45 mmol, 2 eq.) und DIPEA (194.3 μ l, 1.12 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 77.4 mg (0.22 mmol, 98 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.31; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.33 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.63 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.04 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164.69, 147.64, 145.11, 143.30, 138.17, 135.68, 129.20, 119.20, 113.87, 42.08, 23.17, 22.90, 13.80.

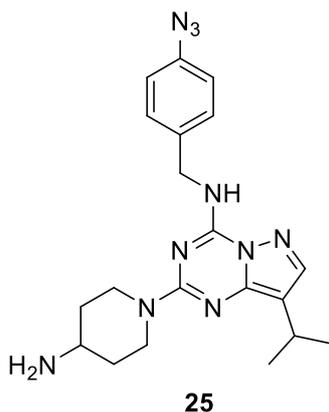
***N*-(4-Azidobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (117)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-(4-Azidobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**116**, 77.4 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (113.2 mg, 0.66 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgrüner Feststoff mit einer Ausbeute von 63.5 mg (0.16 mmol, 75 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.01 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 4.73 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.14 (p, J = 6.9 Hz, 1H), 1.30 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 149.35, 148.18, 147.67, 144.51, 142.69, 138.38, 129.57, 119.12, 118.87, 49.34, 43.27, 38.93, 23.14.

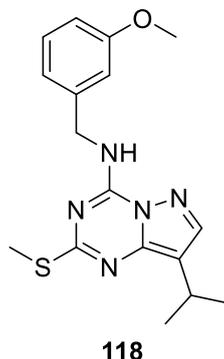
2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-(4-azidobenzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**25**)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-(4-Azidobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**117**, 63.5 mg, 0.16 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (98.8 mg, 0.49 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 2 h in TFA (2 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 2.4 mg (4.61 μmol , 2.8 %) des Produktes **25** als hellgelber Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.97 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.79 (s, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.63 (d, J = 13.3 Hz, 2H), 4.57 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 2.96 – 2.85 (m, 3H), 1.90 (d, J = 9.8 Hz, 2H), 1.40 – 1.26 (m, 2H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H).

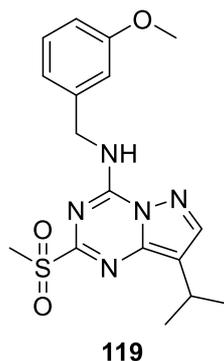
8-Isopropyl-*N*-(3-methoxybenzyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (118)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 60 mg, 0.27 mmol, 1 eq.), und *N,N*-Diethylanilin (127.8 μ l, 0.80 mmol, 3 eq.) wurden in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 3-Methoxybenzylamin (103.4 μ l, 0.80 mmol, 3 eq.) und DIPEA (233.2 μ l, 1.34 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 72.6 mg (0.21 mmol, 79 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.36; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.30 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.23 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.99 – 6.89 (m, 2H), 6.82 (ddd, J = 8.2, 2.7, 0.9 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.04 (p, J = 6.9 Hz, 1H), 2.47 (s, 3H), 1.27 (d, J = 7.0 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 164.71, 159.33, 147.36, 144.88, 143.03, 139.96, 129.51, 119.38, 113.65, 113.36, 112.27, 54.67, 43.13, 23.14, 22.84, 13.61; LC/MS (ESI): t_R = 10.98 min, m/z 344.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 343.15 berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{OS}$.

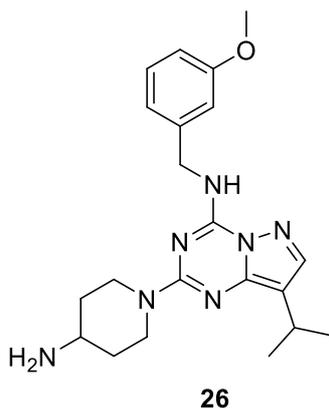
8-Isopropyl-*N*-(3-methoxybenzyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (119)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde 8-Isopropyl-*N*-(3-methoxybenzyl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**118**, 72.6 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (109.9 mg, 0.64 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.99 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.23 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.07 – 6.95 (m, 2H), 6.83 (ddd, J = 8.2, 2.7, 0.9 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.19 – 3.07 (m, 1H), 1.30 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 159.43, 158.65, 149.63, 144.56, 143.18, 138.84, 128.90, 119.58, 118.92, 113.18, 112.91, 54.86, 43.98, 29.64, 23.16; LC/MS (ESI): t_R = 8.66 min, m/z 376.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 375.14 berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$.

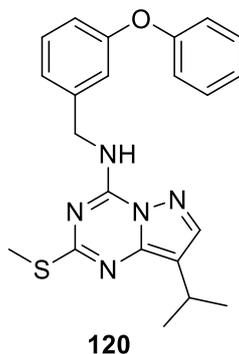
2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-isopropyl-*N*-(3-methoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**26**)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. 8-Isopropyl-*N*-(3-methoxybenzyl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**119**, 0.21 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (127.5 mg, 0.64 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 4 h in TFA (2 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 88.5 mg (0.17 mmol, 82 %) des Produktes **26** als hellbrauner Feststoff isoliert.

LC/MS (ESI): t_R = 5.63 min, m/z 396.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 395.24 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}$.

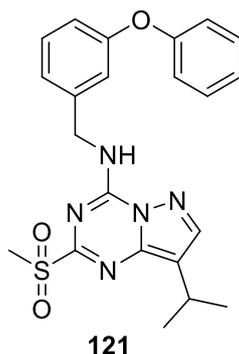
8-Isopropyl-2-(methylthio)-*N*-(3-phenoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (120)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.), und *N,N*-Diethylanilin (106.5 μ l, 0.67 mmol, 3 eq.) wurden in POCl₃ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 3-Phenoxybenzylamin (157.8 μ l, 0.67 mmol, 3 eq.) und DIPEA (194.3 μ l, 1.12 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 65.2 mg (0.16 mmol, 72 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.38; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.32 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 7.41 – 7.28 (m, 3H), 7.17 – 7.07 (m, 2H), 7.05 – 6.95 (m, 3H), 6.88 (ddd, J = 8.1, 2.5, 1.0 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.03 (p, J = 6.9 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H), 1.27 (d, J = 7.0 Hz, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164.78, 156.66, 156.40, 147.52, 144.92, 143.33, 140.72, 129.98, 129.95, 123.45, 122.42, 118.64, 117.52, 117.14, 113.82, 43.07, 23.11, 23.03, 13.58; LC/MS (ESI): t_R = 11.90 min, m/z 406.31 [M+H]⁺, 405.16 berechnet für C₂₂H₂₃N₅OS.

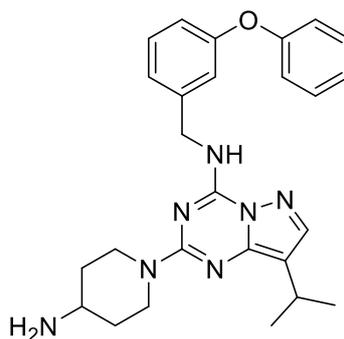
8-Isopropyl-2-(methylsulfonyl)-*N*-(3-phenoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (121)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde 8-Isopropyl-2-(methylthio)-*N*-(3-phenoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**120**, 65.2 mg, 0.16 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (166.6 mg, 0.96 mmol, 6 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff isoliert werden.

LC/MS (ESI): $t_R = 9.75$ min, m/z 438.17 $[M+H]^+$, 437.15 berechnet für $C_{22}H_{23}N_5O_3S$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-isopropyl-*N*-(3-phenoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**27**)

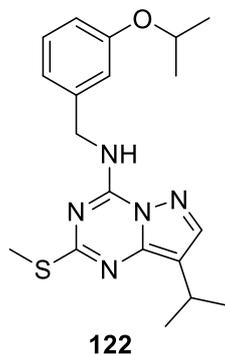


27

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylsulfonyl)-*N*-(3-phenoxybenzyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**121**, 0.16 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (96.7 mg, 0.48 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 4 h in TFA (5 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 84.5 mg (0.15 mmol, 92 %) des Produktes **27** als hellgelber Feststoff isoliert.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 9.02$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.42 – 7.27 (m, 3H), 7.21 – 7.09 (m, 2H), 7.06 (dd, $J = 2.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.02 – 6.95 (m, 2H), 6.91 – 6.82 (m, 1H), 4.67 – 4.54 (m, 4H), 3.35 – 3.22 (m, 1H), 3.00 – 2.84 (m, 3H), 1.97 – 1.83 (m, 2H), 1.46 – 1.29 (m, 2H), 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 158.62, 158.27, 156.72, 126.49, 155.39, 148.47, 146.29, 143.26, 141.31, 130.04, 129.85, 123.52, 122.68, 118.73, 117.78, 117.07, 114.48, 110.80, 47.85, 43.25, 42.05, 29.19, 23.03$; LC/MS (ESI): $t_R = 6.44$ min, m/z 458.32 $[M+H]^+$, 457.26 berechnet für $C_{26}H_{31}N_7O$.

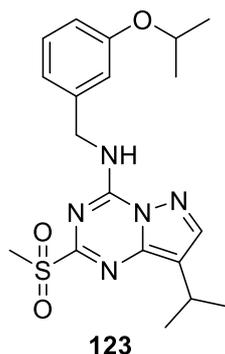
***N*-(3-Isopropoxybenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (122)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.), und *N,N*-Diethylanilin (106.5 μ l, 0.67 mmol, 3 eq.) wurden in POCl_3 (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 1-(3-Isopropoxyphenyl)methanamin (111.7 μ l, 0.67 mmol, 3 eq.) und DIPEA (194.3 μ l, 1.12 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 44.9 mg (0.12 mmol, 54 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.38; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.28 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.20 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.95 – 6.85 (m, 2H), 6.83 – 6.75 (m, 1H), 4.60 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.60 – 4.50 (m, 1H), 3.04 (p, J = 6.9 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.28 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.24 (d, J = 6.0 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 164.80, 157.41, 147.54, 144.96, 143.32, 140.04, 129.41, 119.32, 114.82, 113.98, 113.84, 68.97, 43.23, 23.11, 23.03, 21.81, 13.58; LC/MS (ESI): t_R = 11.72 min, m/z 372.22 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 371.18 berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{OS}$.

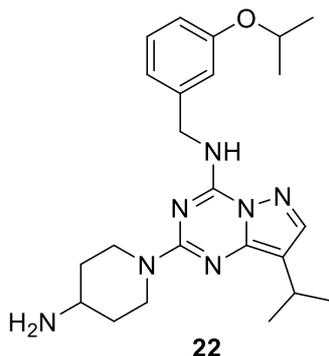
***N*-(3-Isopropoxybenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (123)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-(3-Isopropoxybenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**122**, 44.9 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (125.2 mg, 0.73 mmol, 6 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 41.8 mg (0.10 mmol, 86 %) isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.97 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.25 – 7.16 (m, 1H), 7.01 – 6.91 (m, 2H), 6.82 – 6.75 (m, 1H), 4.71 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.58 (p, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.14 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.31 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 158.80, 157.47, 149.53, 144.60, 143.21, 139.37, 129.47, 119.68, 118.75, 115.08, 114.37, 68.97, 43.83, 23.10, 21.80; LC/MS (ESI): *t*_R = 9.45 min, *m/z* 404.03 [M+H]⁺, 403.17 berechnet für C₁₉H₂₅N₅O₃S.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-(3-isopropoxybenzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**22**)

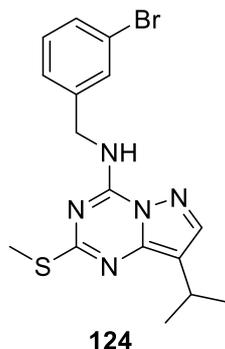


Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-(3-Isopropoxybenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**123**, 41.8 mg, 0.10 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (62.3 mg, 0.31 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 2.5 h in TFA (2 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Es wurden 46.7 mg (86.9 μmol, 84 %) des Produktes **22** als hellgelber Feststoff isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.96 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.23 – 7.14 (m, 1H), 6.97 – 6.89 (m, 2H), 6.78 (ddd, *J* = 8.2, 2.6, 0.9 Hz, 1H), 4.64 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 4.59 – 4.50 (m, 3H), 3.34 – 3.23 (m, 1H), 2.98 – 2.87 (m, 3H), 1.97 – 1.85 (m, 2H), 1.45 – 1.30 (m, 2H), 1.23 (dd, *J* = 6.5, 4.8 Hz, 12H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 158.52, 158.16, 157.42, 155.48, 148.50, 146.38, 143.22, 140.62, 129.30, 119.57, 115.11, 113.90, 110.76, 68.98, 47.85, 43.38, 42.06,

29.17, 23.03, 21.83; LC/MS (ESI): $t_R = 5.88$ min, m/z 424.36 $[M+H]^+$, 423.27 berechnet für $C_{23}H_{33}N_7O$.

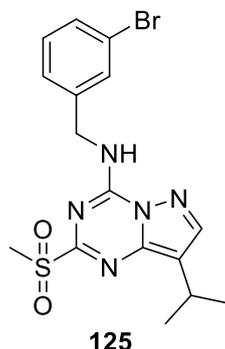
***N*-(3-Bromobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (124)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 100 mg, 0.45 mmol, 1 eq.), und *N,N*-Diethylanilin (214.9 μ l, 1.34 mmol, 3 eq.) wurden in $POCl_3$ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 3-Bromobenzylamin (168.3 μ l, 1.34 mmol, 3 eq.) und DIPEA (389 μ l, 2.23 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 140.1 mg (0.36 mmol, 80 %) als hellbrauner Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): $R_f = 0.38$; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 9.35$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.50 – 7.41 (m, 1H), 7.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.04 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 164.77$, 147.53, 144.92, 143.41, 141.26, 130.55, 130.28, 129.95, 126.51, 121.53, 113.89, 42.75, 23.11, 23.03, 13.58; LC/MS (ESI): $t_R = 11.62$ min, m/z 392.32 $[M+H]^+$, 391.05 berechnet für $C_{16}H_{18}BrN_5S$.

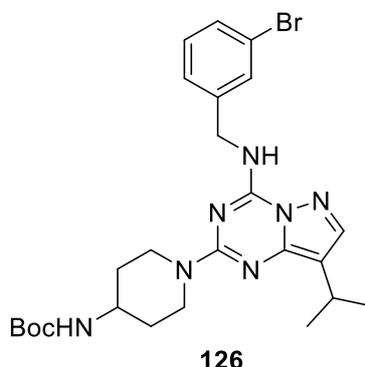
***N*-(3-Bromobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (125)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-(3-Bromobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**124**, 134 mg, 0.34 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (177.4 mg, 1.03 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgrüner Feststoff mit einer Ausbeute von 130.6 mg (0.31 mmol, 90 %) isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.00 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.66 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.53 – 7.37 (m, 2H), 7.29 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.15 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.31 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 158.71, 149.58, 144.65, 143.24, 140.58, 130.60, 130.56, 130.19, 126.87, 121.59, 118.80, 54.89, 43.27, 38.95, 23.11; LC/MS (ESI): *t*_R = 9.22 min, *m/z* 424.27 [M+H]⁺, 423.04 berechnet für C₁₆H₁₈BrN₅O₂S.

***tert*-Butyl (1-(4-((3-bromobenzyl)amino)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbammat (126)**

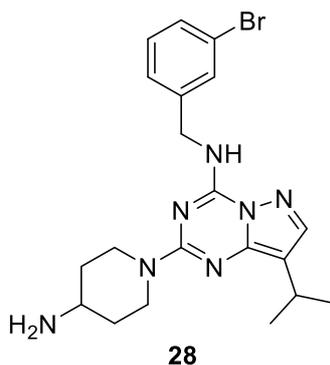


Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-(3-Bromobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**125**, 130.6 mg, 0.31 mmol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (185.5 mg, 0.93 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt

(CH/EtOAc = 5:1) und konnte mit einer Ausbeute von 114.6 mg (0.21 mmol, 68 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 5:1): $R_f = 0.35$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.91$ (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.48 – 7.36 (m, 2H), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.51 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.56 – 3.43 (m, 2H), 3.00 – 2.86 (m, 4H), 1.78 – 1.65 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.22 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 155.45, 148.34, 141.91, 130.59, 130.46, 129.82, 126.75, 121.43, 110.45, 77.52, 47.51, 42.84, 40.06, 39.20, 38.98, 31.50, 28.25, 23.02$; LC/MS (ESI): $t_R = 11.44$ min, m/z 544.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 543.20 berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{BrN}_7\text{O}_2$.

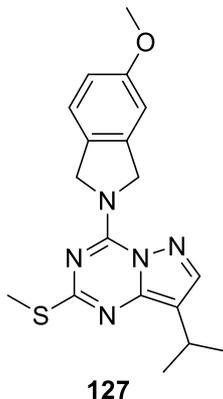
2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-(3-bromobenzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**28**)



tert-Butyl (1-(4-((3-bromobenzyl)amino)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbamat (**126**, 7.8 mg, 14.4 μmol) wurde bei Raumtemperatur über 2.5 h in TFA (3 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Das Produkt **28** wurde in quantitativer Ausbeute als Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9.05$ (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 5.3$ Hz, 3H), 7.78 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.49 – 7.37 (m, 2H), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.60 (dd, $J = 19.9, 9.9$ Hz, 4H), 3.36 – 3.22 (m, 1H), 2.96 – 2.84 (m, 3H), 1.91 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 1.42 – 1.28 (m, 2H), 1.22 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 158.46, 158.08, 155.47, 148.44, 146.57, 143.28, 141.79, 130.63, 130.50, 129.85, 126.53, 121.62, 110.84, 99.46, 47.81, 42.95, 41.85, 29.19, 23.12$; LC/MS (ESI): $t_R = 6.27$ min, m/z 444.36 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 443.14 berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{BrN}_7\text{O}_2$.

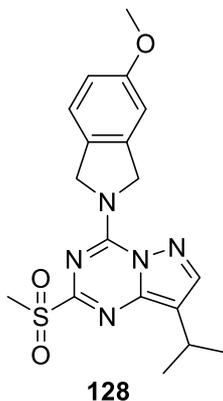
8-Isopropyl-4-(5-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (127)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.), und N,N-Diethylanilin (106.5 μ l, 0.67 mmol, 3 eq.) wurden in POCl₃ (4 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 5-Methoxy-2,3-dihydro-1H-isoindol (99.9 mg, 0.67 mmol, 3 eq.) und DIPEA (195 μ l, 1.12 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 32.8 mg (92.3 μ mol, 41 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.36; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.97 (s, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 5.64 (d, *J* = 20.1 Hz, 2H), 4.97 (d, *J* = 17.7 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.05 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.51 (s, 3H), 1.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 12.30 min, *m/z* 356.39 [M+H]⁺, 355.15 berechnet für C₁₈H₂₁N₅OS.

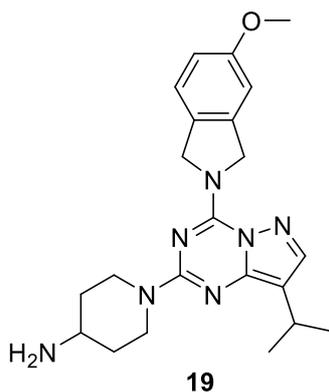
8-Isopropyl-4-(5-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (128)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde 8-Isopropyl-4-(5-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (**127**, 29.3 mg, 75.7 μmol , 1 eq.) mit *m*CPBA (41.1 mg, 0.24 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgelber Feststoff mit einer Ausbeute von 29.3 mg (75.7 μmol , 95 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.26 (s, 1H), 7.38 (dd, J = 8.5, 2.9 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.82 – 5.71 (m, 2H), 5.07 (d, J = 17.5 Hz, 2H), 3.77 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.21 – 3.10 (m, 1H), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 9.85 min, m/z 388.21 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 387.14 berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$.

1-(8-Isopropyl-4-(5-methoxyisoindolin-2-yl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-amin (**19**)

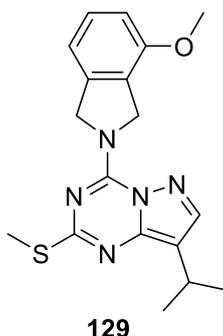


Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. 8-Isopropyl-4-(5-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (**128**, 24.9 mg, 64.3 μmol , 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (38.7 mg, 0.19 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 3 h in TFA (3 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Das Produkt **19** wurde in quantitativer Ausbeute als weißer Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.97 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 7.78 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.90 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 5.67 – 5.50 (m, 2H), 4.95 (d, J = 18.0 Hz, 2H), 4.70 (d, J = 13.2 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.31 (q, J = 5.5 Hz, 1H), 3.06 – 2.88 (m, 3H), 2.04 – 1.92 (m, 2H), 1.47 (dd, J = 12.1, 4.2 Hz, 2H), 1.24 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 159.19, 158.91, 158.55, 158.19, 155.34, 148.13, 147.71, 143.42, 123.51, 117.32, 114.40, 113.93, 109.81, 55.30,

47.92, 42.03, 29.34, 22.98, 22.92; LC/MS (ESI): $t_R = 6.60$ min, m/z 408.29 $[M+H]^+$, 407.24 berechnet für $C_{22}H_{29}N_7O$.

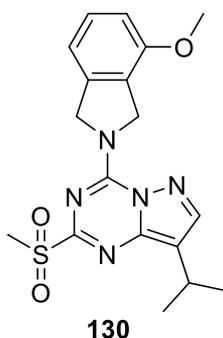
8-Isopropyl-4-(4-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (129)



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 80 mg, 0.36 mmol, 1 eq.) und N,N-Diethylanilin (150 μ l, 0.93 mmol, 3 eq.) wurden in $POCl_3$ (4 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden 2,3-dihydro-1H-isoindol-4-ylmethylether Hydrochlorid (50 mg, 0.27 mmol, 0.75 eq.) und DIPEA (311 μ l, 1.79 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 16.7 mg (47.0 μ mol, 17 %) als Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): $R_f = 0.33$; LC/MS (ESI): $t_R = 12.67$ min, m/z 356.24 $[M+H]^+$, 355.15 berechnet für $C_{18}H_{21}N_5OS$.

8-Isopropyl-4-(4-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (130)

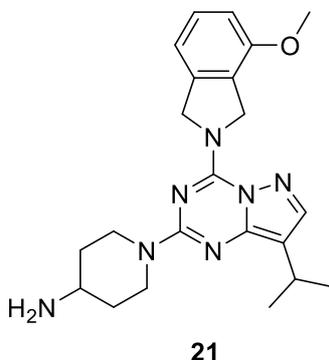


Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde 8-Isopropyl-4-(4-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (**129**, 16.7 mg, 47.0 μ mol, 1 eq.) mit *m*CPBA (24.3 mg, 0.14 mmol, 3 eq.) umgesetzt.

Das Produkt konnte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 10.7 mg (27.6 μmol , 59 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.27 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.08 – 7.03 (m, 1H), 6.97 (dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 5.80 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 5.01 (s, 1H), 3.87 (d, J = 1.8 Hz, 3H), 3.37 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 3.23 – 3.11 (m, 1H), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 10.09 min, m/z 388.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 387.14 berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$.

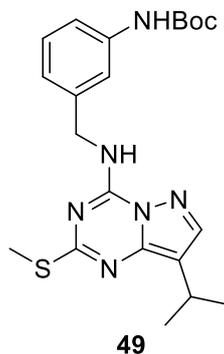
1-(8-Isopropyl-4-(4-methoxyisoindolin-2-yl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-amin (**21**)



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. 8-Isopropyl-4-(4-methoxyisoindolin-2-yl)-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin (**130**, 10.7 mg, 27.6 μmol , 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (16.6 mg, 82.9 μmol , 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur über 3 h in TFA (3 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Das Produkt **21** wurde mit einer Ausbeute von 9.2 mg (17.7 μmol , 64 %) als hellgelber Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.93 – 7.87 (m, 3H), 7.79 (s, 1H), 7.34 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.70 (d, J = 13.3 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.37 – 3.26 (m, 1H), 2.95 (td, J = 10.4, 4.9 Hz, 3H), 2.05 – 1.92 (m, 2H), 1.44 (tt, J = 12.4, 6.0 Hz, 2H), 1.24 (d, J = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 6.51 min, m/z 408.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 407.24 berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}$.

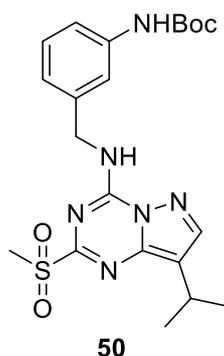
***tert*-Butyl (3-(((8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)carbammat (49)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 100 mg, 0.45 mmol, 1 eq.) und N,N-Diethylanilin (215 μ l, 1.34 mmol, 3 eq.) wurden in POCl₃ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden *tert*-Butyl-3-(aminomethyl)phenylcarbammat (50 mg, 0.22 mmol, 0.5 eq.) und DIPEA (1.56 ml, 8.93 mmol, 20 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 80.5 mg (0.19 mmol, 84 %) als orangener Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.27; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.29 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 7.98 (s, 1H), 7.46 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.95 (dt, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.04 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 11.18 min, *m/z* 429.16 [M+H]⁺, 428.20 berechnet für C₂₁H₂₈N₆O₂S.

***tert*-Butyl (3-(((8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)carbammat (50)**

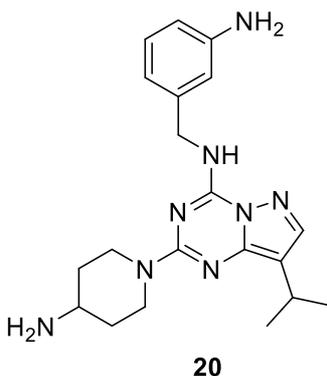


Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *tert*-Butyl (3-(((8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)me-

thyl)phenyl)carbamat (**49**, 80.5 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (97.3 mg, 0.56 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als weißes Öl mit einer Ausbeute von 73.1 mg (0.16 mmol, 85 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.01 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 9.28 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.51 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.35 – 7.27 (m, 1H), 7.19 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.01 (dt, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.15 (p, J = 7.0 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 158.86, 152.70, 149.53, 144.62, 143.25, 139.62, 138.32, 128.62, 121.38, 118.76, 117.09, 79.00, 43.92, 38.96, 28.08, 23.12; LC/MS (ESI): t_R = 9.24 min, m/z 460.78 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 460.19 berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$.

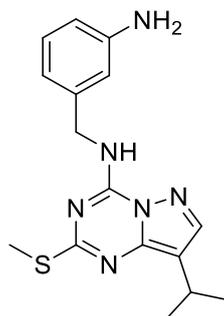
***N*-(3-Aminobenzyl)-2-(4-aminopiperidin-1-yl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-amin (**20**)**



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *tert*-Butyl (3-(((8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)carbamat (**50**, 18.7 mg, 40.6 μmol , 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (24.4 mg, 0.12 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurden die Boc-Schutzgruppen bei Raumtemperatur über 3.5 h in TFA (3 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Das Produkt **20** wurde mit einer Ausbeute von 1.0 mg (1.64 μmol , 4 %) als orangefarbener Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.97 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 4.60 (t, J = 11.8 Hz, 4H), 2.99 – 2.82 (m, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.17 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 1.97 – 1.87 (m, 3H), 1.37 (d, J = 12.5 Hz, 2H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H); LC/MS (ESI): t_R = 4.49 min, m/z 381.36 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 380.24 berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_8$.

***N*-(3-Aminobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (54)**

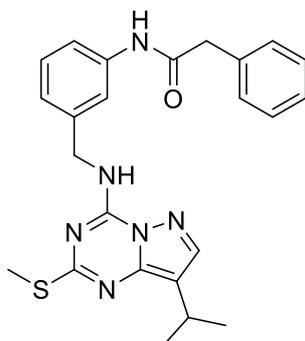


54

tert-Butyl (3-(((8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)carbamate (**49**, 123.5 mg, 0.29 mmol) wurde 3.5 h bei Raumtemperatur in 4 N HCl in Dioxan (4 ml) gerührt. Die Säure wurde anschließend destillativ unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt am Hochvakuum getrocknet. Es konnte ein gelber Feststoff isoliert werden.

LC/MS (ESI): $t_R = 8.75$ min, m/z 329.11 $[M+H]^+$, 328.15 berechnet für $C_{16}H_{20}N_6S$.

***N*-(3-(((8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)-2-phenylacetamid (55)**

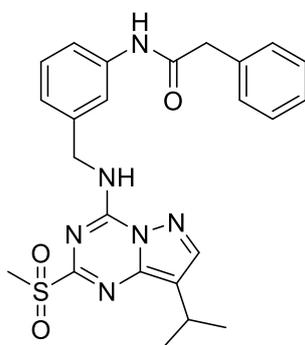


55

N-(3-Aminobenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**54**, 50 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) wurde in DCM (3 ml) gelöst und DIPEA (132 μ l, 0.76 mmol, 5 eq.) und Phenylacetylchlorid (30 μ l, 0.23 mmol, 1.5 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit DCM verdünnt und mit gesättigter NH_4Cl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über $MgSO_4$ getrocknet und eingedampft. Das Produkt konnte als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 65.8 mg (0.15 mmol, 64 %) isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 2:1): $R_f = 0.4$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.15$ (s, 1H), 9.32 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 2H), 7.33 – 7.29 (m, 4H), 7.27 – 7.20 (m, 2H), 7.06 – 7.00 (m, 1H), 4.62 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.08 – 3.00 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 1.28 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 143.36, 139.23, 135.97, 129.02, 128.67, 128.24, 126.46, 122.16, 117.84, 113.82, 53.46, 43.27, 43.22, 23.11, 23.04, 18.02, 16.70, 13.59$; LC/MS (ESI): $t_R = 10.59$ min, m/z 447.22 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 446.19 berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{OS}$.

***N*-(3-(((8-Isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)-2-phenylacetamid (52)**

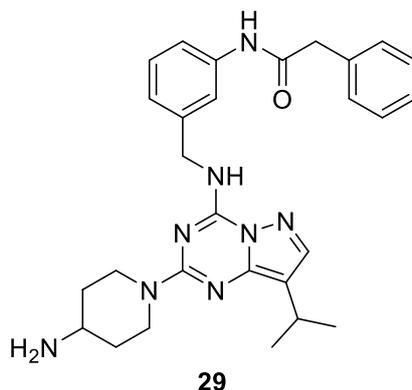


52

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-(3-(((8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)-2-phenylacetamid (**55**, 59.7 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) mit *m*CPBA (69.3 mg, 0.40 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 54.9 mg (0.11 mmol, 86 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 10.14$ (s, 1H), 10.02 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 1H), 7.59 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 4.3$ Hz, 4H), 7.29 – 7.19 (m, 2H), 7.15 – 7.05 (m, 1H), 4.72 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.19 – 3.09 (m, 1H), 1.31 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); LC/MS (ESI): $t_R = 8.79$ min, m/z 479.05 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 478.18 berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$.

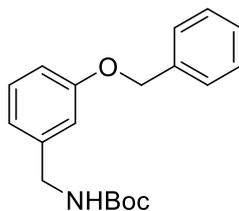
***N*-3-(((2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)-2-phenylacetamid (**29**)**



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-3-(((8-Isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl)amino)methyl)phenyl)-2-phenylacetamid (**52**, 46.9 mg, 98.1 μmol , 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (58.9 mg, 0.29 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppen bei Raumtemperatur über 3 h in TFA (3 ml) abgespalten. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Das Produkt **29** wurde mit einer Ausbeute von 10.1 mg (16.5 μmol , 17 %) als hellgelber Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 10.15 (s, 1H), 8.96 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.61 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 4.3 Hz, 4H), 7.24 (dd, J = 9.1, 4.9 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 13.3 Hz, 2H), 4.56 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.26 (dd, J = 10.5, 5.3 Hz, 1H), 2.99 – 2.81 (m, 3H), 1.90 (dd, J = 12.8, 4.0 Hz, 2H), 1.41 – 1.29 (m, 1H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 169.04, 157.95, 155.71, 148.50, 143.14, 139.63, 135.98, 129.02, 128.26, 126.48, 122.47, 118.39, 117.84, 110.76, 47.85, 43.48, 43.28, 42.63, 42.04, 29.11, 23.01; LC/MS (ESI): t_R = 6.14 min, m/z 499.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 498.29 berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}$.

***tert*-Butyl (3-(benzyloxy)benzyl)carbammat (**10**)**

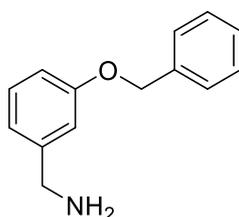


10

3-(Boc-aminomethyl)phenol (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) wurde in Aceton (5 ml) gelöst. Es wurden Benzylbromid (26.6 μ l, 0.22 mmol, 1 eq.) und K_2CO_3 (61.9 mg, 0.45 mmol, 2 eq.) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt. Nach 18 h wurde erneut Benzylbromid (13.3 μ l, 0.11 mmol, 0.5 eq.) hinzugegeben und weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc verdünnt und mit gesättigter NH_4Cl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und eingedampft. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 5:1) und konnte mit einer Ausbeute von 63.8 mg (0.20 mmol, 91 %) als klares Öl isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 5:1): R_f = 0.47; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 7.48 – 7.28 (m, 5H), 7.29 – 7.20 (m, 1H), 6.97 – 6.83 (m, 3H), 5.06 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 1.47 (s, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 159.21, 140.74, 138.84, 137.07, 129.80, 128.72, 128.12, 127.64, 120.07, 113.80, 70.11, 46.54, 28.55; LC/MS (ESI): t_R = 10.04 min, m/z 336.05 $[M+Na]^+$, 313.17 berechnet für $C_{19}H_{23}NO_3$.

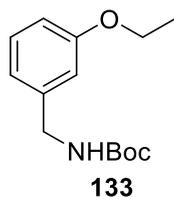
(3-(Benzyloxy)phenyl)methanamin (11)



11

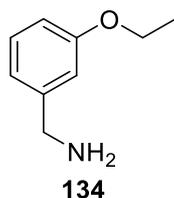
tert-Butyl (3-(benzyloxy)benzyl)carbammat (**10**, 106.9 mg, 0.34 mmol) wurde 1 h in 4 N HCl in Dioxan (3 ml) bei Raumtemperatur gerührt. Die Säure wurde destillativ unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde anschließend in Wasser aufgenommen, mit 2 N NaOH basisch gemacht und mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und über $MgSO_4$ getrocknet eingedampft. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 46 mg (0.22 mmol, 63 %) isoliert werden.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 7.48 – 7.28 (m, 5H), 7.20 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 6.92 – 6.87 (m, 1H), 6.83 (ddd, J = 8.2, 2.7, 0.9 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 3.68 (s, 2H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 158.38, 145.72, 137.22, 129.06, 128.39, 127.74, 127.61, 119.45, 113.50, 112.43, 69.03, 45.48; LC/MS (ESI): t_R = 4.90 min, m/z 213.81 $[M+H]^+$, 213.12 berechnet für $C_{14}H_{15}NO$.

tert-Butyl (3-ethoxybenzyl)carbammat (133)

3-(Boc-aminomethyl)phenol (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) wurde in ACN (2 ml) gelöst. Cs₂CO₃ (146.0 mg, 0.45 mmol, 2 eq.) und Iodoethan (18 µl, 0.22 mmol, 1 eq.) wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 19 h bei 80 °C gerührt. Die Suspension wurde mit EtOAc verdünnt und mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel eingedampft. Das Produkt **133** konnte als gelbes Öl in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

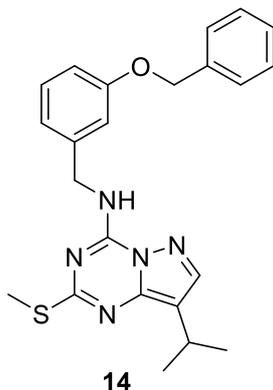
LC/MS (ESI): $t_R = 9.17$ min, m/z 251.54 [M+H]⁺, 251.15 berechnet für C₁₄H₂₁NO₃.

(3-Ethoxyphenyl)methanamin (134)

tert-Butyl (3-ethoxybenzyl)carbammat (**133**, 0.22 mmol) wurde 3 h bei Raumtemperatur in TFA (3 ml) gerührt. Die Säure wurde mit Toluol koevaporiert und das Produkt am Hochvakuum getrocknet.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.79 (s, 3H), 7.35 – 7.16 (m, 1H), 6.93 – 6.79 (m, 3H), 3.95 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H), 1.35 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 159.60, 133.27, 130.54, 120.98, 116.02, 114.89, 63.76, 44.20, 14.69; LC/MS (ESI): $t_R = 3.63$ min, m/z 151.73 [M+H]⁺, 151.10 berechnet für C₉H₁₃NO.

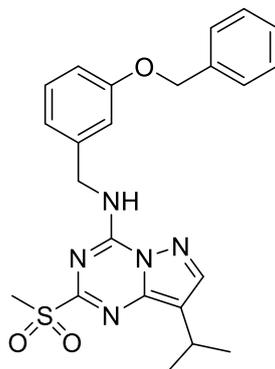
***N*-(3-(Benzyloxy)benzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (14)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 100 mg, 0.45 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Diethylanilin (215 μ l, 1.34 mmol, 3 eq.) wurden in POCl₃ (3 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Verbindung **11** (39.2 mg, 0.18 mmol, 0.4 eq.) und DIPEA (389 μ l, 2.23 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und konnte mit einer Ausbeute von 31.9 mg (76.1 μ mol, 41 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): R_f = 0.25; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.28 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.45 – 7.19 (m, 6H), 7.07 – 7.00 (m, 1H), 6.96 – 6.85 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.62 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.11 – 2.98 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.28 (d, J = 6.9 Hz, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164.79, 158.32, 147.144, 94, 143.33, 140.08, 136.99, 129.42, 128.34, 127.74, 127.62, 119.78, 113.99, 113.83, 113.36, 69.11, 43.19, 23.12, 23.05, 12.60; LC/MS (ESI): t_R = 11.81 min, m/z 420.32 [M+H]⁺, 419.18 berechnet für C₂₃H₂₅N₅OS.

***N*-(3-(Benzyloxy)benzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (15)**

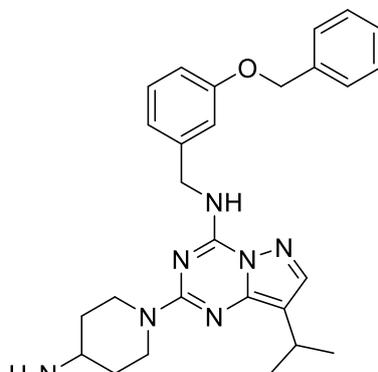


15

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode E durchgeführt. Es wurde *N*-(3-(Benzyloxy)benzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**14**, 31.9 mg, 76.1 μmol , 1 eq.) mit *m*CPBA (39.2 mg, 0.23 mmol, 3 eq.) umgesetzt. Das Produkt konnte als hellgrüner Feststoff mit einer Ausbeute von 29.7 mg (65.8 μmol , 86 %) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.97 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.42 – 7.19 (m, 6H), 7.10 (dd, J = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.02 – 6.87 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.71 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.15 (p, J = 6.9 Hz, 1H), 1.32 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 158.77, 158.35, 149.53, 144.58, 143.21, 139.40, 137.00, 129.45, 128.31, 127.70, 127.57, 120.19, 118.75, 114.19, 113.86, 69.09, 43.82, 23.11; LC/MS (ESI): t_R = 9.83 min, m/z 452.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 451.17 berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$.

2-(4-Aminopiperidin-1-yl)-*N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (17)

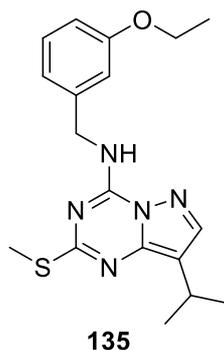


17

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Methode F durchgeführt. *N*-(3-(Benzyloxy)benzyl)-8-isopropyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**15**, 29.7 mg, 65.8 μ mol, 1 eq.) und 4-(*N*-Boc-amino)piperidin (39.5 mg, 0.20 mmol, 3 eq.) wurden eingesetzt. Anschließend wurden 15 mg des Boc-geschützten Zwischenproduktes abgenommen und 2.5 h in TFA (2 ml) bei Raumtemperatur gerührt. Die Säure wurde eingedampft und das Produkt an der HPLC gereinigt. Das Produkt **17** wurde mit einer Ausbeute von 12.7 mg (21.7 μ mol, 33 %) als hellbrauner Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.93 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.45 – 7.27 (m, 5H), 7.21 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 2.5, 1.2 Hz, 1H), 6.96 (dt, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 6.88 (ddd, J = 8.3, 2.6, 0.9 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.64 (d, J = 13.1 Hz, 2H), 4.57 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.28 (dd, J = 10.6, 5.6 Hz, 1H), 2.97 – 2.85 (m, 2H), 1.91 (dd, J = 13.0, 3.8 Hz, 2H), 1.36 (dd, J = 12.1, 4.2 Hz, 2H), 1.24 (d, J = 6.9 Hz, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 158.32, 155.62, 148.53, 146.72, 143.19, 140.71, 137.02, 129.30, 128.40, 127.79, 127.64, 120.02, 114.21, 113.23, 110.71, 69.13, 47.30, 41.99, 29.15, 23.07, 23.04; LC/MS (ESI): t_R = 6.61 min, m/z 472.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 471.27 berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$.

***N*-(3-Ethoxybenzyl)-8-isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-amin (**135**)**



Die Synthese wurde nach der allgemeinen Methode C durchgeführt. 8-Isopropyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4(3H)-on (**12**, 50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) und *N,N*-Diethylanilin (197.8 μ l, 0.67 mmol, 3 eq.) wurden in POCl_3 (4 ml) gelöst. Die anschließende Substitution erfolgte nach der allgemeinen Methode D. Dazu wurden Verbindung **134** (0.22 mmol, 1 eq.) und DIPEA (195.1 μ l, 1.12 mmol, 5 eq.) eingesetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc = 9:1) und

konnte mit einer Ausbeute von 8.3 mg (14.8 μmol , 6.6 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden.

TLC (CH/EtOAc = 9:1): $R_f = 0.31$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.29$ (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.95 – 6.89 (m, 2H), 6.80 (ddd, $J = 8.2, 2.6, 1.0$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.99 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.04 (s, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.29 (dd, $J = 12.3, 6.9$ Hz, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 164.80, 158.49, 147.55, 144.90, 143.33, 140.00, 129.40, 119.45, 113.84, 113.69, 112.88, 62.86, 43.24, 23.12, 23.04, 14.63, 13.60$; LC/MS (ESI): $t_R = 11.45$ min, m/z 358.18 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 357.16 berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{OS}$.

8 Literatur

- [1] Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis, *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4576-9.
- [2] Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. Vol. 6. 2010: Springer.
- [3] Drabovich, A.P., et al., *Selection of smart small-molecule ligands: the proof of principle*. Anal Chem, 2009. **81**(1): p. 490-4.
- [4] Burdine, L. and T. Kodadek, *Target identification in chemical genetics: the (often) missing link*. Chem Biol, 2004. **11**(5): p. 593-7.
- [5] Burns, A.R., et al., *High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in Caenorhabditis elegans*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1906-14.
- [6] Inglese, J., C.E. Shamu, and R.K. Guy, *Reporting data from high-throughput screening of small-molecule libraries*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(8): p. 438-41.
- [7] Pardridge, W.M., *The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development*. NeuroRx, 2005. **2**(1): p. 3-14.
- [8] Arkin, M.R., Y. Tang, and J.A. Wells, *Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality*. Chem Biol, 2014. **21**(9): p. 1102-14.
- [9] Schreiber, S.L., *Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry*. Bioorg Med Chem, 1998. **6**(8): p. 1127-52.
- [10] Zhang, Y., et al., *Small molecules, big roles -- the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 23): p. 5609-20.
- [11] Terstappen, G.C., et al., *Target deconvolution strategies in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(11): p. 891-903.
- [12] WHO *World Health Statistics 2009*. 2009.
- [13] Kröhnert, S. and M. Karsch, *Sterblichkeit und Todesursachen*. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2011.
- [14] Lopez, A.D., et al., *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data*. Lancet, 2006. **367**(9524): p. 1747-57.
- [15] Kock, R., et al., *The epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Germany*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(45): p. 761-7.
- [16] Fischbach, M.A. and C.T. Walsh, *Antibiotics for Emerging Pathogens*. Science, 2009. **325**: p. 1089-93.

- [17] Schommer, N.N. and R.L. Gallo, *Structure and function of the human skin microbiome*. Trends in Microbiology, 2013. **21**(12): p. 660-8.
- [18] Ribet, D. and P. Cossart, *How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues*. Microbes and Infection, 2015. **17**: p. 173-83.
- [19] Tekir, S.D., T. Cakir, and K.Ö. Ülgen, *Infection Strategies of Bacterial and Viral Pathogens through Pathogen–Human Protein–Protein Interactions*. Frontiers in Microbiology, 2012. **3**(46): p. 1-11.
- [20] Kaufmann, S. and S. Sütterlin, *Infektionskrankheiten*. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2009: p. 1-7.
- [21] Michael, T., Martinko, and J.M. Madigan, *Brock Biology of Microorganisms*. Vol. 11. 2006: Pearson; Prentice Hall.
- [22] Barber, M. and M. Rozwadowska-Dowzenko, *Infection by penicillin-resistant staphylococci*. Lancet, 1948. **2**(6530): p. 641-4.
- [23] Levy, S.B. and B. Marshall, *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*. Nature Medicine, 2004. **10**(12): p. 122-9.
- [24] Boucher, H.W., et al., *Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2009. **48**: p. 1-12.
- [25] McGowan, J.E., Jr., *Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum*. Am J Infect Control, 2006. **34**(5 Suppl 1): p. S29-37; discussion S64-73.
- [26] Knowles, J.R., *Penicillin Resistance: The Chemistry of beta-Lactamase Inhibition*. American Chemical Research, 1985. **18**: p. 97-104.
- [27] Hugo, W.B., et al., *Pharmaceutical microbiology*. 7 ed. 2004: Blackwell Science.
- [28] Fuda, C.C., J.F. Fisher, and S. Mobashery, *Beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptive resistance of a plastic genome*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(22): p. 2617-33.
- [29] Velkov, T., et al., *Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics*. Future Microbiol, 2013. **8**(6): p. 711-24.
- [30] Bruice, P.Y., *Organische Chemie*. Vol. 5. 2007: Pearson Studium. 1664.
- [31] Boucher, H.W., et al., *10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(12): p. 1685-94.
- [32] Sorbera, M., et al., *Ceftolozane/Tazobactam: a new option in the treatment of complicated gram-negative infections*. P T, 2014. **39**(12): p. 825-32.
- [33] Marquez, B., *Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors*. Biochimie, 2005. **87**(12): p. 1137-47.

- [34] Munk, K., *Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution*. 2000, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Getr. ZÉahlung.
- [35] Alberts, B., *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Aufl. ed. 2011, Weinheim: Wiley-VCH. LXI, 1928 S.
- [36] Radzicka, A. and R. Wolfenden, *A proficient enzyme*. *Science*, 1995. **267**(5194): p. 90-3.
- [37] Callahan, B.P. and B.G. Miller, *OMP decarboxylase--An enigma persists*. *Bioorg Chem*, 2007. **35**(6): p. 465-9.
- [38] Powers, J.C., et al., *Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases*. *Chem Rev*, 2002. **102**(12): p. 4639-750.
- [39] Lichtman, A.H., et al., *Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **311**(2): p. 441-8.
- [40] Boger, D.L., et al., *Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(10): p. 5044-9.
- [41] Hasson, A. and L.L. Liepin, *Reversible Inhibition of Electric-Organ Cholinesterase by Curare and Curare-Like Agents*. *Biochim Biophys Acta*, 1963. **75**: p. 397-401.
- [42] Taketa, K. and B.M. Pogell, *Reversible interaction and inhibition of liver fructose-1,6-diphosphatase by adenocine nucleotides*. *biochemical and biophysical research communications*, 1963. **12**(3).
- [43] Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*, ed. 5. 2002, New York.
- [44] Hauske, P., et al., *Allosteric regulation of proteases*. *Chembiochem*, 2008. **9**(18): p. 2920-8.
- [45] Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(9): p. 785-99.
- [46] Ehrmann, M. and T. Clausen, *Proteolysis as a regulatory mechanism*. *Annu Rev Genet*, 2004. **38**: p. 709-24.
- [47] Oikonomopoulou, K., et al., *Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more*. *Biol Chem*, 2006. **387**(6): p. 677-85.
- [48] Marino, G., et al., *Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(6): p. 3671-8.
- [49] Lopez-Otin, C. and C.M. Overall, *Protease degradomics: a new challenge for proteomics*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(7): p. 509-19.

- [50] Lopez-Otin, C. and J.S. Bond, *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 30433-7.
- [51] Rao, M.B., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 597-635.
- [52] Tavano, O.L., *Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **90**: p. 1-11.
- [53] Hedstrom, L., *Serine protease mechanism and specificity*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4501-24.
- [54] Ekici, O.D., M. Paetzel, and R.E. Dalbey, *Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration*. Protein Sci, 2008. **17**(12): p. 2023-37.
- [55] Hedstrom, L., J.J. Perona, and W.J. Rutter, *Converting trypsin to chymotrypsin: residue 172 is a substrate specificity determinant*. Biochemistry, 1994. **33**(29): p. 8757-63.
- [56] Dodson, G. and A. Wlodawer, *Catalytic triads and their relatives*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(9): p. 347-52.
- [57] Buller, A.R. and C.A. Townsend, *Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. E653-61.
- [58] Perona, J.J. and C.S. Craik, *Structural basis of substrate specificity in the serine proteases*. Protein Sci, 1995. **4**(3): p. 337-60.
- [59] Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **27**(2): p. 157-62.
- [60] Fuchs, J.E., et al., *Dynamics Govern Specificity of a Protein-Protein Interface: Substrate Recognition by Thrombin*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140713.
- [61] Czapinska, H. and J. Otlewski, *Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases*. Eur J Biochem, 1999. **260**(3): p. 571-95.
- [62] Schuhmann, H., P.F. Huesgen, and I. Adamska, *The family of Deg/HtrA proteases in plants*. BMC Plant Biol, 2012. **12**: p. 52.
- [63] Hansen, G. and R. Hilgenfeld, *Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(5): p. 761-75.
- [64] Singh, N., R.R. Kuppili, and K. Bose, *The structural basis of mode of activation and functional diversity: a case study with HtrA family of serine proteases*. Arch Biochem Biophys, 2011. **516**(2): p. 85-96.

- [65] Clausen, T., C. Southan, and M. Ehrmann, *The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate*. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 443-55.
- [66] Skorko-Glonek, J., et al., *HtrA protease family as therapeutic targets*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(6): p. 977-1009.
- [67] Clausen, T., et al., *HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(3): p. 152-62.
- [68] Hasenbein, S., et al., *Conversion of a regulatory into a degradative protease*. J Mol Biol, 2010. **397**(4): p. 957-66.
- [69] Kim, D.Y. and K.K. Kim, *Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control*. J Biochem Mol Biol, 2005. **38**(3): p. 266-74.
- [70] Swamy, K.H., C.H. Chung, and A.L. Goldberg, *Isolation and characterization of protease do from Escherichia coli, a large serine protease containing multiple subunits*. Arch Biochem Biophys, 1983. **224**(2): p. 543-54.
- [71] Johnson, K., et al., *The role of a stress-response protein in Salmonella typhimurium virulence*. Mol Microbiol, 1991. **5**(2): p. 401-7.
- [72] Raivio, T.L., *Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis*. Mol Microbiol, 2005. **56**(5): p. 1119-28.
- [73] Jomaa, A., et al., *The inner cavity of Escherichia coli DegP protein is not essential for molecular chaperone and proteolytic activity*. J Bacteriol, 2007. **189**(3): p. 706-16.
- [74] Krojer, T., et al., *HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(7): p. 844-52.
- [75] Pallen, M.J. and B.W. Wren, *The HtrA family of serine proteases*. Mol Microbiol, 1997. **26**(2): p. 209-21.
- [76] Spiess, C., A. Beil, and M. Ehrmann, *A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein*. Cell, 1999. **97**(3): p. 339-47.
- [77] Iwanczyk, J., et al., *Role of the PDZ domains in Escherichia coli DegP protein*. J Bacteriol, 2007. **189**(8): p. 3176-86.
- [78] Rogon, C. and J. Höhfeld, *Proteostase – Chaperone als Begleiter von der Wiege bis zum Grabe*, in *BioSpektrum*. 2016. p. 413-7.
- [79] Hebert, D.N. and M. Molinari, *In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1377-408.

- [80] Amani, S. and A. Naeem, *Understanding protein folding from globular to amyloid state Aggregation: Darker side of protein*. Process Biochemistry, 2013. **48**: p. 1651-64.
- [81] Morimoto, R.I., *Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging*. Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1427-38.
- [82] Meltzer, M., et al., *Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of Escherichia coli*. Res Microbiol, 2009. **160**(9): p. 660-6.
- [83] Kolmar, H., P.R. Waller, and R.T. Sauer, *The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of Escherichia coli: specificity for cleavage sites and substrate conformation*. J Bacteriol, 1996. **178**(20): p. 5925-9.
- [84] Wilken, C., et al., *Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease*. Cell, 2004. **117**(4): p. 483-94.
- [85] Hauske, P., et al., *Peptidic small molecule activators of the stress sensor DegS*. Mol Biosyst, 2009. **5**(9): p. 980-5.
- [86] Hasselblatt, H., et al., *Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2659-70.
- [87] Lu, C., G. Stock, and V. Knecht, *Mechanisms for allosteric activation of protease DegS by ligand binding and oligomerization as revealed from molecular dynamics simulations*. Proteins, 2016.
- [88] Mauldin, R.V. and R.T. Sauer, *Allosteric regulation of DegS protease subunits through a shared energy landscape*. Nat Chem Biol, 2013. **9**(2): p. 90-6.
- [89] Li, X., et al., *Cleavage of RseA by RseP requires a carboxyl-terminal hydrophobic amino acid following DegS cleavage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(35): p. 14837-42.
- [90] Kanehara, K., K. Ito, and Y. Akiyama, *YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA*. Genes Dev, 2002. **16**(16): p. 2147-55.
- [91] Alba, B.M., et al., *DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response*. Genes Dev, 2002. **16**(16): p. 2156-68.
- [92] Akiyama, Y., K. Kanehara, and K. Ito, *RseP (YaeL), an Escherichia coli RIP protease, cleaves transmembrane sequences*. EMBO J, 2004. **23**(22): p. 4434-42.
- [93] Hizukuri, Y. and Y. Akiyama, *PDZ domains of RseP are not essential for sequential cleavage of RseA or stress-induced sigma(E) activation in vivo*. Mol Microbiol, 2012. **86**(5): p. 1232-45.

- [94] Weihofen, A. and B. Martoglio, *Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(2): p. 71-8.
- [95] Paget, M.S., *Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution*. Biomolecules, 2015. **5**(3): p. 1245-65.
- [96] Brown, R.N. and P.A. Gulig, *Roles of RseB, sigmaE, and DegP in virulence and phase variation of colony morphotype of Vibrio vulnificus*. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3768-81.
- [97] Redford, P., P.L. Roesch, and R.A. Welch, *DegS is necessary for virulence and is among extraintestinal Escherichia coli genes induced in murine peritonitis*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3088-96.
- [98] Redford, P. and R.A. Welch, *Role of sigma E-regulated genes in Escherichia coli uropathogenesis*. Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 4030-8.
- [99] Chien, J., et al., *HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**(4): p. 451-68.
- [100] Eigenbrot, C., et al., *Structural and functional analysis of HtrA1 and its subdomains*. Structure, 2012. **20**(6): p. 1040-50.
- [101] Baldi, A., et al., *The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6684-8.
- [102] Hu, S.I., et al., *Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34406-12.
- [103] De Luca, A., et al., *Distribution of the serine protease HtrA1 in normal human tissues*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(10): p. 1279-84.
- [104] Hegde, R., et al., *Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 432-8.
- [105] Verhagen, A.M., et al., *HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 445-54.
- [106] Gray, C.W., et al., *Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response*. Eur J Biochem, 2000. **267**(18): p. 5699-710.
- [107] Suzuki, Y., et al., *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 613-21.
- [108] Martins, L.M., et al., *The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 439-44.

- [109] Vande Walle, L., M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele, *The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 453-60.
- [110] Nie, G.Y., et al., *Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 1): p. 39-48.
- [111] Belefond, D., et al., *High temperature requirement A3 (HtrA3) promotes etoposide- and cisplatin-induced cytotoxicity in lung cancer cell lines*. J Biol Chem, 2010. **285**(16): p. 12011-27.
- [112] Bongard, J., *Chemische Modulation der medizinisch relevanten HTRA-Proteasen DegS und HTRA1*, in *Biologie*. 2016, Universität Duisburg-Essen: Essen. p. 178.
- [113] Arnott, E.A., et al., *POCl₃ chlorination of 4-quinazolones*. J Org Chem, 2011. **76**(6): p. 1653-61.
- [114] Hutterer, C., et al., *A novel CDK7 inhibitor of the Pyrazolotriazine class exerts broad-spectrum antiviral activity at nanomolar concentrations*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(4): p. 2062-71.
- [115] Lim, F.P.L. and A.V. Dolzhenko, *4-Amino-substituted pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2-amines: a new practical synthesis and biological activity*. Tetrahedron Letters, 2014. **55**: p. 6684-8.
- [116] Zhang, J., P.L. Yang, and N.S. Gray, *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 28-39.
- [117] Bettayeb, K., et al., *N-&-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 2713-24.
- [118] Nie, Z., et al., *Structure-based design and synthesis of novel macrocyclic pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine compounds as potent inhibitors of protein kinase CK2 and their anticancer activities*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(2): p. 619-23.
- [119] Cai, Y., et al., *Colistin resistance of Acinetobacter baumannii: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(7): p. 1607-15.
- [120] Stojanoski, V., et al., *Structure of the catalytic domain of the colistin resistance enzyme MCR-1*. BMC Biol, 2016. **14**(1): p. 81.
- [121] Mortensen, N.P., et al., *Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of Pseudomonas aeruginosa cells*. Langmuir, 2009. **25**(6): p. 3728-33.
- [122] Pendleton, J.N., S.P. Gorman, and B.F. Gilmore, *Clinical relevance of the ESKAPE pathogens*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013. **11**(3): p. 297-308.

- [123] Rice, L.B., *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. J Infect Dis, 2008. **197**(8): p. 1079-81.
- [124] Malumbres, M., *Cyclin-dependent kinases*. Genome Biol, 2014. **15**(6): p. 122.
- [125] Deshpande, A., P. Sicinski, and P.W. Hinds, *Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2909-15.
- [126] Meng, X.Y., et al., *Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery*. Curr Comput Aided Drug Des, 2011. **7**(2): p. 146-57.
- [127] Green, T.W. and W.P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*. 1999, New York: Wiley-Interscience.
- [128] Martin, R. and S.L. Buchwald, *Palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands*. Acc Chem Res, 2008. **41**(11): p. 1461-73.
- [129] Kürti, L. and B. Czakó, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. 2005: Elsevier Inc.
- [130] Yang, Y., et al., *Room-Temperature Suzuki-Miyaura Coupling of Heteroaryl Chlorides and Tosylates*. Eur. J. Org. Chem., 2012(31): p. 6248-6259.
- [131] *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983*. Eur J Biochem, 1984. **138**(1): p. 9-37.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren wurden gemäß dem von der *IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature* (JCBN) empfohlenen Einbuchstabencode oder dem Dreibuchstabencode abgekürzt.^[131]

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Å	Ångström
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
aq.	lat. <i>aqua</i> (wässrig)
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
c	Konzentration
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
CH	Cyclohexan
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
ddd	Dublett von Dublett von Dublett
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethyl)-aminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dt	Dublett von Triplet
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (lat.)
EGFR	epidermal growth factor receptor
eq.	Äquivalente
ESI	Elektrosprayionisation
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter species</i>
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAAH	<i>fatty acid amide hydrolase</i> (Fettsäureamid-Hydrolase)
FDPase	Fruktose-1,6-Diphosphatase
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
h	<i>hour(s)</i> (Stunde(n))
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HtrA	<i>High-temperature requirement A</i>
HTRF	homogeneous time-resolved fluorescence
HTS	<i>high-throughput screening</i> (Hochdurchsatz-Screening)
IAP	<i>inhibitors of apoptotic proteins</i> (Inhibitoren von apoptotischen Proteinen)
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (mittlere inhibitorische Konzentration)
IGFBP7	insulin growth factor binding protein 7
<i>i</i> Pr	<i>iso-propyl</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC/MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
LDC	<i>Lead Discovery Center</i>

LPS	Lipopolysaccharide
M	molar
m	Multipllett
mCPBA	<i>meta-chloroperoxybenzoic acid</i> (<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> (Minimale Hemm-Konzentration)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOM	Methoxymethyl
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Normal
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
OAc	Acetat
OCDase	Orotidin-5'-phosphat-decarboxylase
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer-membrane protein</i> (Außenmembranprotein)
p	Pentett
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDZ	PSD-95 (<i>postsynaptic density of 95 kDa</i>), DLG1 (<i>discs large</i>) und ZO-1 (<i>zonula occulens 1</i>)
pH	lat. <i>pondus Hydrogenii</i>
Ph	Phenyl
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin
PPI	Protein-Protein-Interaktion
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RIP	<i>regulated intermembrane proteolysis</i> (Intermembran-Proteolyse)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RseP	<i>regulator of sigma E protease</i>

rt	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
S _N	nukleophile Substitution
t	<i>time</i> (Zeit), oder: Triplett
Tab.	Tabelle
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
td	Triplett von Dublett
TFA	<i>trifluoro acetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TLC	<i>thin layer chromatography</i> (Dünnschichtchromatographie)
Tos	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
t _R	Retentionszeit
Tr	Triphenylmethyl
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
XPhos	2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl
δ	Chemische Verschiebung
μ	mikro

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: (Links) Struktur des β -Lactam-Antibiotikums Penicillin, wobei R eine variable Seitenkette darstellt. (Rechts) Struktur des halbsynthetischen Penicillins Methicillin.	11
Abb. 2: Mechanismen zur (A) Hemmung von Enzymen durch Penicillin, (B) Inaktivierung von Penicillin durch Penicillinase und (C) Inaktivierung von Penicillinase durch einen Inhibitor.....	13
Abb. 3: Schematische Darstellung einer enzymatisch-katalysierten Reaktion.....	15
Abb. 4: Die drei Hemmtypen der reversiblen Inhibition.....	17
Abb. 5: Beispiele für Inhibitoren, die für die irreversible Hemmung von Enzymen eingesetzt werden.....	19
Abb. 6: Schematische Darstellung einer kovalenten und nicht-kovalenten Katalyse einer Hydrolysereaktion durch ein Enzym.....	20
Abb. 7: Allgemeiner Hydrolyse-Mechanismus einer Serinprotease mit der katalytischen Triade Ser/His/Asp.	22
Abb. 8: Zusammensetzung von HtrA-Proteasen und deren Anordnung zu Oligomeren.	25
Abb. 9: Funktion der PDZ-Domäne in der Proteolyse.....	27
Abb. 10: Struktur der Serinprotease DegS.	28
Abb. 11: Allosterische Aktivierung der Proteasedomäne.....	29
Abb. 12: Mechanismus der DegS-induzierten σ -Faktor-Freigabe ins Zytoplasma, durch Abbau des Anti- σ -Faktors RseA.	30
Abb. 13: Struktur des LDC-Inhibitors 1.	33
Abb. 14: Synthese des bicyklischen Rings 2.	36
Abb. 15: Methylierung des Schwefels.....	37
Abb. 16: Einbringung der funktionellen Gruppe R ¹	38
Abb. 17: Oxidation des Thioethers 6 zum Sulfon 7.....	40
Abb. 18: Substitution der Methylsulfongruppe und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.	41
Abb. 19: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.....	42
Abb. 20: Synthese eines Benzylamin-Derivates (11) und dessen Verwendung in der Synthesesequenz.	43
Abb. 21: RseA-Proteolyse-Assay mit dem ursprünglichen LDC-Inhibitor 1.	45
Abb. 22: Graphische Einteilung der Gruppe A-Derivate nach ihrer DegS-Aktivität...	46
Abb. 23: RseA-Proteolyse-Assays mit Verbindung 18.....	47
Abb. 24: RseA-Proteolyse-Assays mit den Inhibitoren 23 und 24.	48
Abb. 25: RseA-Proteolyse-Assays mit dem Inhibitor 17.	49
Abb. 26: Wachstumskurven von CAG16037 (WT-Stamm) in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor-Konzentrationen.....	52

Abb. 27: Der LDC-Inhibitor und die Isoindol-Derivate.....	53
Abb. 28: Chemische Struktur des Antibiotikums Colistin.	56
Abb. 29: Derivate der Gruppe B.	59
Abb. 30: Graphische Einteilung der Gruppe C-Derivate nach ihrer DegS-Aktivität...	60
Abb. 31: RseA-Proteolyse-Assays mit dem Inhibitor 41.	61
Abb. 32: Struktur der Derivate 24, 42 und deren Kombination 37.	64
Abb. 33: Ergebnisse eines molekularen Dockings an die PDZ-Domäne von DegS.	67
Abb. 34: Synthese der TIPS-geschützten Verbindung 45.	69
Abb. 35: Geplante Optimierung der Synthese durch Einbringung einer geschützten Hydroxyl-Gruppe zur späteren Modifizierung.....	70
Abb. 36: Optimierung der Synthese durch Einbringung einer geschützten Aminogruppe.	71
Abb. 37: Erster Ansatz zur Modifizierung des Benzylamin-Restes über ein Amin. ...	71
Abb. 38: Struktur und berechnete Massen des gewünschten Produktes 52 und des tatsächlich entstandenen Produktes 53.	72
Abb. 39: Modifizierte Synthese zur Derivatisierung des Benzylamin-Restes über ein Amin.....	73
Abb. 40: Synthese des <i>tert</i> -Butyl (1-(4-(benzylamino)-8-chloropyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-2-yl)piperidin-4-yl)carbamats (62).....	74
Abb. 41: 2 Varianten der durchgeführten Suzuki-Kupplungen zur Derivatisierung von Gruppe C.	75
Abb. 42: Strukturelle Merkmale des Dialkylbiarylphosphins XPhos und deren Einflüsse auf die Effektivität von Pd-Katalysatoren. ^[128]	76
Abb. 43: Synthese der Verbindung 65 als Ausgangsverbindung für die Suzuki-Kupplung.....	76

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Biochemische Hemmdaten der Gruppe A-Derivate.....	51
Tab. 2: Minimale Hemm-Konzentrationen auf <i>E. coli</i> (ATCC 25922) verschiedener Antibiotika (durchgeführt von BioVersys).	55
Tab. 3: Minimale Hemm-Konzentration der reinen DegS-Inhibitoren und in Kombination mit 1/8 MIC Colistin auf <i>E. coli</i> (ATCC 25922).	57
Tab. 4: Effekte der DegS-Inhibitoren 1, 26 und 27 auf verschiedene Pathogene.	58
Tab. 5: Biologische Daten der Gruppe B-Derivate.....	62
Tab. 6: IC ₅₀ -Werte der Inhibitoren 1 und 42 gegenüber relevanten Kinasen.	63
Tab. 7 (folgende Seite): Verwendete Reaktionsbedingungen und Reagenzien für die Suzuki-Kupplung.....	77

9.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Entwicklung von DegS-Inhibitoren“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Januar 2017

9.6 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Kaiser, der es mir ermöglicht hat, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe und unter seiner Betreuung durchzuführen. Vielen Dank für die Hilfestellungen und Ratschläge die Du mir während dieser Arbeit gegeben hast.

Herrn Prof. Dr. Michael Ehrmann danke ich für die gute Zusammenarbeit an diesem Projekt sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kaiser für die gute Arbeitsatmosphäre, die anregenden Diskussionen und die Tipps. Besonders möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Yvonne Blaß und Marija Mamic bedanken, die für eine fröhliche Stimmung im Labor und im Büro gesorgt haben. Wir haben viel gelacht und noch öfter unsere Synthesen verflucht. Steffen Köcher, als Teil unserer routinierten Mensa-Clique, danke ich ebenfalls für die lustige Zeit und die vielen abwechslungsreichen, sowohl fachlichen als auch nicht-fachlichen Gespräche. Ein großer Dank gilt Elvan Yilmaz für die tolle Zusammenarbeit und die fachliche und mentale Unterstützung in den vergangenen Jahren, sowohl im Studium als auch während der Promotion. Es gab die lustigsten und verrücktesten Momente, einige davon bleiben unvergesslich!

Für die biologischen Untersuchungen und die stete Hilfsbereitschaft bei der Beantwortung biologischer Fragestellungen möchte ich Dr. Jens Bongard danken.

Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Ehrmann und Dr. Barbara Saccà danke ich für die lustigen Gespräche, das nette Miteinander und die sportlichen Unternehmungen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bayer möchte ich für die Nutzung ihrer analytischen Geräte danken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Meiner Mutter, die mich immer bedingungslos unterstützt und in schwierigen Situationen aufgebaut hat und meinem Vater für die

Unterstützung, für sein offenes Ohr und natürlich für das Korrekturlesen meiner fachfremden chemischen Arbeit. Vielen Dank, dass Ihr immer an mich geglaubt habt!

Abschließend möchte ich mich bei meinem Freund Sebastian Klimach bedanken, der mich in jeder Lebenslage motiviert und unterstützt hat. Danke für Deine Geduld und dafür, dass Du immer für mich da bist!