

***Neue Indolderivate als FLT3-Inhibitoren und chimäre
FLT3- und HDAC-Inhibitoren: Synthese und
biologische Testung***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg



vorgelegt von

Bernadette Pils

aus Hutthurm

2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2010 bis Dezember 2015 unter der Leitung von Prof. Dr. S. Mahboobi am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie I der Universität Regensburg, von Juni 2014 bis August 2014 am Universitätsklinikum Mainz, Institut für Toxikologie, Prof. Dr. O. Krämer, und von Januar 2015 bis Februar 2015 und August 2015 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, München, Prof. Dr. K. Spiekermann, angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden im Patent WO2019/034538 veröffentlicht.

Promotionsgesuch eingereicht:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. S. Mahboobi

Prof. Dr. S. Elz

Prof. Dr. J. Heilmann

Vorsitzender

Erstgutachter

Zweitgutachter

Drittprüfer

Für Ludwig

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während dieser Zeit begleitet haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Siavosh Mahboobi für die Überlassung des interessanten Themas, die anregenden Diskussionen und die stete Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl.

Herrn Prof. Dr. Oliver Krämer sowie allen Mitarbeitern in Mainz für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die freizeitliche Gestaltung während meines Aufenthalts.

Herrn Prof. Dr. Karsten Spiekermann sowie allen Mitarbeitern am KKG Leukämie, besonders Dr. Harald Polzer für die freundliche Aufnahme in München und die tatkräftige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Frank Böhmer und seinen Mitarbeitern für die Überlassung der biologischen Daten.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster und seinen Mitarbeitern für die Durchführung des Kinobead Experiments.

Herrn Dr. Sebastian Drube für die Durchführung der c-Kit-Versuche.

Herrn Dr. A. Sellmer für die ständige Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen und die Unterstützung jeglicher Art.

Herrn Dr. Herwig Pongratz, Dr. Andreas Sellmer, Dr. Emerich Eichhorn, Dr. Michel Leonhardt, Dr. Elisabeth Grünstein und Julia Blüml für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre am Lehrstuhl, besonders aber für die vielen lustigen Stunden an so manchen Tagen und Abenden und auch für die gute Freundschaft in dieser Zeit.

Dr. Michel Leonhardt, Dr. Andreas Sellmer und Dr. Elisabeth Grünstein für die gute Zeit im Labor mit vielen wichtigen und interessanten Diskussionen über die Welt.

Allen ehemaligen Auszubildenden für die analytische und chemische Unterstützung während meiner Promotion.

Frau Uta Hasselmann für ihre tatkräftige Unterstützung bei organisatorischen Problemen aller Art und für ihr sonniges Gemüt.

Allen Mitarbeitern der Zentralen Analytik der Universität Regensburg für sämtliche Messungen und bereitwillige Hilfestellung bei Problemen.

Dr. Petr Jirásek, Dr. Paul Baumeister, Dr. Steffen Pockes, Dr. Michel Leonhardt, Dr. Elisabeth Grünstein und Dr. Michaela Sperber für die lustige Mittagsrunde mit anregenden Gesprächen während dieser Zeit.

Meinen Freunden Dr. Agnes und Dr. Klaus Harrar, Dr. Markus und Judith Hager, Dr. Wolfgang Schmucker und Dr. Michaela Sperber, Dr. Michel Leonhardt und Anni Kinder für die gemeinsamen Abende und Stunden in guter Gesellschaft. Vielen Dank für die unvergessliche Zeit und Freundschaft an und abseits der Universität.

Meinen ehemaligen Auszubildenden Roxy und Vanessa für die gute Freundschaft in den letzten Jahren und besonders die Unterstützung in dieser Zeit.

Michel und Andreas in jeglicher Lebenslage in den letzten Jahren. Danke, dass ihr immer für mich da wart.

Meinen langjährigen Freunden Katja, Michi, Fabü und Smartey für den einen oder anderen Abend an diversen Konzerten oder im „Kaffeehaus“. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit abseits der Universität.

Meiner Schwägerin Dr. Anna Pilsl für die Hilfe bei der einen oder anderen Messung und den gemeinsamen Mittagessen in der Mensa.

Dem AK Reiser, besonders Matze, Jimmy, Tom, Corina, Benny, Sabine, Verena, Christian und Daniel für die Unterstützung und Hilfe während der letzten Jahre, sowohl an so manchen Abenden in der Küche als auch am Weiher.

Meinen Eltern und meiner Schwester Cornelia und meiner gesamten Familie Streifinger und Pilsl für die ständige Unterstützung in all den Jahren.

Vielen Dank, dass ihr mir das Studium und diese ganze Zeit ermöglicht habt.

Zuletzt und vor allem meinem Mann Lu.

Danke für deine Geduld, deine unermessliche Hilfe und Unterstützung und deinen Rückhalt in den letzten Jahren.

Inhaltsverzeichnis

A. Neue Indolderivate als FLT3-Inhibitoren.....	1
1. Einleitung.....	1
1.1. Krebs	1
1.2. Akute Myeloische Leukämie.....	2
1.2.1. Hämatopoese	2
1.2.2. Leukämie	3
1.2.3. Risikofaktoren für AML	3
1.2.4. Pathogenese der AML.....	4
1.3. Rezeptortyrosinkinase FLT3.....	5
1.3.1. Signaltransduktionsweg des FLT3-Rezeptors.....	6
1.3.2. Mutationstypen des FLT3-Rezeptors	7
1.4. Behandlungsmethoden	8
1.4.1. Behandlungsmethoden der AML.....	9
1.4.2. Behandlung älterer Menschen mit AML	10
1.4.3. Inhibition von FLT3 durch Tyrosinkinaseinhibitoren	10
1.4.4. Übersicht von FLT3-Inhibitoren in der Einzeltherapie	11
1.5. Irreversible Tyrosinkinaseinhibitoren	15
2. Chemischer Teil I.....	17
2.1. Bis(1 <i>H</i> -indol-2-yl)methanon als Leitstruktur – frühere Arbeiten	17
2.1.1. Leitstrukturoptimierung	18
2.2. Zielsetzung.....	21
2.3. Synthese der Ausgangssubstanzen	24
2.3.1. Exemplarische Strukturaufklärung der Leitverbindung 29	25
2.3.2. Schützung des Indol-Stickstoffes	27
2.3.3. Synthese von <i>tert</i> -Butyl (1-(phenylsulfonyl)-1 <i>H</i> -indol-5-yl)carbammat (71) und <i>tert</i> -Butyl (1-(phenylsulfonyl)-1 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>b</i>]pyridin-5-yl)carbammat (72)	28
2.3.4. Synthese von <i>tert</i> -Butyl-(1-(phenylsulfonyl)-1 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>c</i>]pyridin-5-yl)carbammat (79) nach Leimgruber-Batcho	29
2.3.5. Synthese von 5-Benzoyloxybenzo[<i>b</i>]furan-2-carbonsäure (84)	30
2.3.6. Darstellung der Säurechloride	31
2.4. Kopplung und Entschützung der Bisindole.....	31
2.4.1. Alternatives Kopplungsverfahren.....	33
2.4.2. Entschützungsreaktionen	35
2.4.3. Modifikation der Aminogruppe.....	36
2.4.3.1. Einführung einer Isoxazol-Gruppe.....	36
2.4.3.2. Synthese von 3-Amino-5- <i>tert</i> -butyl-thiazol (147)	38
2.5. Potentielle irreversible Inhibitoren	40
B. Neue Indolderivate als chimäre Verbindungen	46
1. Einleitung.....	46
1.1. Chromatinstruktur	46
1.2. Posttranslationale Veränderung der Chromatinstruktur	47
1.3. Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen	47
1.4. Histon-Deacetylasen.....	49
1.5. Einfluss von HDAC bei Tumorerkrankungen.....	50
1.6. HDAC-Inhibitoren.....	50
1.6.1. Allgemeines	50
1.6.2. Strukturklassen	51
1.6.3. Histondeacetylase-Inhibitoren bei akuten Leukämien.....	53
2. Chemischer Teil II.....	55
2.1. Chimäre Verbindungen mit Strukturelementen von FLT3i und HDACi Aktivität.....	55

2.2	Zielsetzung.....	57
2.3	Synthese chimärer Verbindungen mit einem Strukturelement von 167 (SAHA).....	58
2.3.1.	Synthese von 188 (NH ₂ OTHP).....	60
2.4	Synthese chimärer Verbindungen mit einem Strukturelement von 168 (LBH-589).....	61
2.5	Synthese chimärer Verbindungen mit einem Strukturelement von 169 (MS-275).....	63
2.5.1.	Synthese von 225 (<i>N</i> -(2-aminophenyl)-4-(((2-(5-(3-(5-(<i>tert</i> -butyl)isoxazol-3-yl)harnstoff)-1 <i>H</i> -indol-2-carbonyl)-1 <i>H</i> -indol-5-yl)oxy)methyl)benzamid).....	63
C.	Pharmakologischer Teil.....	65
1.	Ergebnisse.....	65
1.1	FLT3-Inhibitoren.....	65
1.1.1	Proliferationsassay in MV4-11-Zellen.....	65
1.1.2	Messung der Apoptoseinduktion durch FLT3-Inhibitoren mittels Durchflusszytometrie.....	68
1.1.3	Proliferationsassay in FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen.....	69
1.1.4	Proliferationsassay in Zellen mit c-Kit Mutationen.....	71
1.1.5	Westernblot in MV4-11- Zellen.....	72
1.1.6	Proliferationsassay zur Spezifitätskontrolle.....	73
1.1.6.1.	Lervektor-exprimierende Ba/F3-Zellen.....	73
1.1.6.2.	BCR-Abl-exprimierende Ba/F3-Zellen.....	74
1.1.7	Kinobead-Versuch.....	75
1.1.8	Löslichkeitsuntersuchungen von 37 (BS228).....	80
1.2	Potentielle irreversible Inhibitoren.....	82
1.3	Chimäre Inhibitoren (HDAC und FLT3).....	84
1.3.1	Apoptoseinduktion der chimären HDAC/FLT3-Inihitoren.....	84
1.3.2	Einfluss der chimären HDAC/FLT3-Inhibitoren auf die Proliferation von AML-Zellen... ..	85
1.3.3	Westernblot und Durchflußzytometrische Untersuchungen.....	86
1.3.4	Proliferationsassay in FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen.....	89
D.	Zusammenfassung.....	91
E.	Experimenteller Teil.....	96
1.	Allgemeine Angaben.....	96
2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AV).....	99
3.	Synthesevorschriften.....	104
F.	Material und Methoden.....	163
2.	Material und Geräte.....	163
2.1	Kultivierung humaner Zellen.....	169
2.2	Bestimmung der Apoptosefrequenz mittels Durchflusszytometrie.....	170
2.3	Untersuchung der Proteinexpression.....	170
2.3.1.	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	170
2.3.2.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	171
2.4.	Western Blot Analyse.....	171
2.4.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	171
2.4.2.	Proteintransfer.....	172
2.4.3.	Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz.....	172
2.4.4.	Detektion der Proteine mittels Odyssey®-Infrarot-Imaging-System.....	172
2.5.	Strippen der Nitrozellulosemembran.....	173
2.6.	Immunpräzipitation.....	173
2.7.	Proliferationsassay.....	173
2.8.	Löslichkeitsversuche von 37 (BS228) mit Hilfe von UV-Absorption.....	174
G.	Formelübersicht.....	175
H.	Anhang.....	180

I	Publikationen.....	182
J	Literaturverzeichnis	183

Ac	Acetyl	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Abl	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog	DoM	Directed <i>ortho</i> -Metalation
ALL	Akute lymphoide Leukämie	ECL	Enhanced chemiluminescence
AML	Akute myeloische Leukämie	EGFR	Epidermal growth factor receptor
APCs	Antigen presentig cells	EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
APS	Ammoniumpersulfat	equiv.	Moläquivalent
aq.	Wässrig	EI	Elektronenstoß-Ionisation
Asn (N)	Asparagin	ESI	Elektrospray-Ionisation
Asp (D)	Asparaginsäure	Et	Ethyl
ATP	Adenosinriphosphat	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
AV	Allgemeine Vorschrift	FCS	Fetales Kälberserum
BCR	Breakpoint cluster region	FDA	US Food and Drug Administration
Ber.	Berechnet	FL	FLT3-Ligand
Bn	Benzyl	FLK2	Fetal liver kinase 2
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
BOP	Benzotriazololyoxytris(dimethyl amino)-phosphonium hexafluoridophosphat	FLT3i	FLT3-Inhibitor
BuLi	<i>n</i> - bzw. <i>t</i> -Butyllithium	FMS	Fibroblast-Macrophage Stimulating Factor
CD34	Cluster of Differentiation	Gef.	Gefunden
CI	Chemische Ionisierung	Glu (E)	Glutaminsäure
Ci	Curie	Gly (G)	Glycin
CML	Chronische myeloische Leukämie	h	Stunde(n)
COSY	Correlation spectroscopy	HAT	Histon-Acetyltransferase
CSF	Colony-stimulating factor	HDA1	Histon-Deacetylase 1 (Hefe)
Cys (C)	Cystein	HDAC	Histon-Deacetylase
DC	Dünnschichtchromatographie	HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
DCE	Dichlorethan	Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
DCM	Dichlormethan	His (H)	Histidin
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer	HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
DIAD	Diisoproyl azodicarboxylat	HMT	Histon-Metyltransferase
DMF	Dimethylformamid	HPLC	High performance liquid chromatography
DMFDMA	Dimethylfomamid-dimethylacetal	HRMS	High resolution mass spectrometry
DMAP	4-Dimethylaminopyridin		
DMSO	Dimethylsulfoxid		

HSP90	Hitzeschock Protein 90		Gelelektrophorese
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation	PBS	Phosphate-buffered saline
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration	PDB	RCSB Protein Data Base
IL	Interleukin	PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Ile (I)	Isoleucin	PE	Petrolether
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Ph	Phenyl
IR	Infrarot	Phe (F)	Phenylalanin
ITD	Interne Tandem-Duplikation	PI	Propidiumiodid
<i>J</i>	Kopplungskonstante	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
JM	Juxtamembrandomäne	ppm	Parts per million
KD	Kinasedomäne	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
kDa	Kilodalton	Rpd3	Reduced potassium dependency 3 (Hefe)
KI	Kinaseinsert	RT	Raumtemperatur
KIT	Stammzellfaktor Rezeptor	RTK	Rezeptortyrosinkinase
konz.	Konzentriert	SDS	Natriumdodecylsulfat
LC-MS	Liquid Chromatography Mass-Spectrometry	SIRT	Sirtuine
LDA	Lithiumdiisopropylamid	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Leu (L)	Leucin	STK1	Stem Cell-Tyrosine Kinase 1
M	mol/l	SUMO	Small ubiquitin-related modifier
m	Multipllett	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung	TBS	Tris-buffered saline
MAPKs	Mitogene activated Protein Kinases	TBST	Tris-buffered saline with Tween20
Me	Methyl	TEMED	Tetramethyl-ethylendiamin
MDR1	Multidrug resitance gene 1	THF	Tetrahydrofuran
min	Minute(n)	TKD	Tyrosinkinasedomäne
μM	Mikromolar (μmol/l)	TKil	Tyrosinkinaseinhibitor
MS	Massenspektrometrie	TMD	Transmembrandomäne
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
NMR	Nuclear magnetic resonance	Tyr (Y)	Tyrosin
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy	Val (V)	Valin
NSCLC	Non small cell lung carcinoma	WT	Wildtyp
PAGE	Polyacrylamid-	WHO	World Health Organisation

A. Neue Indolderivate als FLT3-Inhibitoren

1. Einleitung¹

1.1. Krebs

In Deutschland starben 2014 insgesamt 868 356 Menschen (422 225 Männer und 446 131 Frauen), über ein Viertel davon (121 766 Männer und 101 992 Frauen) an den Folgen von Krebs [1]. Krebs ist somit in Deutschland neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache (Abbildung 1). Ein entscheidender Einflussfaktor hierfür ist die Veränderung im Altersaufbau der Bevölkerung (Zunahme des Anteils älterer Menschen an der Bevölkerung) [2].

Zurzeit gibt es in Deutschland etwa vier bis fünf Millionen Krebskranke, wobei jährlich ca. 500 000 Menschen neu erkranken. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69.5 Jahren [2]. Bei Männern dominieren dabei bösartige Neubildungen der Verdauungsorgane und Atmungsorgane, während bei Frauen der Brustdrüsenkrebs neben den bösartigen Neubildungen der Verdauungsorgane häufigste Todesursache ist [1].

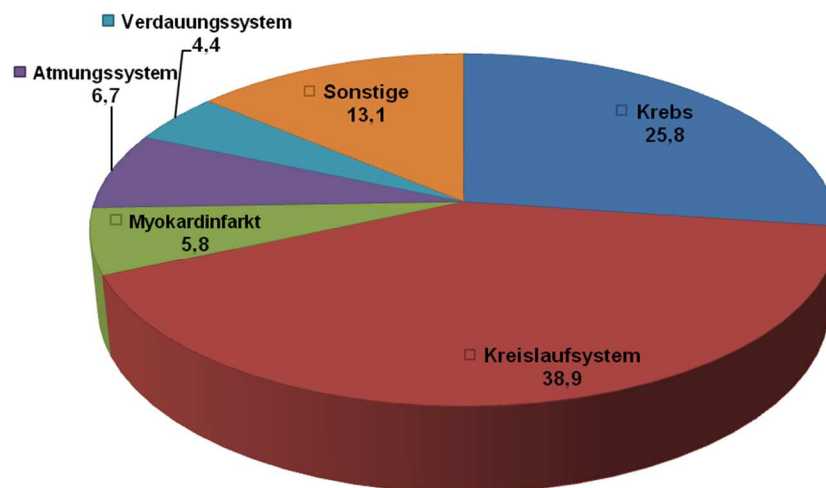


Abbildung 1. Häufigste Todesursachen in Deutschland 2014 [1].

Die Prognose für 2016 lautet laut Robert-Koch-Institut, dass ca. 498 700 Menschen neu an Krebs erkranken, davon 13 700 an Leukämie und ein Viertel davon an akuter myeloischer Leukämie (AML) [2].

¹ Dieses Kapitel ist eine aktualisierte und überarbeitete Version von Kapitel I.1. der Masterarbeit von B. Streifinger, 2010 [93].

1.2. Akute Myeloische Leukämie

1.2.1. Hämatopoese

Das menschliche Blut setzt sich aus einer Vielzahl von Zelltypen zusammen, deren Aufgaben vom Sauerstofftransport bis hin zur Antikörperbildung und Immunabwehr reichen. Obwohl die Zellen unterschiedlich in Funktion, Morphologie und Aufbau sind, haben sie dennoch Gemeinsamkeiten. Zum Beispiel kennzeichnet sie alle eine begrenzte Lebensdauer und dass sie aus gemeinsamen Vorläufer-Stammzellen, sogenannten multipotenten Stammzellen entstehen. Diese bilden die verschiedenen Blutzellen bis zum Tod eines Menschen in seinem Knochenmark immer wieder neu (Abbildung 2).

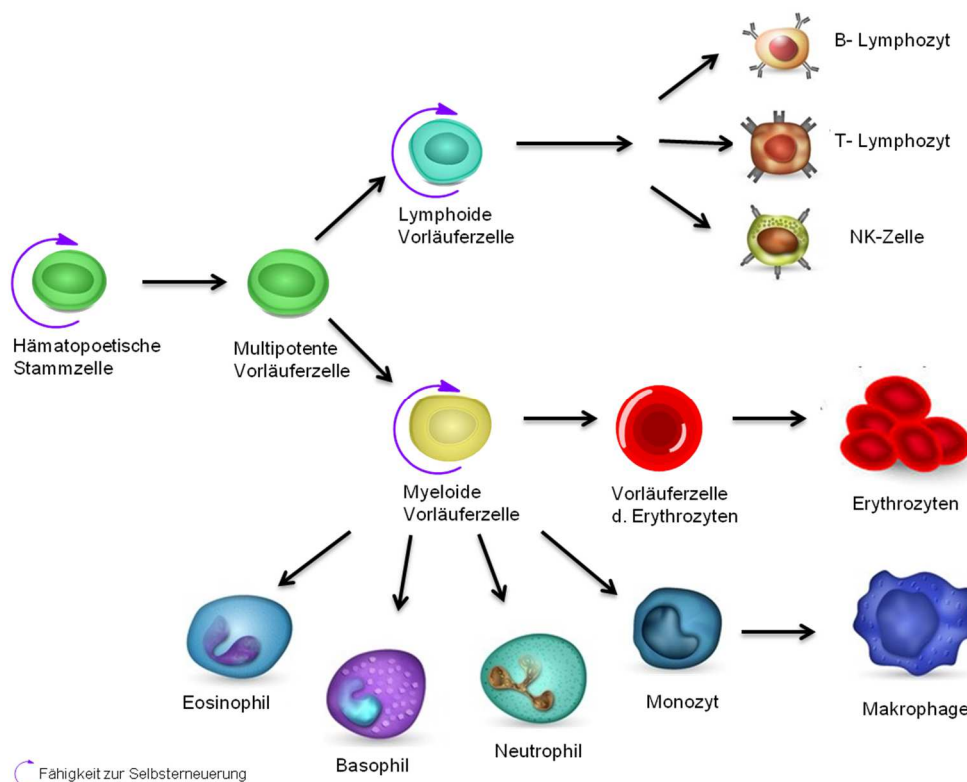


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Hämatopoese in Anlehnung an Referenz [3].

Pluripotente Stammzellen sind unbegrenzt teilungsfähig und entwickeln sich je nach einwirkendem Differenzierungssignal zu verschiedenen reifen Blutzellen, wobei ihr Überleben bzw. ihre Vermehrung sowohl vom Kontakt zur Bindegewebsmatrix im Knochenmark, als auch vom Einwirken von Wachstumsfaktoren (CSFs, Colony Stimulating Factors) abhängig ist. Diese Wachstumsfaktoren sind auch für den Differenzierungsweg der Vorläuferzellen zuständig und legen so die Laufbahn entweder auf die lymphatische oder myeloische Linie fest. Aus den lymphatischen Zellen werden im weiteren Reifungsprozess die T- und B-Lymphozyten, also die Zellen, die für die Immunabwehr verantwortlich sind. Die Zellen aus der myeloischen Linie differenzieren sich zu Erythroblasten (Vorläufer der

Erythrozyten), Makrophagen und Granulozyten (z. B. Eosinophil, Basophil, Neutrophil). Normale hämatopoetische Vorläuferzellen adhären an Zellmatrixproteine oder immobilisierte Zytokine, um somit im Knochenmark gehalten zu werden, wo ihre Proliferation und Differenzierung unter exogener Kontrolle steht. Erst die späteren Vorläuferzellen verlassen das Knochenmark und reifen extramedullär (außerhalb des Knochenmarks) weiter [4-6].

1.2.2. Leukämie

Leukämien sind Erkrankungen des blutbildenden Systems, die zu genetischen Veränderungen innerhalb pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen führen [4]. Diese verlieren ihre Fähigkeit zur Differenzierung in funktionstüchtige Granulozyten und Monozyten, wodurch ihr unkontrolliertes Wachstum zur Verdrängung der normalen Hämatopoese (Abbildung 3) führt. Bei funktionsfähigen Blutzellen führt dieser Mangel zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie [7].

Man unterscheidet generell zwei Arten von Leukämien: Die chronische und die akute Leukämie. Nach der WHO (World Health Organization)-Klassifikation [7] ist eine akute Leukämie bei einem Blastenanteil von über 20% im Knochenmark gegeben [8]. Akute Leukämien gelten als besonders aggressive Krebserkrankungen und führen ohne Behandlung binnen weniger Wochen zum Tod. Demgegenüber stehen weniger aggressive Formen, wie die chronischen Leukämien, die über mehrere Jahre verlaufen können [9].

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die häufigste Subform akuter Leukämien im Erwachsenenalter und macht ca. 80-90% aller Fälle aus [10]. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 3.7/100 000 Einwohner und steigt mit dem Lebensalter kontinuierlich an, wobei das mediane Alter bei der Diagnose bei 70 Jahren liegt [7].

1.2.3. Risikofaktoren für AML

Über die genauen Ursachen der Entstehung von Leukämien herrscht derzeit noch Ungewissheit. Durch epidemiologische Untersuchungen konnten jedoch verschiedene Faktoren, die als Auslöser der AML gelten, identifiziert werden. Solche Umweltfaktoren wie chemische Karzinogene (z. B. Benzol) oder inhalativer Nikotinkonsum sind mit einem erhöhten Risiko der Erkrankung assoziiert. Aber auch die Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen soll einen wesentlichen Risikofaktor darstellen [7, 11].

Der überwiegende Teil der Erkrankung entsteht jedoch durch Noxen (*lat.* noxa „Schaden“) im Leben eines betroffenen Individuums. Lediglich ein kleiner Prozentsatz ist erblich bedingt [10].

1.2.4. Pathogenese der AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist unter anderem durch eine deregulierte Proliferation in der Hämatopoese (Abbildung 3) charakterisiert. Dazu gibt es zwei grundlegende Theorien: 1) Die leukämische Transformation kann in jeglicher Stufe der Hämatopoese, also zwischen Stammzelle und myeloischer oder lymphoider Vorläuferzelle stattfinden [12] bzw. 2) Die AML kann ausschließlich aus der multipotenten Stammzelle entstehen [12].

Durch Mutationen im Tyrosinkinaseweg kommt es zu einer gestörten Differenzierung und Proliferation [10], wodurch die damit verbundenen Transformationen zur Entstehung von Leukämie führen. Solche chromosomalen Translokationen wie $t(15;17)$, $inv(16)$ oder $t(8;21)$ [8] beinhalten Transkriptionsfaktoren für kodierende Gene. Das führt zu sogenannten Fusionsproteinen. Diese stören wiederum die normale Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen.

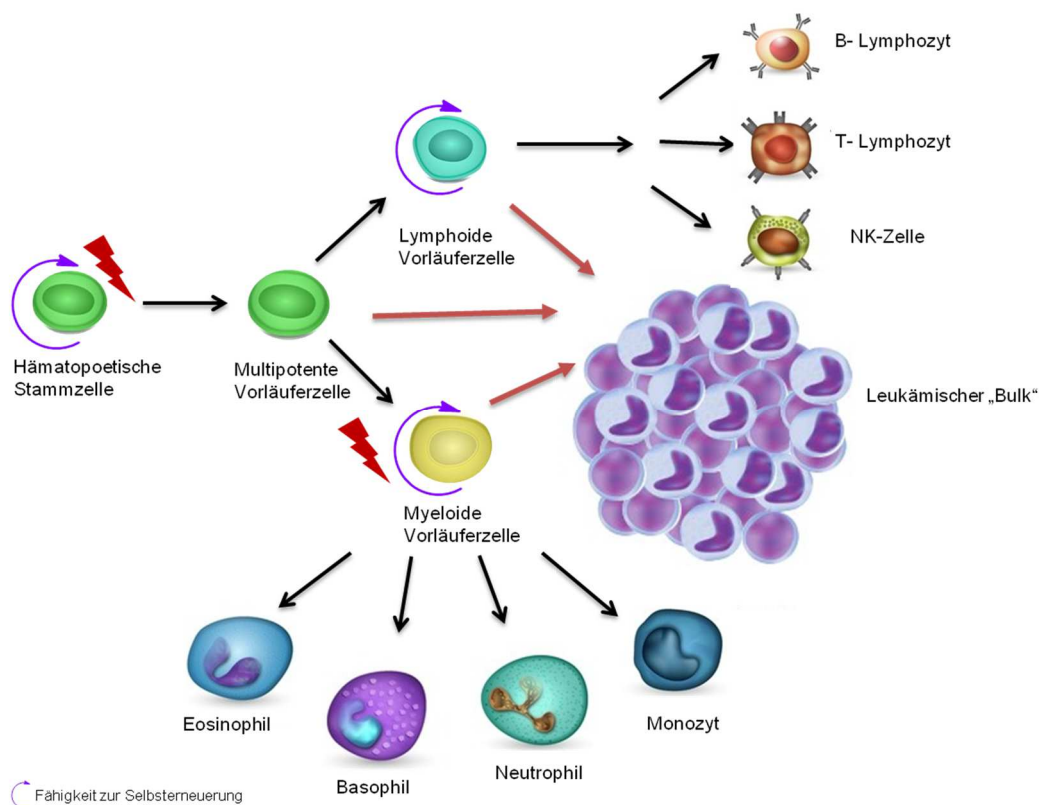


Abbildung 3. Darstellung der Hämatopoese bei AML in Anlehnung an Deshpande *et al.* [13].

In der normalen Hämatopoese und somit auch in der Leukämogenese spielt der FLT3-Rezeptor (FMS-like tyrosine kinase 3) eine wichtige Rolle, da er hauptsächlich in myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark, Thymus und den

Lymphknoten exprimiert wird [14-16]. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen in den verschiedenen hämatopoetischen Linien geht die FLT3-Expression verloren [17].

1.3 Rezeptortyrosinkinase FLT3

FLT3, auch als FLK-2 (fetal liver kinase-2) oder STK-1 (human stem cell kinase-1) bekannt, wurde 1991 unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen kloniert [14, 18]. FLT3 gehört wie PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor), KIT (Stammzellfaktor Rezeptor) und FMS (Fibroblast-Macrophage Stimulating Factor) zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen III. Diese zeichnen sich durch gemeinsame Merkmale aus [17]. Sie besitzen eine extrazelluläre Domäne, die aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht, und eine Transmembrandomäne (TMD), der sich intrazellulär die sogenannte Juxtamembrandomäne (JM) und eine geteilte Tyrosinkinasedomäne (TKD) anschließen. Der Rezeptor endet mit der carboxyterminalen Domäne. In der N-terminalen Kinasedomäne (TKD1) ist die ATP-Bindungstasche lokalisiert, während sich in der C-terminalen Kinasedomäne (TKD2) die Aktivierungsschleife befindet (Abbildung 4) [19, 20].

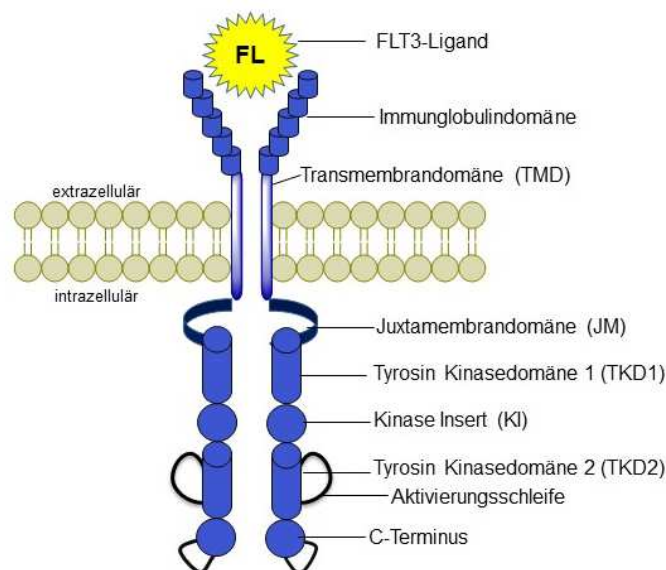


Abbildung 4. Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors mit gebundenem FLT3-Liganden (FL) in Anlehnung an Annesley *et al.* [21].

In der inaktiven Konformation liegt die Aktivierungsschleife zwischen N- und C-terminaler Kinasedomäne (TKD2) und blockiert sowohl die Bindestelle für ATP als auch die des Rezeptors für das Substrat. Nach der Aktivierung des Rezeptors durch Bindung seines Liganden (FL) nimmt der Rezeptor die offene Konformation ein und ermöglicht die Bindung

von ATP und Substrat (Abbildung 5) [19]. Die daraus resultierende Autophosphorylierung des Tyrosins-842 stabilisiert diese Konformation.

Die katalytisch aktiven Aminosäuren beider Schleifen (loops) können durch Rotation des „N-loops“ in Richtung des „C-Loops“ in der katalytisch aktiven Konformation in räumliche Nähe gebracht werden. Zusätzlich ist die Öffnung der Aktivierungsschleife durch die JM-Domäne sterisch blockiert, wodurch diese einen autoinhibitorischen Effekt auf die katalytische Aktivität der Kinase ausübt. Eine Rotation der N-terminalen Kinasedomäne in Richtung der C-terminalen wird somit verhindert, und der Rezeptor bleibt in seiner inaktiven Konformation [19, 22].

Durch die extrazelluläre Bindung des FLT3-Liganden (FL) wird die Aktivierung des Rezeptors initiiert, was in der JM-Domäne zur Dimerisierung des Rezeptors und der Transphosphorylierung der Tyrosinreste 589 und 591 (Y589, Y591) führt. Durch diese Konformationsänderung verliert die JM-Domäne ihre autoinhibitorische Funktion. Durch negative Modulation durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen werden die phosphorylierten Tyrosinreste 589 und 591 wieder dephosphoryliert, und die JM-Domäne kann wieder ihre autoinhibitorische Konformation annehmen. Mutationen in der JM-Domäne können daher zum Verlust dieser autoinhibitorischen Funktion führen, was in einer konstitutiv aktiven Kinase resultieren kann [22].

1.3.1 Signaltransduktionsweg des FLT3-Rezeptors

Der allgemeine Aktivierungsmechanismus von Rezeptortyrosinkinase (RTKs) unterteilt sich in drei Schritte (Abbildung 5):

a) Bindung des Liganden, b) Dimerisierung und c) Autophosphorylierung des Rezeptors.

a) Die meisten RTKs liegen in der Plasmamembran unstimuliert als Monomere vor (durch Autoinhibierung deaktiviert). Erst nach extrazellulärer Bindung des Liganden induziert dieser eine Homo- bzw. Heterodimerisierung des Rezeptors [22] (b). Diese Dimerisierung führt zur Konformationsänderung der Aktivierungsschleife. Das ermöglicht die Autophosphorylierung des Rezeptors an spezifischen Tyrosinresten in der JM-Domäne und KD (Kinasedomänen). c) Aufgrund der Phosphorylierung wird die offene Konformation der Aktivierungsschleife stabilisiert, sie kann somit ebenfalls als Bindungsstelle für Effektorproteine dienen. Dies führt zu einer intrazellulären Signalweiterleitung [17, 19].

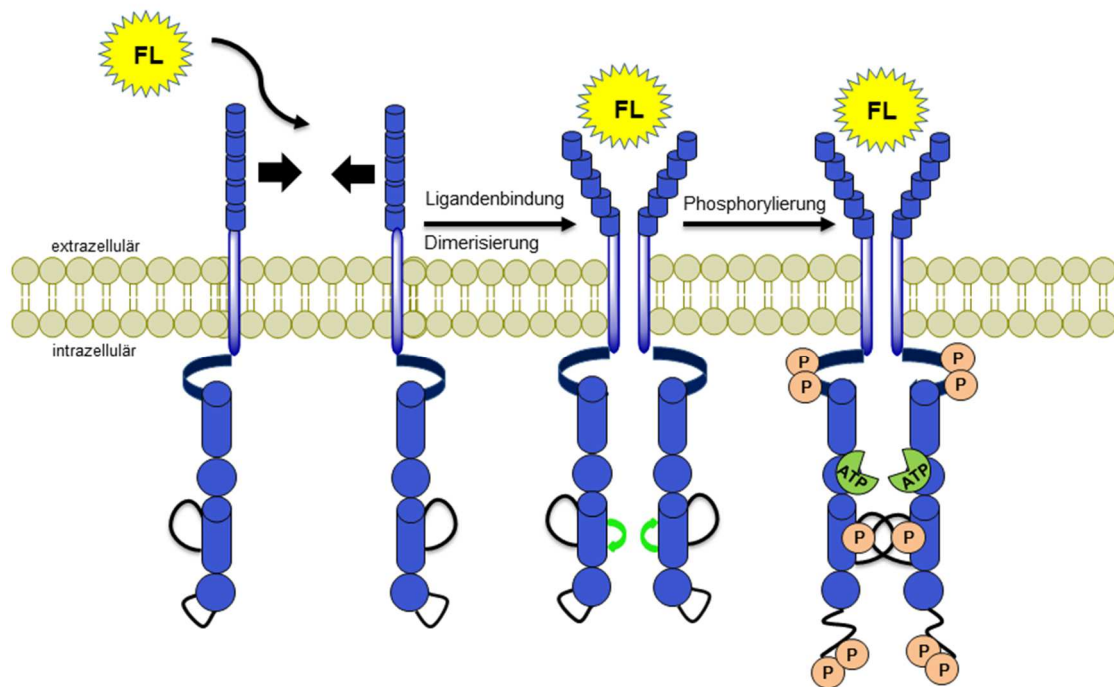


Abbildung 5. FLT3-Signaltransduktionsweg mittels Ligandenbindung, Dimerisierung und anschließender Autophosphorylierung in Anlehnung an Stirewalt *et al.* [17].

1.3.2 Mutationstypen des FLT3-Rezeptors

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine schwerwiegende Erkrankung, deren Therapie mit den gegenwärtig verfügbaren etablierten Verfahren nur bei einem Teil der Patienten erfolgreich ist. Ansatzpunkte für neue Therapien bieten molekulare Aberrationen in AML Zellen. Mutationen im Gen für FLT3 (Abbildung 6) gehören zu den häufigsten bisher identifizierten genetischen Läsionen [23, 24].

1. FLT3-ITD-Mutationen in der JM-Domäne wurden erstmals 1996 von Nakao *et al.* [24] in 20-25% der Patienten mit AML beobachtet [24, 25]. FLT3-ITDs (Interne Tandem-Duplikationen) variieren in ihrer Lokalisation und Länge von 3 bis 400 Basenpaaren und behalten durch die Insertion in der „head-to-tail“ Orientierung den Leserrahmen bei. ITD-Mutationen verursachen somit eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors [24, 26, 27].
2. Missense-Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne (FLT3-TKD) treten bei 7% der Patienten mit AML auf [27-30]. Am häufigsten betroffen ist ein Aspartat (Asp, D) an Position 835, welches meist durch Tyrosin substituiert wird. Daneben sind auch Substitutionen von D835 zu Histidin (His, H), Valin (Val, V) und Glutamat (Glu, E) beschrieben [31]. Weitere identifizierte Mutationen in der Aktivierungsschleife sind Y842C

[32] (Ersatz von Tyrosin durch Cystein), sowie der Verlust oder die Substitution von Isoleucin an Position 836 (FLT3-Ile836del) [32] oder (FLT3-Ile836M+R) [33].

Obwohl beide Mutationen (FLT3-ITD [34] und FLT3-TKD (Tyrosinkinasedomäne) zur konstitutiven Autophosphorylierung des Rezeptors, sowie zur Ligand-unabhängigen Proliferation führen, zeigen beide Mutationen Unterschiede im Signalverhalten und ihrem Transformationspotential [35]. Neben den oben beschriebenen Mutationen (FLT3-ITD und FLT3-TKD) wurden in einigen AML-Fällen auch Punktmutationen in der JM-Domäne (FLT3-JM-PM) [36] und auch ITD-Mutationen außerhalb der JM-Domäne [37] identifiziert.

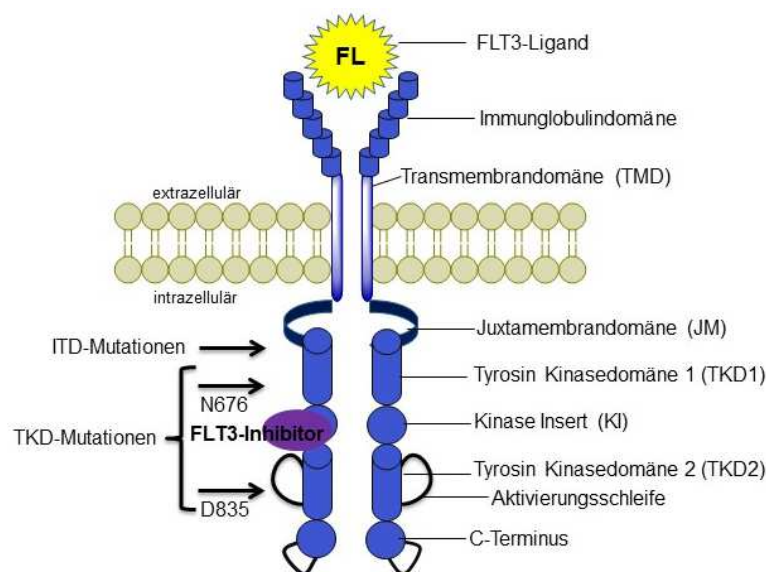


Abbildung 6. Darstellung möglicher Mutationstypen des FLT3-Rezeptors in Anlehnung an Annesley *et al.* [21].

1.4 Behandlungsmethoden

Für alle Krebsarten zusammengefasst, liegt die Heilungsrate bei Krebs derzeit bei 30-40% [38]. Es ist bis heute in der Medizin nicht möglich, Krebszellen wieder in normale Zellen zurück zu führen. Es bleiben somit nur die Behandlungsmethoden, die das Wachstum der Krebszellen hemmen oder diese vernichten [39]. Da es jedoch viele verschiedene Arten von Krebs gibt, sind auch ganz unterschiedliche Herangehensweisen bei der Behandlung erforderlich. Die drei Säulen der Krebstherapie sind aber nach wie vor Operation, Bestrahlung und Chemotherapie [39], wobei meistens eine Kombination verschiedener Therapien zum Einsatz kommt. Auf allen drei Gebieten wurden in den letzten Jahrzehnten deutliche Fortschritte erzielt, sodass sich auch die Überlebenschancen der Patienten verbessert haben.

Die vollständige operative Entfernung des Tumors ist oftmals die Grundlage einer erfolgreichen Krebstherapie. Meist kommen aber ergänzend weitere Therapien hinzu: 1) Bei der Strahlentherapie werden meist sehr kurzweilige intensive Gammastrahlen und Röntgenstrahlen benutzt, um Krebszellen zu zerstören. Dies kann in Form einer unterstützenden (neoadjuvanten) Therapie vor einer Operation zur Verkleinerung des Tumors erfolgen oder auch nach (adjuvant) einer Operation, um noch verbliebene Krebszellen abzutöten. 2) Bei einer Chemotherapie werden Zellgifte, sogenannte Zytostatika verabreicht, die die Zellvermehrung hemmen. Sie werden über das Blut im gesamten Körper verteilt. Dies ist durchaus erwünscht, um auch eventuell angesiedelte Krebszellen (Metastasen) zu erreichen. Meist werden heute verschiedene Mittel kombiniert, um eine Resistenzbildung des Tumors zu verhindern. Da die Zellgifte auch gesunde Zellen schädigen, besonders solche, die sich häufig teilen, kommt es dabei zu verschiedenen Nebenwirkungen wie Blutarmut, Haarausfall, Entzündungen der Mundschleimhaut, Übelkeit und Erbrechen [40].

1.4.1 Behandlungsmethoden der AML

Behandelt man AML nicht, führt diese aggressive Krebserkrankung binnen weniger Wochen zum Tod der Patienten [9]. Ziel der AML-Therapie ist eine Eliminierung der malignen Zellpopulationen und eine möglichst schnelle Wiederherstellung der normalen Hämatopoese. Verschiedene Therapieansätze sind dabei möglich und werden im Folgenden diskutiert:

1. Induktionstherapie: In diesem Therapiezyklus soll eine Knochenmarkaplasie und eine deutliche Reduktion der leukämischen Zellen erzielt werden [11]. Jedoch wird angenommen, dass persistierende Zellen „unentdeckt“ bleiben und wieder zu einem Rezidiv (Wiederauftreten) führen könnten. Diese sollen darauffolgend in weiteren Behandlungsphasen eradiziert (eliminiert) werden [11, 41].

2. Chemotherapie: Die häufigste Behandlungsmethode bei AML ist hierbei die Gabe von Cytarabin mit Anthrazyklinen [42]. Die Chemotherapie gliedert sich dabei in mehrere Zyklen, die durch Intervalle voneinander getrennt sind. In diesen sollen sich gesunde Zellen regenerieren können. Zur Beurteilung des Therapieerfolges wird in regelmäßigen Abständen z. B. das Knochenmark untersucht [41].

3. Allogene Stammzelltransplantation: Hierbei soll das erkrankte Knochenmark durch gesundes ersetzt werden. Dies geschieht mittels eines passenden Spenders, dessen gereinigte Blutstammzellen dem Patienten eingesetzt werden können. Diese Therapieform ist jedoch erst nach Abtötung aller leukämischen Zellen und Blasten möglich [11].

Trotz intensiver Therapien ist die Prognose bei AML jedoch sehr schlecht. Die 5-Jahres Überlebensrate [43] bei Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, ist weniger als 40% und bei älteren Patienten (> 60 Jahre) nicht mehr als 20% [42].

1.4.2 Behandlung älterer Menschen mit AML

Die AML des älteren Menschen, d.h. in einem Alter von über 60 Jahren, weist im Vergleich zur Erkrankung des jüngeren Menschen Besonderheiten auf. Es finden sich häufiger sekundäre Erkrankungen, sowie numerische und Hochrisikoaberrationen. Demgegenüber treten seltener balancierte Translokationen und Niedrigrisikoaberrationen auf. Des Weiteren findet man häufig eine Überexpression des Resistenzgens MDR1 [44]. Dies alles führt zu einer vermehrten Therapierefraktärität und einer hohen Rezidivrate. Zusätzlich liegen oft Begleiterkrankungen vor, und die therapieassoziierte Mortalität ist höher. Eine intensive Therapie kann also oft nicht oder nur unvollständig durchgeführt werden. Das verschlechtert die Prognose der älteren Patienten weiter. Gleichzeitig lassen sich ältere Patienten aber auch insbesondere anhand der Zytogenetik in Risikogruppen einteilen [45], sodass auch für diese Patienten ein stratifiziertes therapeutisches Vorgehen diskutiert wird. Es wird vorgeschlagen, bei älteren Niedrig- und Standardrisikopatienten eine konventionelle Induktionstherapie zu versuchen. Hochrisikopatienten, definiert durch die Zytogenetik, die MDR1-Expression oder FLT3-Mutationen, sprechen hingegen sehr wahrscheinlich nicht auf eine solche konventionelle Therapie an und sollten alternativen Therapieverfahren im Rahmen von Studien zugeführt werden [46].

1.4.3 Inhibition von FLT3 durch Tyrosinkinaseinhibitoren

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass aktivierende FLT3-Mutationen, insbesondere vom ITD-Typ, kausal an der Leukämogenese beteiligt sind und zur Proliferation und Apoptose-Resistenz leukämischer Blasten beitragen [47]. Hemmstoffe der Tyrosinkinase-Aktivität von FLT3 können deshalb aussichtsreiche neue Wirkstoffe für die Behandlung der AML sein. Diesbezüglich wurde bereits eine Anzahl sehr potenter und teilweise auch selektiver FLT3-Inhibitoren (FLT3i) entwickelt und charakterisiert [24]. Die meisten der potenziellen Therapeutika, die sich gegenwärtig in der Entwicklung befinden, sind direkte Inhibitoren des FLT3-Rezeptors. Solche sogenannten „small molecule drugs“ werden in Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie untersucht, und es gibt Anzeichen dafür, dass Inhibitoren von mutierter FLT3 für die normale Hämatopoese weniger schädlich sind, als DNA-interkalierende Chemotherapeutika [24, 48-50]. FLT3-Inhibitoren können in zwei Klassen unterteilt werden, die erste und die zweite Generation (Abbildung 7). Die erste Generation von FLT3i sind z. B. Midostaurin 1 (PKC412), Lestaurinib (CEP-701) 2,

Sorafenib (BAY 43-9006) **3**, Semaxanib (SU5416) **4** und Sunitinib **5** (SU11248) [24, 49]. Inhibitoren dieser Generation werden auch als sogenannte Multi-Kinase-Inhibitoren bezeichnet. Sie zeichnen sich durch ihre begrenzte Wirkdauer aus [49, 51, 52]. Die zweite Generation von TKi gegen FLT3-ITD sollte sich daher in Selektivität, Spezifität und Wirkdauer in der Behandlung von AML auszeichnen. Prominente Vertreter dieser Generation sind Tandutinib (MLN518) **6** [49, 51], KW-2449 **7** [49, 53, 54] und Quizartinib (AC 220) **8** [24, 49, 52].

1.4.4 Übersicht von FLT3-Inhibitoren in der Einzeltherapie

- Midostaurin (**1**): Dieses „small molecule“ hat die Phase 3 der klinischen Testung erfolgreich abgeschlossen [55]. Midostaurin inhibiert mutiertes FLT3, wobei Mutationen wie die Interne Tandem-Duplikation (FLT3-ITD) und die Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne des Moleküls an den Positionen 835 und 836 gehemmt werden [24]. Midostaurin (**1**) wurde von der FDA 2017 zur Behandlung von Patienten mit neu diagnostizierter AML mit Mutationen zugelassen [56].
- Lestaurtinib (**2**): Lestaurtinib befindet sich in Phase 1/2 der klinischen Testung. Es werden dabei Patienten mit rezidiver AML behandelt, wobei Lestaurtinib mutiertes FLT3 inhibiert. Ältere Patienten (> 70 Jahre) mit unbehandelter AML werden in Phase 2 mit Lestaurtinib behandelt. Lestaurtinib inhibiert sowohl FLT3 Wildtyp als auch mutiertes FLT3 [24, 57, 58].
- Sorafenib (**3**): Der Tyrosinkinasehemmer Sorafenib befindet sich derzeit in der klinischen Phase 1. Es werden Patienten mit rezidiver AML behandelt. Die Patienten zeigen zwar ein Ansprechen, jedoch kann mit einer Monotherapie keine komplette Remission erreicht werden [24, 59]. Sorafenib (Nexavar®) wurde bereits für die Therapie des Leberzellkarzinoms [60, 61] und des Nierenzellkarzinoms [60, 62, 63] zugelassen.
- Semaxanib (**4**): Semaxanib hat die Phase 2 bei Patienten mit rezidiver AML oder MDS (Myelodysplastisches Syndrom) abgeschlossen [64]. Semaxanib inhibiert sowohl FLT3 Wildtyp als auch mutiertes FLT3 [24, 65].
- Sunitinib (**5**): Die erwarteten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Effekte von Sunitinib wurden in einer Monotherapie der Phase 1 Studie in Patienten mit AML bestätigt [24, 66]. Jedoch waren sowohl die Wirkstärke als auch die Wirkdauer der Inhibition der FLT3 Tyrosin-Phosphorylierung von der Dosis und den Plasmaspiegeln abhängig. Signifikante und anhaltende Inhibition (>24 h) der

Phosphorylierung von FLT3-ITD und FLT3-WT konnte nur in Patienten mit einem Plasmaspiegel >50 - 100 ng/ml beobachtet werden [24]. Sunitinib (Sutent®) wurde im Juli 2006 in Europa zur Behandlung von Patienten mit Nierenzellkarzinomen [62] sowie gastrointestinalen Stromatumoren zugelassen [67].

- **Tandutinib (6)**: In einer Phase 1 Studie bei AML Patienten mit FLT3-ITD Mutation zeigte Tandutinib (6) bei 40% einen anti-leukämischen Effekt. Jedoch konnte keine komplette Remission erreicht werden [51]. Eine Phase 2 Studie für Patienten mit AML, die für eine Standard Induktionstherapie nicht geeignet waren, wurde nicht durchgeführt (NCT00297921).
- **KW-2449 (7)**: KW-2449 wurde als FLT3-Inhibitor in Phase 1 bei AML Patienten getestet. Die gewünschte FLT3-Inhibition konnte bei vielen Patienten in der höchsten Dosis nicht erreicht werden. Aus diesem Grund wurde die weitere Entwicklung dieses Inhibitors für AML eingestellt [50].
- **Quizartinib 8 (AC220)**: Durch Screening einer Substanzbibliothek konnte dieser neue FLT3-selektive Tyrosinkinaseinhibitor, ein Bisaryl-Harnstoffderivat identifiziert werden [24, 52]. **8 (AC220)** hat die Phase 1 bei Patienten mit rezidiver AML abgeschlossen, gegenwärtig läuft Phase 2 an. **8 (AC220)** inhibiert sowohl FLT3-WT als auch mutiertes FLT3 [24, 49]. Zusätzlich läuft für **8 (AC220)** die Vorbereitung für die klinische Phase 3 bei Behandlung von AML in Kombination mit Zytostatika (NCT02039726). **8 (AC220)** ist ein sogenannter Typ II Tyrosinkinaseinhibitor, da er die inaktive Konformation des FLT3-Rezeptors stabilisiert [68].
- **Crenolanib (9)**: **9 (Crenolanib)** wurde ursprünglich als PDGFR Inhibitor entwickelt [69]. Es zeigt jedoch vielversprechende Ergebnisse bei FLT3-ITD und FLT3-TKD Mutationen, die gegen den Typ II Tyrosinkinaseinhibitor **8 (AC220)** resistent sind [70-72]. **9 (Crenolanib)** hat bereits die Phase 2 in rezidiver AML mit sekundären FLT3-Mutationen abgeschlossen (NCT01522469).

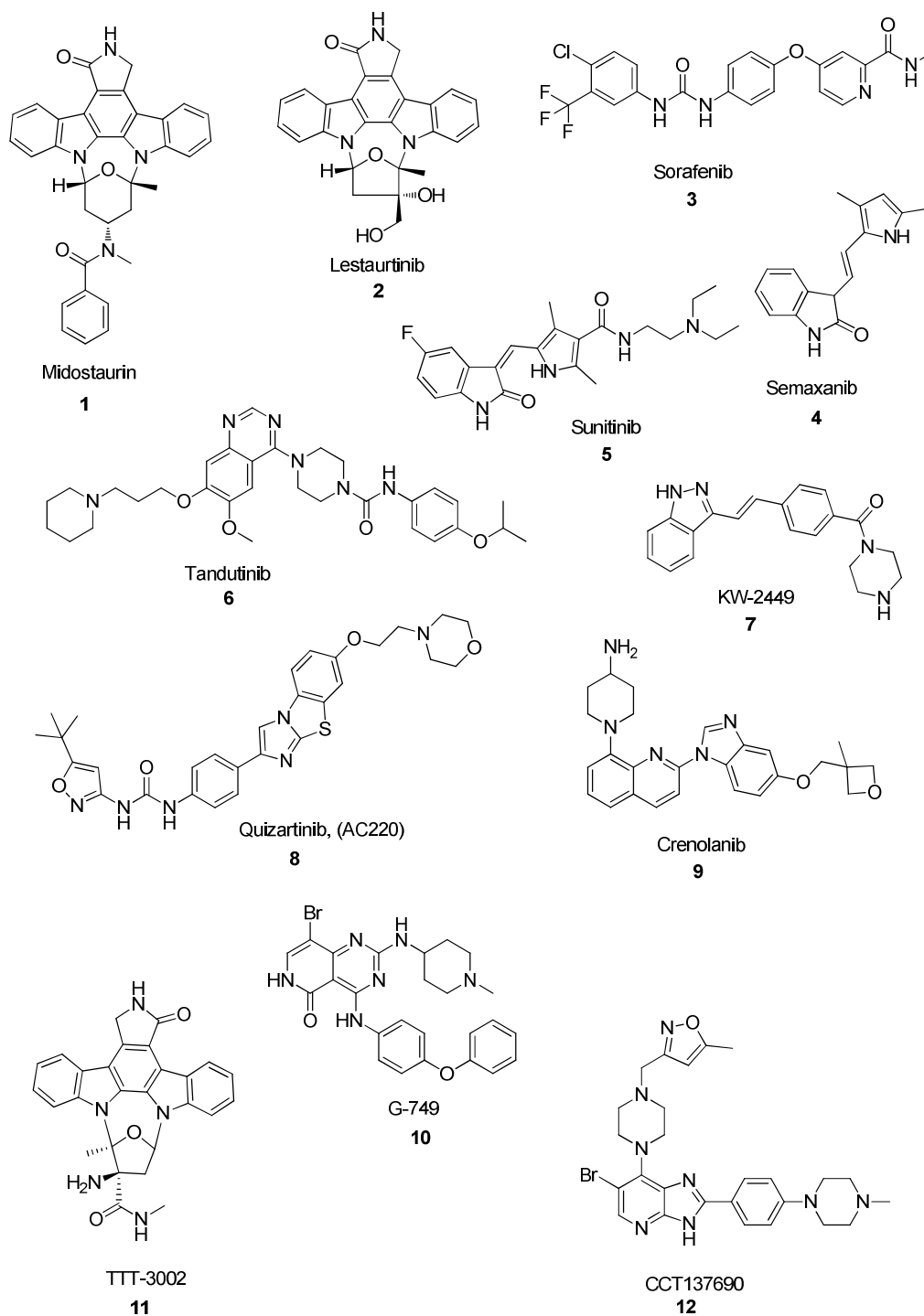


Abbildung 7. Übersicht bekannter FLT3- und Kinase-Inhibitoren.

Trotz 50-90% kompletter Remission nach Primärtherapie [73], erleidet der Großteil der Patienten von AML einen Rückfall. Diese Behandlungsmisserfolge können beispielsweise durch Resistenzen verursacht werden.

Bei der Therapie von FLT3-ITD-positiven Patienten mit **1** (PKC412) [28] oder **8** (AC220) [74] entstehen bei einem erheblichen Anteil der Patienten sekundäre FLT3-Mutationen, welche kausal an der Leukämogenese beteiligt sind [28]. Mutationen der FLT3-ITD in Positionen

D835 und Y842, die sich in der Aktivierungsschleife befinden, im sogenannten „*gatekeeper residue*“ F691 [74], oder Mutationen von FLT3 in N676 [75] führen zu einer Verringerung oder gar einem Verlust der Sensitivität gegenüber **8** (AC220) [76]. Sperrige und hydrophobe Substitutionen am D835 (D → Y / V / I / F) oder an Y842 (Y → C / H) verhindern die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Resten D835 und S838 [76] (Abbildung 8). Solche Mutationen stabilisieren das Asp-Phe-Gly-[DFG]-Motiv in der aktiven, so genannten „DFG-in“-Konformation von FLT3-ITD, was einen Verlust der Empfindlichkeit für **8** (AC220) bedingt, da dieses bevorzugt die inaktive, „DFG-out“-Konformation von FLT3-ITD bindet. *Gatekeeper*-Mutationen wie F691L beeinträchtigen ebenfalls die Bindung von **8** (AC220), indem keine π - π Wechselwirkungen zwischen dem Phenylalanin-Ring und dem zentralen flachen Aromatengerüst von **8** (AC220) ausgebildet werden können [76, 77]. N676 hingegen liegt in der ATP-Bindungsregion und stört durch ihre Mutation N676K die Autoinhibition von FLT3 [75]. Zur Überwindung dieser Resistenzen wurden neue Verbindungen getestet, wie z. B. **9** (Crenolanib) [70, 71, 78], **10** (G-749) [79], **11** (TTT-3002) [80], sowie duale Kinase-Inhibitoren, z. B. **12** (CCT137690) gegen FLT3 und Aurora-Kinasen [81].

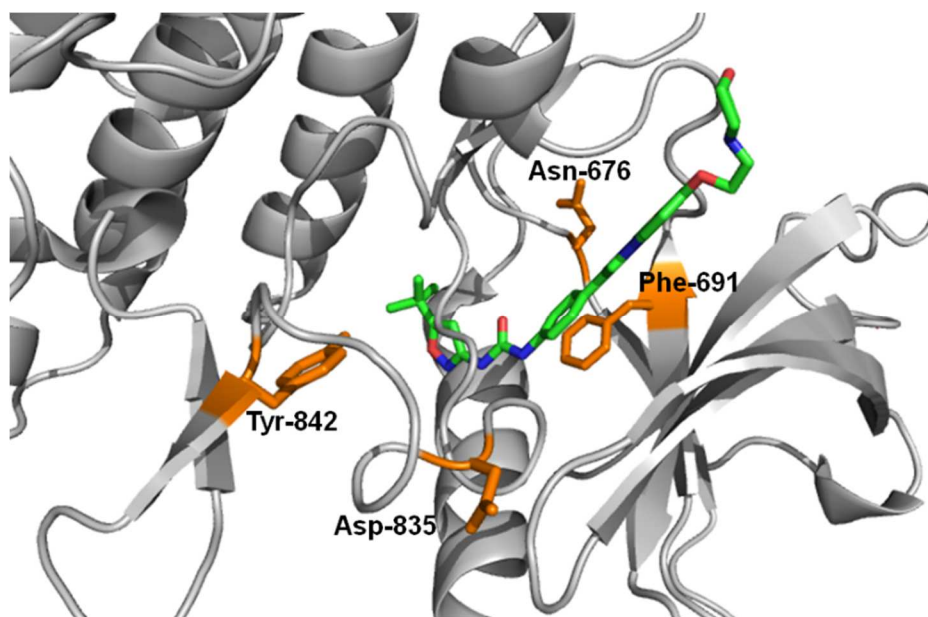


Abbildung 8. Röntgenkristallstruktur von **8** (AC220) in der FLT3-Kinasedomäne. Die Kinase (silber) und die Aminosäuren (orange) in „Cartoon“-Darstellung, **8** (AC220) (grün) als „Stick“-Modell (PDB:4XUF).

Das Benzamidinchinolin **9** (Crenolanib), das ursprünglich als PDGFR-Inhibitor [70] entwickelt wurde, ist zur Zeit der am meisten beschriebene TKi gegen Therapie-assoziierte FLT3-ITD Mutationen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander gezeigt, dass **9** (Crenolanib) Eigenschaften eines Typ I TKi gegenüber FLT3-ITD und dessen Mutanten aufweist [70-72], wodurch **9** (Crenolanib) die Fähigkeit hat, die Kinase in ihrer aktiven Konformation zu hemmen. Außerdem zeigt **9** (Crenolanib) einen inhibitorischen Effekt

gegenüber Wildtyp-FLT3-ITD und FLT3-ITD mit sekundären TKD-Mutationen an D835 oder F691 *in vitro* und *in vivo*. In Kombination mit **3** (Sorafenib) verringert **9** (Crenolanib) sogar die Leukämielast und verlängert das Überleben von leukämischen Mäusen [70]. Obwohl Typ I Inhibitoren oftmals unspezifisch sind [82], hemmt **9** (Crenolanib) FLT3-ITD und dessen KD-Mutanten etwa 100-fach potenter als c-KIT [72] (vgl. Kapitel C 1.1.4). Letzteres ist wichtig, weil eine kombinierte Hemmung von FLT3 und c-KIT schädlich für die normale Hämatopoese ist [72]. So verursacht z. B. eine starke FLT3-Inhibition durch z. B. **8** (AC220) in Kombination mit einer Hemmung des c-KIT eine schwere Myelosuppression in Leukämiepatienten [71, 72]. Wirkstoffe wie beispielsweise **3** (Sorafenib) hemmen ebenfalls FLT3 und c-KIT [72].

1.5 Irreversible Tyrosinkinaseinhibitoren

Aufgrund der limitierten Effektivität bereits bekannter TKi legten Parke-Davis und Wyeth Ende der 1990er Jahre den Grundstein für eine neue Art von Inhibitoren, sogenannte irreversible Inhibitoren [83, 84].

Derzeit sind die meisten Protein-Kinase-Inhibitoren reversible kompetitive ATP-Inhibitoren. Diese Klasse von Inhibitoren bindet in der Regel in der ATP-Bindungstasche und inhibiert auf diese Weise die enzymatische Wirkung der Kinase. So wird die damit verbundene Signaltransduktionskaskade ausgeschaltet [84].

Um sogenannte irreversible Inhibitoren zu erhalten, werden im Allgemeinen bereits aktive reversible Protein-Kinase-Inhibitoren durch die Einführung elektrophiler Gruppen modifiziert [84]. Die so erhaltenen Inhibitoren können z. B. mit nukleophilen Thiolgruppen von Cysteinresten der Protein-Kinase eine kovalente Bindung eingehen. Dazu binden die Inhibitoren zuerst reversibel in die ATP Bindungstasche, und das Michael-System (in Abbildung 9 blau) kann anschließend mit einem benachbarten Cystein eine kovalente Bindung eingehen. Vorteil dabei ist der doppelte Bindungsmechanismus [84], der zur Selektivitätssteigerung führt und somit die katalytische Aktivität und die damit einhergehenden nachgeschalteten Signale der Kinase dauerhaft blockiert [85].

Die derzeit bekanntesten irreversiblen Inhibitoren gehören zur Gruppe der EGFR-Kinase-Inhibitoren (Epidermal Growth Factor Receptor). Die reversiblen ATP kompetitiven Inhibitoren **13** (Erlotinib) und **14** (Gefitinib) werden zur Behandlung von NSCLC (non-small-cell lung carcinoma) eingesetzt. Ihre Effektivität ist jedoch meist von kurzer Dauer, da mehr als 50% der Patienten wirkstoffresistente Mutationen des EGFR entwickeln. Aus diesem Grund wurden diese reversiblen Kinase-Inhibitoren durch Michael-Akzeptoren mit elektrophilen Gruppen modifiziert [84]. Durch Modifikationen des Grundkörpers **13** (Erlotinib)

durch Anfügen von elektrophilen Substituenten konnten Strukturen wie **15** (PD-168393) [83] oder **16** (CL-387, 785) erhalten werden. Den Grundkörper von **14** (Gefitinib) modifizierte man mit dem Michael-Akzeptor Acrylamid oder einer substituierten Acrylamid-Struktur, um **18** (Canertinib, CI-1033) [83, 86] und **17** (Afatinib, BIBW-2992) [84, 87] zu erhalten (Abbildung 9). **17** wurde bereits von der FDA (US Food and Drug Administration) unter den Markennamen Gilotrif® zur Behandlung von NSCLC zugelassen [88].

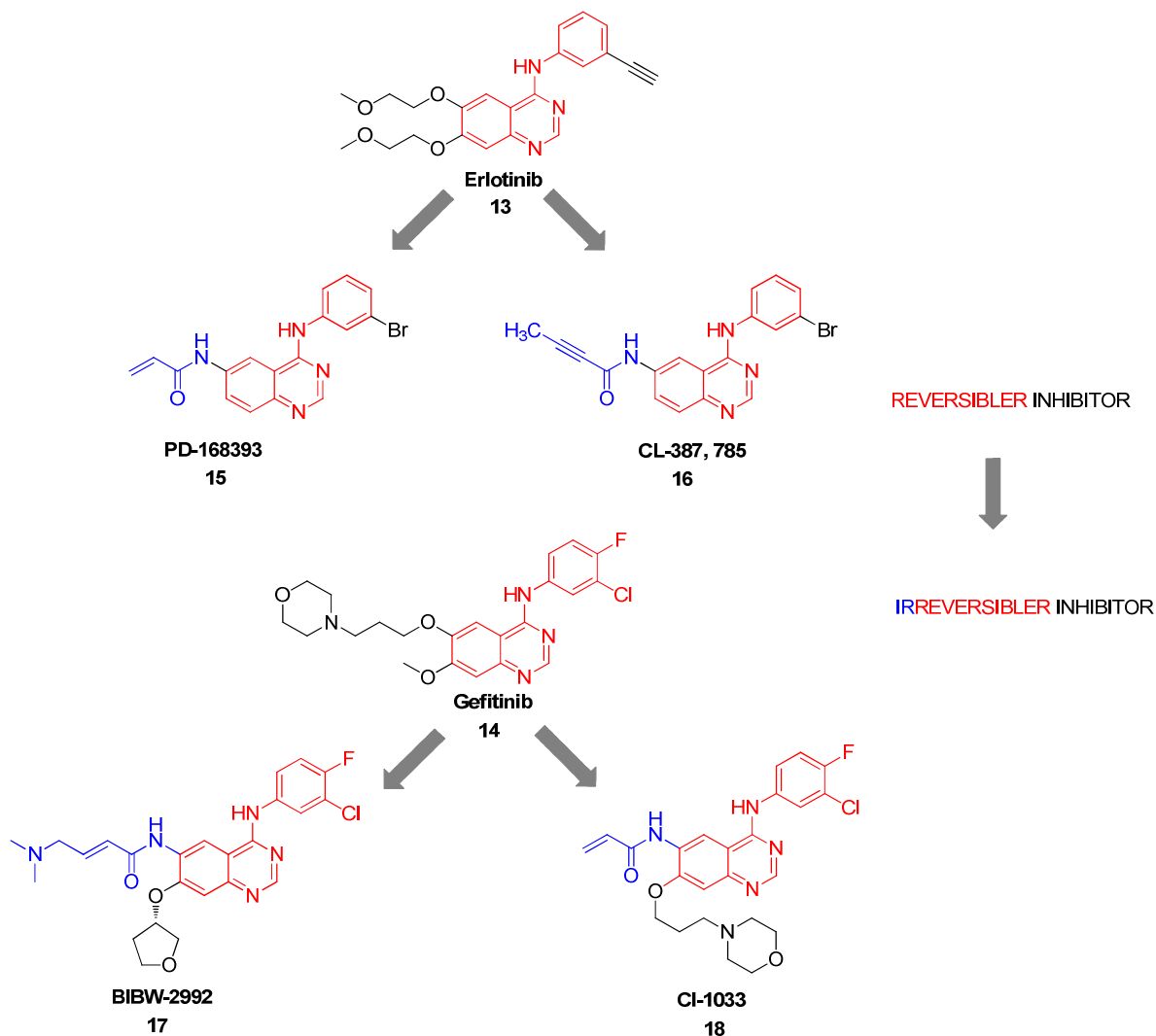


Abbildung 9. Darstellung von reversiblen und ihren entsprechenden irreversiblen Inhibitoren.

2. Chemischer Teil I

2.1 Bis(1*H*-indol-2-yl)methanon als Leitstruktur – frühere Arbeiten

Eine Substanzklasse potenter Hemmstoffe der PDGF-Rezeptortyrosinkinasen (Platelet-derived growth factor) stellen die Bis(1*H*-indol-2-yl)methanone dar, welche in der Arbeitsgruppe Mahboobi entwickelt wurden [89]. Während FLT3 für die Proliferation und Differenzierung der normalen Hämatopoese verantwortlich ist, ist PDGFR unter anderem an der Wundheilung und der Regulation der Hämatopoese im Bindegewebe beteiligt. Eine Überexpression von PDGF-Rezeptors wird neben malignen Erkrankungen mit erhöhtem Zellwachstum auch bei Arteriosklerose und Fibrose beobachtet [90]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Bindungstaschen von FLT3- und PDGF-Rezeptoren [90] für potentielle Inhibitoren wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu deren Selektivität für FLT3 gegenüber PDGF untersucht. Da beide Kinasen zur Klasse III der Rezeptortyrosinkinasen gehören, konnte für die Substanzklasse der Bis(1*H*-indol-2-yl)methanone (Abbildung 10) auch für FLT3 eine hohe Affinität festgestellt werden. Mit gezielten chemischen Modifikationen am Bisindol-Grundgerüst von **19** versuchte man daraufhin, Wirkung und Selektivität gegenüber FLT3 bzw. PDGF zu optimieren (Tabelle 1) [91].

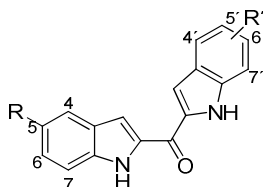


Abbildung 10. Grundkörper Bis(1*H*-indol-2-yl)methanon (**19**) [91].

Verbindung	R	R'	FLT3 IC ₅₀ [μM]	PDGF IC ₅₀ [μM]	Selektivitätsfaktor
19	H	H	4.60	1.00	4.6
20	OCH ₃	6'- F	7.6	0.84	9.1
21	OCH ₃	H	3.20	0.30	10.6
22	OCH ₃	6'- Cl	9.40	0.20	47
23	OH	4'- CH ₃	0.06	0.96	16
24	OH	5'- OH	0.04	0.30	7.5

Tabelle 1. FLT3- und PDGF-Rezeptor Inhibitoren aus der Klasse der Bisindolylmethanone [91].

Durch Derivatisierung von **19** mit polaren Gruppen konnte nicht nur die Selektivität, sondern auch die Wirksamkeit deutlich gesteigert werden. Wurde beispielsweise eine Methoxygruppe

in Position 5 (**20-22**) eingeführt, führte dies zu einer Selektivitätssteigerung (9 bis 47) bezüglich des PDGF-Rezeptors, wohingegen die Modifikation mit einer Hydroxygruppe in Position 5 (**23** und **24**) die Wirkung und Selektivität um den Faktor 7.5 bis 16 zugunsten der FLT3-Kinase erhöhte [91].

2.1.1. Leitstrukturoptimierung

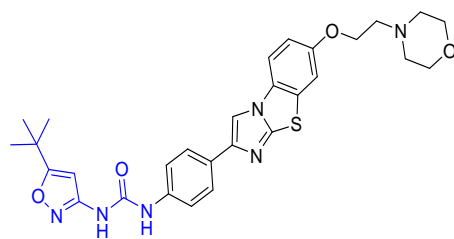
Von den entwickelten Strukturen aus Tabelle 1 zeigen die Verbindungen **23** und **24** die größte inhibitorische Wirkung bezüglich der FLT3-Kinase. Ein großes Problem dieser Bisindole ist jedoch ihre geringe Bioverfügbarkeit, die bereits in *in vitro* Tests aufgrund ihrer zu geringen Löslichkeit auffallen.

Diese Verbindungen sollten als „Leitstrukturen“ dienen, um gezielte chemische Modifikationen durchzuführen. Es sollten dadurch kritische Eigenschaften wie z. B. höhere Selektivität, verbesserte Bioverfügbarkeit oder auch potentere Wirkung erzielt werden. Um chemisch äquivalente Modifikationen durchzuführen, kann man den sogenannten *Grimmschen Hybridverschiebungssatz* anwenden. Dieser besagt, dass: „Atome durch die Aufnahme von n -Wasserstoff-Atomen ($n = 1, 2, 3$ oder 4) die Eigenschaften der im Periodensystem um n -Ordnungszahlen höheren Atome annehmen.“ Daraus ergibt sich, dass z. B. ein Stickstoffatom einer CH- („aza-Analogie“) oder ein Sauerstoffatom einer NH-Einheit entspricht [92]. Aufgrund dessen müssten z. B. „Azaindole“ durch erhöhte Polarität bezogen auf Indol über eine verbesserte Löslichkeit und damit verbesserte Bioverfügbarkeit verfügen.

Zur weiteren Optimierung der oben genannten Leitstrukturen **23** und **24** wurde außerdem der vielversprechende Wirkstoffkandidat für FLT3-ITD, **8** (AC220) (siehe Seite 12, 19), herangezogen.

Die häufigste Mutation bei der AML Erkrankung liegt in der Kinasedomäne des FLT3-Rezeptors, weshalb die meisten der potenziellen Therapeutika, die aktuell in der Entwicklung sind, direkte Inhibitoren dieser Kinase sind [32, 49].

Aufgrund seiner günstigen Pharmakokinetik *in vivo*, sowie seiner Fähigkeit, spezifisch und sehr potent FLT3-ITD in nanomolaren Konzentrationen *in vitro* zu hemmen, ist **8** (AC220) der zur Zeit am meisten untersuchte Tyrosinkinaseinhibitor gegen FLT3-ITD-positive AML [93]. **8** (AC220) befindet sich gegenwärtig in der Vorbereitung zur Phase 3 für die klinische Studie (NCT02039726, NCT02272478).



8 (AC220)

Abbildung 11. Chemische Struktur von **8** (AC220).

Aufbauend auf den Ergebnissen von Mahboobi *et al.* [89, 91] und den vielversprechenden Eigenschaften von **8** (AC220) wurde in Vorarbeiten das Bis(1*H*-indol-2-yl)methanon **23** (siehe Seite 17) mit dem *tert*-Butylisoxazolyl-Harnstoff Strukturelement von **8** (AC220) (blau in Abbildung 11) modifiziert (Tabelle 2) [94]. Dieses Strukturelement wurde basierend auf Studien zur Röntgenkristallstruktur von **8** (AC220) im Komplex mit dem FLT3-Rezeptor gewählt (Abbildung 12) [68]. Hierbei wurde gezeigt, dass der Inhibitor **8** (AC220) mit besagtem *tert*-Butylisoxazolrest die ATP-Bindungstasche durchdringt, in das aktive Zentrum der Kinase eintaucht und Wasserstoffbrückenbindungen mit Cys-828 und Glu-661 ausbildet (Abbildung 12) [68].

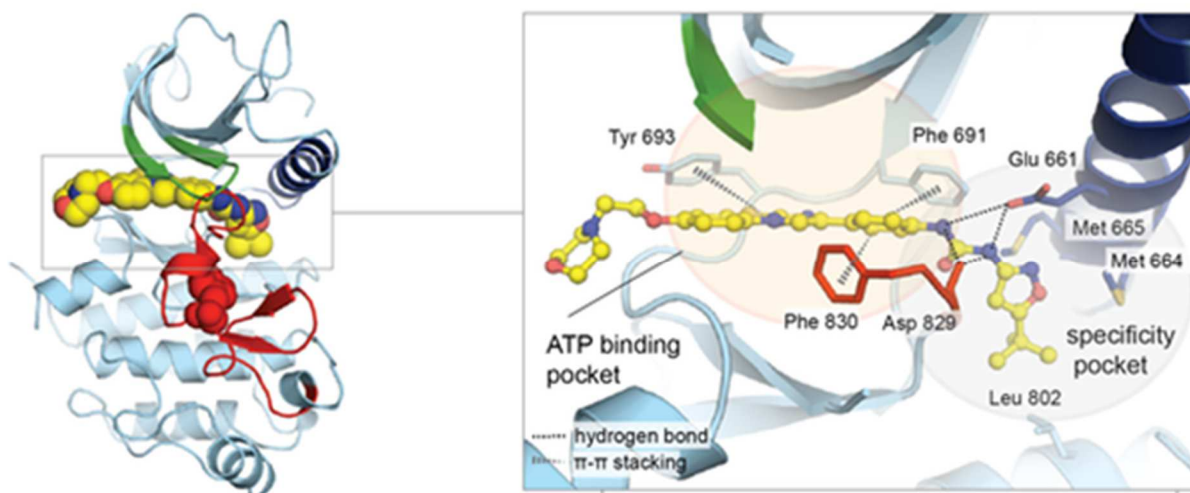
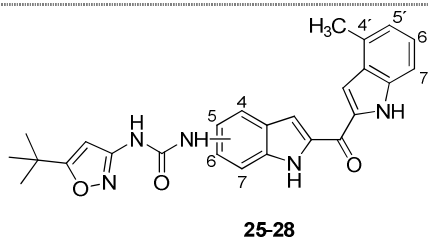


Abbildung 12. Die Struktur der FLT3-Kinasedomäne als „Cartoon“-Darstellung mit dem gebundenen FLT3i **8** (AC220) als „Bulk“-Darstellung (links) und eine vergrößerte Darstellung des aktiven Zentrums der Kinase (rechts). **8** (AC220) und die Aminosäuren als „Stick“-Darstellung, Phe-830 (rot), Glu-661 (blau). Abbildung mit Genehmigung nach Zorn *et al.* [68].

Zur Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehung wurden daher die Positionen 4-7 des Bis(1*H*-indol-2-yl)methanons **23** mit dem *tert*-Butylisoxazolyl-Harnstoffrest von **8** (AC220) modifiziert. Die 4'-Methylindoleinheit aus **23** wurde in diesem Versuch nicht modifiziert, um einzig die Auswirkungen des *tert*-Butylisoxazolyl-Harnstoffes an den verschiedenen Positionen des Indolrings zu analysieren. Die Inhibierung der FLT3-Kinase durch die neu

dargestellten Verbindungen **25-28** wurde daraufhin an einer humanen AML Zelllinie (MV-4-11) untersucht (Tabelle 2) [94].



Verbindung	Position im Ring	Signal d. Inhibition
25	4	82% [1 μ M]
26	5	58% [0.1 μ M]
27	6	> 1 μ M
28	7	52% [1 μ M]

Tabelle 2. Übersicht der modifizierten Bis(1*H*-indol-2-yl)methanone **25-28** [94].

Die biologischen Untersuchungen zeigten, dass die neu synthetisierten Verbindungen **25-28** im Allgemeinen eine gute inhibitorische Wirkung gegenüber FLT3 aufwiesen. Ferner ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Position des Isoxazolylharnstoffrestes im Indolring und der Wirksamkeit der Derivate feststellen. Das Derivat mit Substitution in Position 5 (**26**) zeigte dabei die größte Wirksamkeit mit 58% Hemmsignal bei einer Konzentration von 0.1 μ M. Im Vergleich dazu wiesen die anderen Verbindungen mit dem Isoxazolylharnstoffrest an den restlichen Positionen des Indolrings eine wesentlich schlechtere (um den Faktor 10) inhibitorische Wirkung auf [94]. PDGFR wurde aufgrund der zuvor angenommenen Selektivität nicht weiter untersucht (vgl. Tabelle 1, S.17).

2.2 Zielsetzung

Basierend auf oben genannten Ergebnissen (Tabelle 2) [94] sowie aus früheren Studien (vgl. Tabelle 1, S. 17) [89-91] konnte eine neue Leitstruktur definiert werden. Diese sollte neben dem Bis(1*H*-indol-2-yl)methanon Grundgerüst (**19**) eine Kombination aus **23** bzw. **24** (Hydroxygruppe in Position 5'), und dem Isoxazolylharnstoff aus **8** (AC220) in Position 5 vereinen.

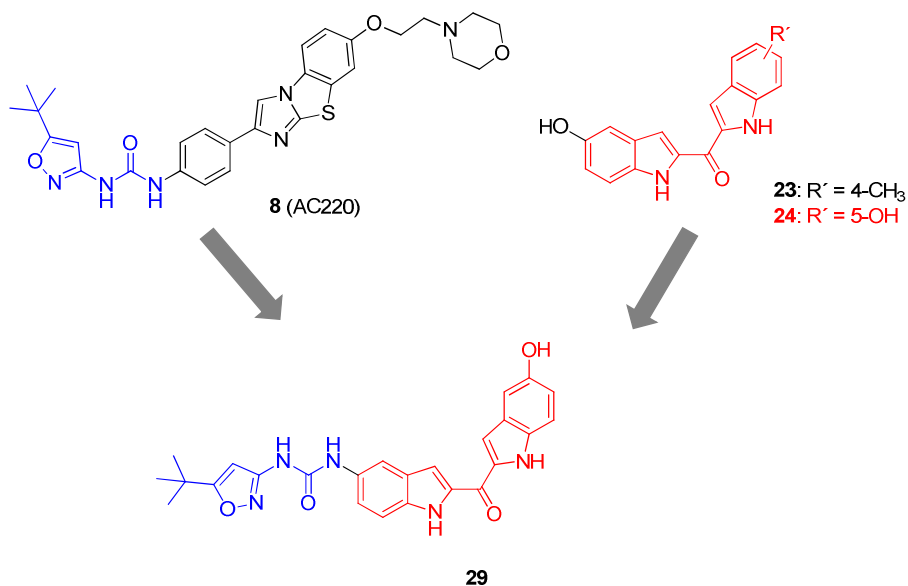
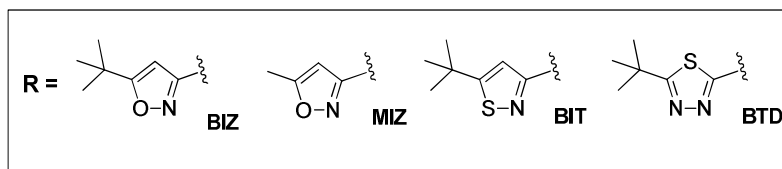
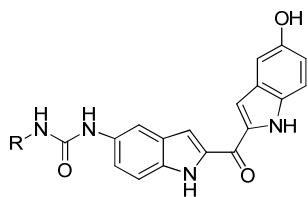


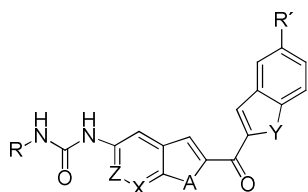
Abbildung 13. Neue Leitstruktur **29**.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, aufgrund dieser Überlegungen eine neue Generation von potenten FLT3-Inhibitoren (Tabelle 3) zu synthetisieren und Struktur-Wirkungs-Beziehungen basierend auf den dadurch erhaltenen Ergebnissen zu entschlüsseln. Hierbei wurden sowohl der Grundkörper der Bisindole (z. B. Azaindole, Benzofurane, Acylindole, 5-Ringheterozyklen) als auch die Isoxazolseitenkette (unterschiedliche 5-Ringheterozyklen) modifiziert.

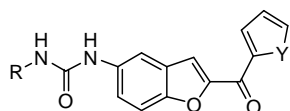
Darüber hinaus sollten diese neu synthetisierten Verbindungen im Zellsystem auf Aktivität und Selektivität gegenüber anderen Rezeptortyrosinkinasen getestet werden. Es sollte festgestellt werden, ob diese potentiellen Wirkstoffe Wechselwirkungen mit der Tyrosinkinase eingehen können oder sogar in der Lage sind, resistente Mutationen zu inhibieren. Zusätzlich sollten auch irreversible Inhibitoren (vgl. Kapitel A.2.5) auf dem Gebiet der FLT3-Inhibitoren synthetisiert und in den entsprechenden Zellsystemen getestet werden.



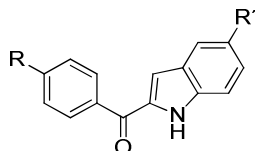
Verb.	R
29	BIZ
30	MIZ
31	BIT
32	BTD



Verb.	X	Z	A	Y	R'	R
33	N	CH	NH	NH	OH	BIZ
34	CH	N	NH	NH	OH	BIZ
35	CH	N	NH	O	OH	BIZ
36	CH	CH	NH	O	OH	BIZ
37	CH	CH	O	NH	OH	BIZ
38	CH	CH	O	S	H	BIZ
39	CH	CH	O	NH	OH	MIZ
40	CH	CH	O	NH	OH	BIT



Verb.	Y	R
41	NH	BIZ
42	O	BIZ
43	S	BIZ



Verb.	R	R´
44	H	NH-CO-NH- BIZ
45	NH-CO-NH- BIZ	OCH ₃
46	NH-CO-NH- BIZ	OH

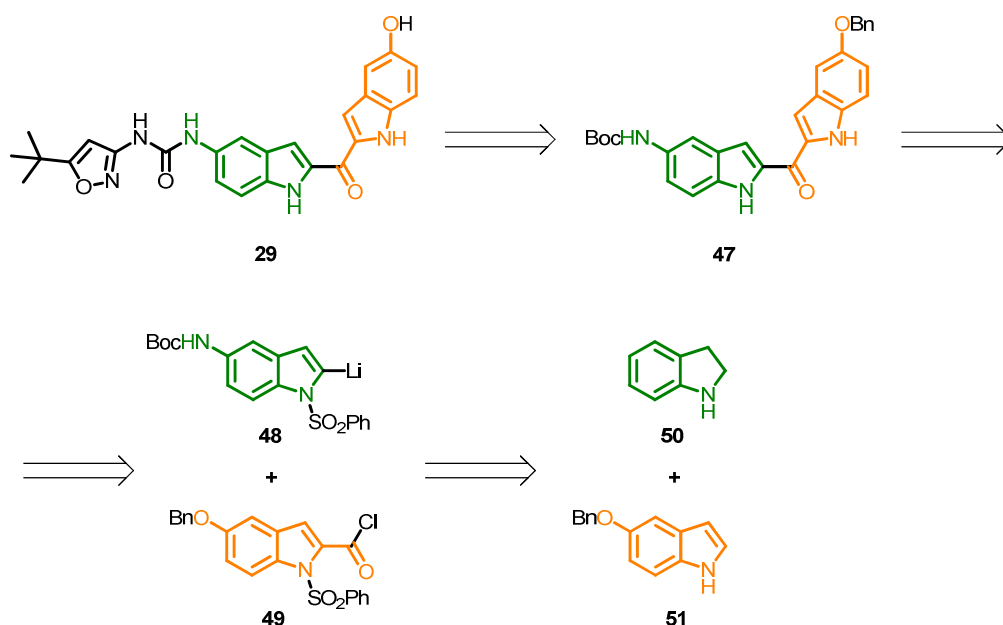
Tabelle 3. Übersicht der synthetisierten FLT3-Inhibitoren.³⁴

³ Zum Zwecke der Übersichtlichkeit wurden die vier heterozyklischen Seitenketten mit 3-Buchstabencodes (**BIZ** = 5-*tert*-**B**utyl-**i**soxazol, **MIZ** = 5-**M**ethyl-**i**soxazol, **BIT** = 5-*tert*-**B**utyl-**i**so**t**hiazol, **BTD** = 2-*tert*-**B**utyl-1,3,4-**t**hiadiazol) abgekürzt. Diese Nomenklatur wird im Folgenden verwendet.

⁴ Die synthetisierten potentiellen irreversiblen Inhibitoren (**153-155**) werden im Kapitel A.2.5 (ab S. 40) beschrieben.

2.3 Synthese der Ausgangssubstanzen

Als repräsentatives Beispiel der Synthese neuer FLT3-Inhibitoren wird die Retrosynthese der Leitstruktur **29** in Schema 1 veranschaulicht.



Schema 1. Retrosynthese von **29** ausgehend von Indolin (**50**) und 5-Benzyloxyindol (**51**).

Mit den zwei orthogonal geschützten und entsprechend aktivierten Indolbausteinen **48** und **49** kann eine C-C Knüpfung zu einem Bis(1*H*-indol-2-yl)methanon **47** durchgeführt werden. Die beiden Bausteine **48** und **49** basieren auf den kommerziell erhältlichen Chemikalien Indolin (**50**) und 5-Benzyloxyindol (**51**). Nach Abspaltung der verschiedenen Schutzgruppen und Modifikation mit *tert*-(Butyl)-3-isocyanatoisoxazol (**140**) [95] resultiert 1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)harnstoff **29** als Produkt. Das Bisindolderivat **29** wurde in insgesamt 17 synthetischen Stufen (12 lineare Stufen als längste Sequenz) dargestellt.

2.3.1. Exemplarische Strukturaufklärung der Leitverbindung 29

Die detaillierte Strukturaufklärung zur eindeutigen Charakterisierung der hier dargestellten Verbindungen wurde überwiegend mit 1- und 2-dimensionalen NMR-spektroskopischen Methoden realisiert. Zur Verdeutlichung der verwendeten Methoden wird im Folgenden die Strukturaufklärung der Leitverbindung **29** exemplarisch beschrieben.

Die Analyse von Integralen, chemischen Verschiebungen, Multiplettaufspaltungen und Kopplungskonstanten der Signale aus dem ^1H -NMR Spektrum liefert bereits zahlreiche hilfreiche Informationen für die Zuordnung der Signale zu den zugehörigen H-Atomen. Auch die Analyse der 1-dimensionalen ^{13}C -NMR Spektren und der verwandten DEPT135 bzw. DEPT90 (*engl. distortionless enhancement by polarization transfer*) Spektren liefert viele wichtige Informationen für die Strukturaufklärung (z. B. chemische Verschiebung und Zuordnung der Wertigkeit von C-Atomen).

Die einzigen vicinalen Protonen mit einer homonuklearen $^3J_{\text{HH}}$ Kopplung befinden sich in den beiden 6-Ringen der beiden Indolsysteme (Positionen 6, 7, 6' und 7'). Diese Protonen konnten bereits anhand ihrer Multiplettaufspaltung (2 x d, $J \sim 9$ Hz & 2 x dd, $J \sim 9$ Hz, 2 Hz) aus dem ^1H -Spektrum identifiziert werden. Aufgrund der geringen Anzahl von vicinalen Protonen in **29**, ist die COSY (*engl. correlation spectroscopy*) Methode hier nur begrenzt einsetzbar. Eine Besonderheit in diesem System ist das Auftreten von COSY Kreuzsignalen zwischen den Indol-NH-Protonen und Protonen am Indolring ($^4J_{\text{HH}}$ und $^5J_{\text{HH}}$). Jedoch ist bekannt, dass Indol-NH-Protonen aufgrund der günstigen Geometrie über Spinbarrieren hinweg mit anderen H-Atomen interagieren können, was auch die Dublettaufspaltung der beiden Indol-NH Signale aus dem ^1H -NMR Spektrum beweist ($J = 1.6$ Hz) [96-98]. Detektierte COSY Kreuzsignale in **29** sind in Abbildung 14 als graue Pfeile dargestellt.

Eine eindeutige Zuordnung von Kohlenstoffen zu ihren entsprechenden Protonen-Signalen kann mittels HSQC (*engl. heteronuclear single quantum correlation*) leicht bestimmt werden. Hierbei werden nur die direkt gebundenen Protonen an ihre C-Atome über die $^1J_{\text{CH}}$ Kopplung identifiziert. Die neun aromatischen CH Signale von **29** konnten somit eindeutig den an ihnen gebundenen C-Atomen zugeordnet werden (Abbildung 14).

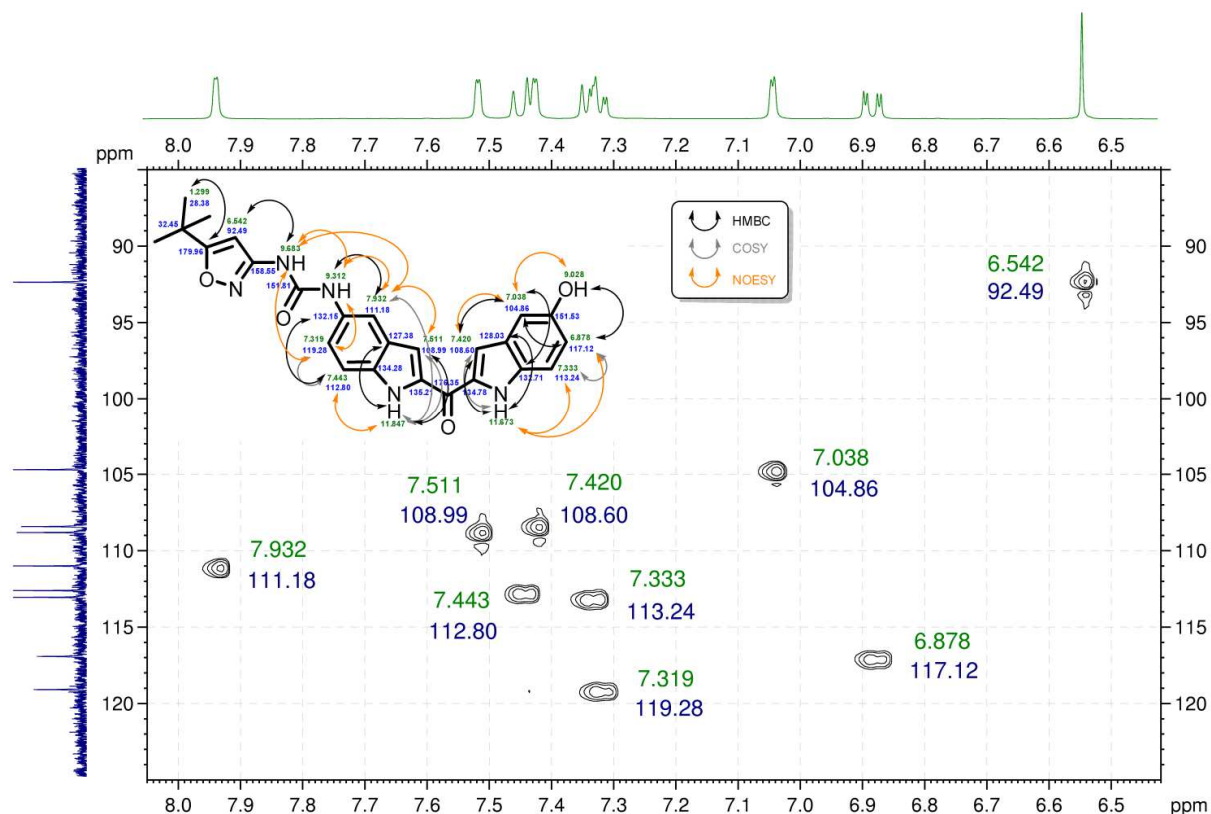


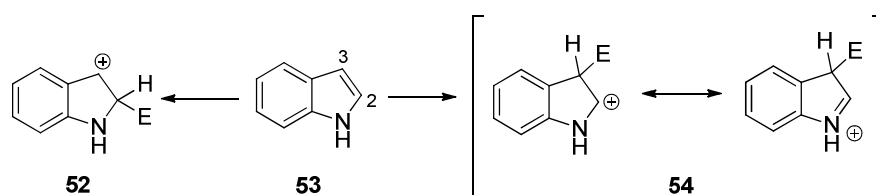
Abbildung 14. Ausschnitt aus dem Aromatenbereich des HSQC Spektrums von **29**. Das zugehörige ^1H -Spektrum (grün) und das entsprechende ^{13}C -Spektrum (blau) wurden zur besseren Anschaulichkeit hinzugefügt. Die Kreuzsignale wurden mit den jeweiligen Koordinaten markiert (^1H grün; ^{13}C blau). Die Strukturformel von **29** im linken oberen Teil der Abbildung zeigt die wichtigsten Wechselwirkungen aus anderen 2D NMR Methoden, welche zur vollständigen Strukturaufklärung von **29** verwendet wurden (HMBC schwarz; COSY grau; NOESY orange).

Die vermutlich wichtigste Methode für die vollständige Charakterisierung von **29** ist die HMBC (*engl.* heteronuclear multiple bond correlation) Methode, mit welcher Weitbereichskopplungen zwischen H- und C-Atomen über zwei bis fünf Bindungen beobachtet werden können. Dies ist vor allem für die eindeutige Identifizierung von quarternären Kohlenstoffatomen essentiell, da diese mit anderen Standardtechniken nicht erfasst werden können [96]. Die dominantesten Signale im HMBC Spektrum von **29** sind $^3J_{\text{HC}}$ Interaktionen. Die wichtigsten sind in Abbildung 14 als schwarze Pfeile dargestellt.

Darüber hinaus ist auch die NOESY (*engl.* nuclear Qverhauser effect spectroscopy) Technik durchaus hilfreich für die Strukturaufklärung von organischen Molekülen. Hierbei werden homonukleare Kopplungen durch den Raum (nicht durch Bindungen wie zuvor) detektiert, so können Aussagen über die räumliche Nähe von Wasserstoffatomen getroffen werden. Entsprechende Interaktionen im Bisindol **29** sind in Abbildung 14 als orangefarbene Pfeile gezeigt.

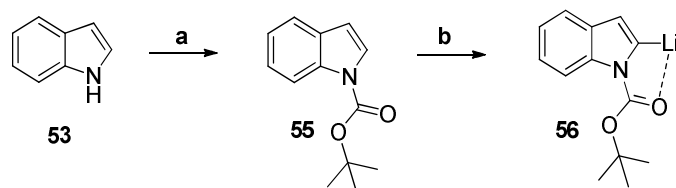
2.3.2. Schützung des Indol-Stickstoffes

Indole sind Aromaten und zugleich heterozyklische Verbindungen. Elektronenreiche Aromaten zeigen generell eine erhöhte Reaktivität für elektrophile Substitutionen auf, wobei die bevorzugte Position der elektrophilen aromatischen Substitution C-3 ist. Das Carbokation, das durch Angriff am C-3 gebildet wird, ist aufgrund der Delokalisation der positiven Ladung stabilisiert, ohne dass der benzoide Teil des Moleküls einbezogen wird. Im Gegensatz dazu ist das Kation, das durch einen Angriff an der benzyllischen C-2 Position gebildet wird, weniger stabilisiert (Schema 2) [94, 99].



Schema 2. Elektrophiler Angriff am Indolsystem an C-2 bzw. C-3.

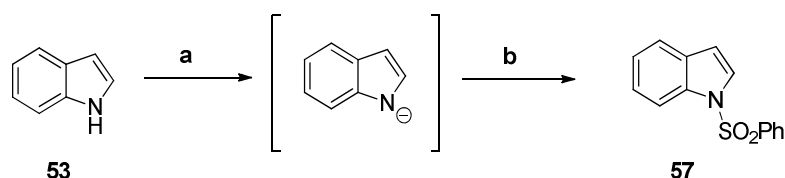
Zur Synthese der Zielverbindungen ist jedoch eine Substitution an Position C-2 erforderlich. Diese kann mit Hilfe einer dirigierenden Schutzgruppe am Indol-Stickstoff verwirklicht werden. Sogenannte DoM-Schutzgruppen (*engl. Directed ortho-Metalation*) ermöglichen es, einen Substituenten gezielt an Position C-2 des Indols einzuführen [100]. Zu diesen DoM-Gruppen gehören unter anderem die Phenylsulfonyl- oder Boc-Schutzgruppe. Diese können durch Koordination mit dem Carbonylsauerstoff die Lithiierung in der gewünschten 2-Position stabilisieren (Schema 3) [99].



Schema 3. Einführung der Boc-Schutzgruppe und Stabilisierung der lithiierten Spezies. (a) 1.2 equiv. Boc_2O , THF, kat. DMAP, (b) 1.1 equiv. $n\text{-BuLi}$ bzw. 2.2 equiv. $t\text{-BuLi}$, THF.

Zusätzlicher Vorteil der Schützung des Indolstickstoffes ist es, dass durch Butyllithium eben dieser nicht deprotoniert werden kann. In diesem Kontext fiel die Wahl jedoch auf die Phenylsulfonyl-Schutzgruppe, da aufgrund der geplanten Syntheseroute orthogonale Schutzgruppen verwendet werden mussten.

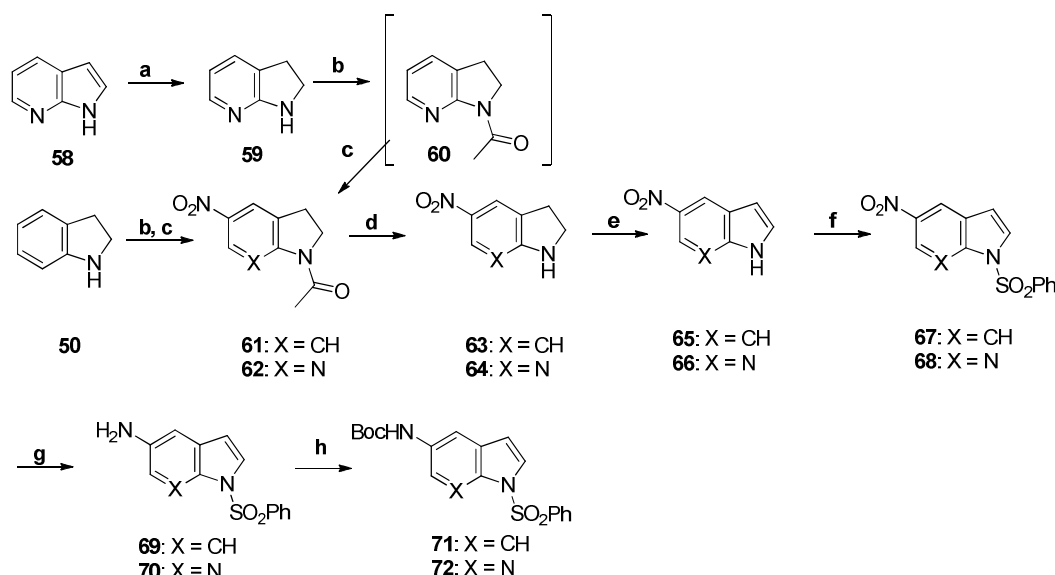
Die Schützung der Indole erfolgte mittels Natriumhydrid und Phenylsulfonsäurechlorid analog Mahboobi *et al.* [91] in generell guten Ausbeuten (Schema 4).



Schema 4. Phenylsulfonierung des Indol-Stickstoffes. (a) 0 °C, 1.1 equiv. NaH (60% in Mineralöl), THF, (b) PhSO₂Cl, THF.

2.3.3. Synthese von *tert*-Butyl (1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-5-yl)carbamat (71) und *tert*-Butyl (1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)carbamat (72)

Um ein Bisindolylmethanon mit einer 5-Aminoindolylstruktur zu synthetisieren, wurde eine Route ausgehend vom entsprechenden Indolin **50** bzw. **59** gewählt. Mit dem in Schema 5 gezeigten Syntheseweg konnten die geschützten (Aza)Indole **71** und **72** für die anschließende Kopplung der beiden Indolbausteine dargestellt werden.



Schema 5. Synthese von **71** und **72**. (a) Ra-Ni, H₂ (70 bar), EtOH, 95 °C, (b) Ac₂O, HOAc, (c) HNO₃ (rauchend), 0 °C, (d) HCl (37%) (aq.), Rückfluss, (e) 7.5 equiv. MnO₂, THF, Rückfluss, (f) 0 °C, 1.1 equiv. NaH (60% in Mineralöl), 1.1 equiv. PhSO₂Cl, THF, (g) MeOH, 3 M HCl (aq.), Zn-Staub, CuSO₄, (h) 0 °C, 1.2 equiv. Boc₂O, THF.

Zentraler Schritt dieser Syntheseroute war die Einführung eines Nitrosubstituenten in 5-Position als maskierte Aminogruppe. Da bei elektrophilen aromatischen Reaktionen am Indol bevorzugt Substitution in Position 3 stattfindet, wurde der 5-Ring bei **58** mittels Raney Nickel unter H₂-Atmosphäre reduziert [101]. Das entstandene 7-Azaindolin (**59**) und Indolin (**50**) wurden zuerst mittels Acetylierung (Modifikation in Anlehnung an Terent'lev *et al.* [102]) am Indolin Stickstoff geschützt, um so die Nitrierung in die gewünschte Position 5 zu lenken. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppe im Säuern [102] konnte man mit Braunstein (MnO₂) das aromatische Indolsystem wiederherstellen (**65**, **66**) [101]. Das entsprechende

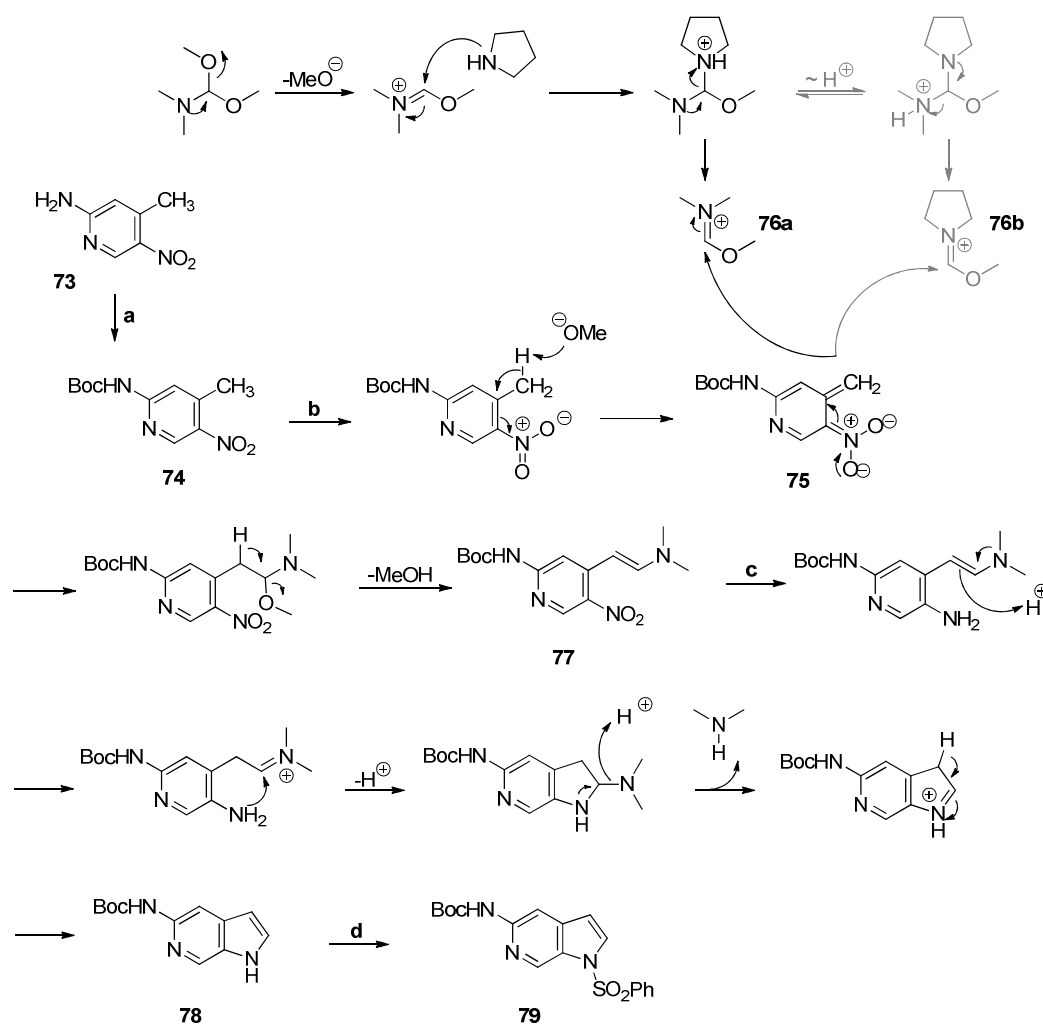
Nitroindol wurde unter Verwendung von Phenylsulfonylchlorid [89, 91] geschützt und die Nitrogruppe mittels Zink-Staub im Säuren zur Aminogruppe reduziert (Modifikation in Anlehnung an Russell *et al.* [103]), welche abschließend mit Hilfe von di-*tert*-Butyldicarbonat (Boc_2O) geschützt wurde (**71**, **72**) [91].

2.3.4. Synthese von *tert*-Butyl-(1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-5-yl)carbamat (**79**) nach Leimgruber-Batcho

Das geschützte 6-Azaindol (**79**) konnte aus 2-Amino-4-methyl-5-nitropyridin (**73**) synthetisiert werden, welches als Ausgangsverbindung zur Synthese nach Leimgruber-Batcho [104] diente. Der dort [104] postulierte Reaktionsmechanismus für die Darstellung von 6-Azaindolderivat **79** ist im Folgenden beschrieben (Schema 6).

Durch Abspaltung von Methanol und Anlagerung von Pyrrolidin an *N,N*-Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMFDMA) entsteht eine protonierte Verbindung, welche im Gleichgewicht mit seinem Tautomer steht. Durch Eliminierung können daraus zwei verschiedene Iminiumionen **76a** und **76b** gebildet werden. In der Regel werden Mechanismen der Leimgruber-Batcho Reaktion über eine Pyrrolidin-substituierte Zwischenverbindung ausgehend von Iminiumion **76b** (grau in Schema 6) postuliert [104]. Jedoch konnte experimentell bestimmt werden ($^1\text{H-NMR}$ der isolierten, aber nicht gereinigten Zwischenverbindung **77**), dass sich die Dimethylamin-substituierte Verbindung **77** bildet und es somit nahe liegt, dass die Reaktion über das Iminiumion **76a** abläuft.

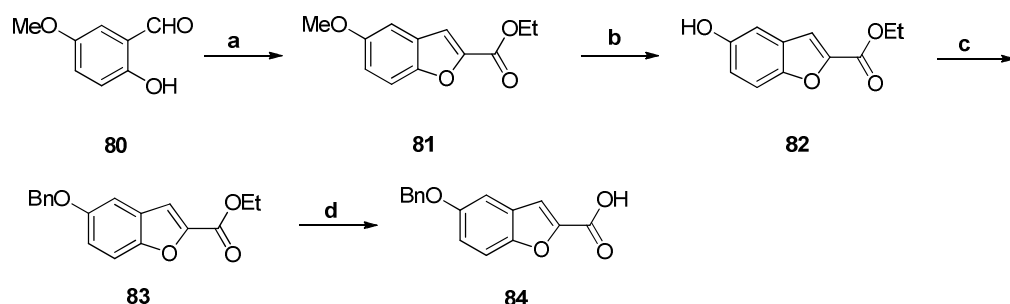
Das deprotonierte Nitropyridinderivat **75** reagiert mit dem Iminiumion **76** zu dem gewünschten Enamin-Intermediat **77**, welches durch reduktive Zyklisierung Palladium-katalysiert unter Wasserstoffatmosphäre in das gewünschte „Azaindol“ **78** überführt werden konnte. Nach Einführung der Phenylsulfonyl-Schutzgruppe erhielt man das Azaindolderivat **79** (Schema 6).



Schema 6. Synthese von *tert*-Butyl(1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-5-yl)carbamat (**79**) nach Leimgruber Batcho. (a) 1.5 equiv. NaH (60% in Mineralöl), 0 °C, 1.1 equiv. Boc₂O, THF:DMF 2:1, (b) DMFDMA, Pyrrolidin, DMF, Methanol, (c) 10% Pd/C, H₂ (30 bar), 70 °C, THF, MeOH (2:1), (d) 1.1 equiv. NaH (60% in Mineralöl), 0 °C, 1.1 equiv. PhSO₂Cl, THF.

2.3.5 Synthese von 5-Benzyloxybenzo[*b*]furan-2-carbonsäure (**84**)

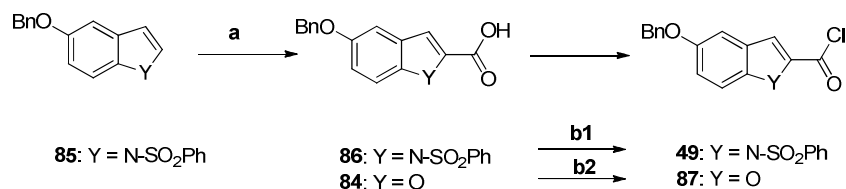
5-Benzyloxybenzo[*b*]furan-2-carbonsäure (**84**) konnte aus 5-Hydroxy-2-methoxybenzaldehyd (**80**) nach Mahboobi *et al.* [90] synthetisiert werden: Der Ringschluss mittels Bromessigsäureethylester mit Kaliumcarbonat führte zum 5-Methoxybenzo[*b*]furan-2-carbonsäureethylester (**81**). Die Methoxygruppe konnte mit Bortribromid demethyliert werden. Benzylierung des Phenol-Intermediats **82** führte zu **83** und nach alkalischer Spaltung des Ethylesters erhielt man die gewünschte Carbonsäure **84** (Schema 7) [90].



Schema 7. Synthese von 5-Benzyloxybenzo[b]furan-2-carbonsäure (**84**). (a) 1.0 equiv. Bromessigsäureethylester, 1.0 equiv. K₂CO₃, DMF, 80 °C, (b) 0 °C, 2.5 equiv. BBr₃, DCM, (c) 1.2 equiv. Benzylbromid, 4.0 equiv. K₂CO₃, Aceton, Rückfluss, (d) 1.2 equiv. LiOH, THF:MeOH:H₂O (2.5:1:1).

2.3.6. Darstellung der Säurechloride

Um eine C-C Knüpfung zu den gewünschten Bisindolen durchführen zu können, musste eine Indolkomponente in ihr entsprechendes Carbonsäurechlorid überführt werden. Dazu wurde das Indol mit *n*-Butyllithium in C2-Position metalliert. Durch Zugabe von festem Kohlenstoffdioxid (Trockeneis) und anschließender saurer Aufarbeitung erhielt man **86**. **84** und **86** konnten mittels Thionylchlorid in ihr jeweiliges Carbonsäurechlorid (**49**, **87**) überführt werden (Schema 8) [91, 94].

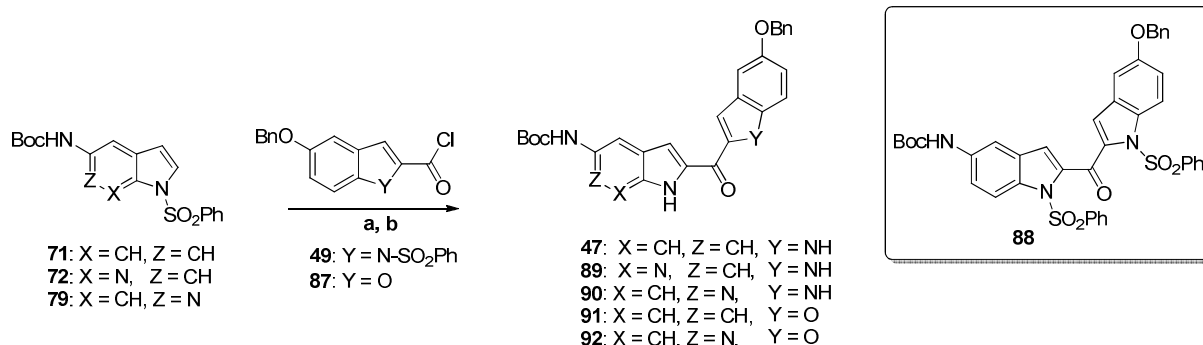


Schema 8. Synthese der Säurechloride **49**, **87**. (a) 1.1 equiv. *n*-BuLi, THF, CO₂ (s), (b1) SOCl₂, Rückfluss, (b2) 1.1 equiv. Pyridin, 1.05 equiv. SOCl₂, DCM, 30 min.

2.4 Kopplung und Entschützung der Bisindole

Die geplanten Bisindole wurden durch die Kopplung eines 2-Indolyl-carbonsäurechlorids mit seinem entsprechenden Indol erhalten. Dazu wurde das entsprechende Indol bei -78 °C mit *tert*-Butyllithium lithiiert. Nach Metallierung an C2 konnte durch anschließende Zugabe des Carbonsäurechlorides an der gewünschten Position eine C-C Bindung geknüpft werden [89, 90, 94]. Die so entstandenen Bisindole wurden ohne weitere Reinigung zur Abspaltung der Phenylsulfonyl-Gruppe eingesetzt. Diese erfolgte mittels wässriger 10%-iger Natriumhydroxidlösung in THF und Methanol [90]. **88** wurde exemplarisch zur Bestimmung

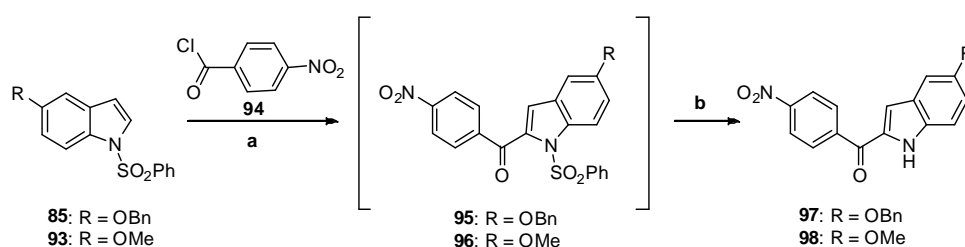
der Konstitution des Intermediats vor der Schutzgruppenabspaltung gereinigt und vollständig charakterisiert (Schema 9).



Schema 9. Allgemeines Schema der Kopplungsreaktion mit anschließender Phenylsulfonyl-Abspaltung. (a) 2.2 equiv. *t*-BuLi, -78 °C, THF, (b) NaOH (aq., 10%), MeOH, THF (1:1:1), Rückfluss.

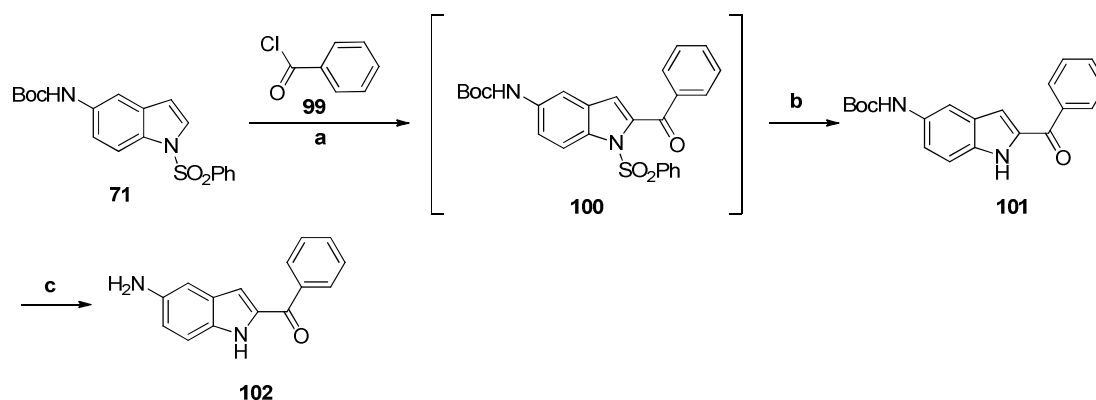
Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehung zu gewinnen, wurden neben den Bisindolen und deren Derivaten (**47**, **89-92**) auch Acylindole **44-46** dargestellt (Schema 19) und auf ihre Eigenschaften hin untersucht (vgl. Kapitel C.1.1).

Die benötigten Acylindole **97-98**, **102** (als Vorstufen für **44-46**) konnten in Anlehnung an Mahboobi *et al.* [105] durch Kopplung eines Phenylsulfonylgeschützten Indols mit 4-Nitrobenzoylchlorid (**94**) unter Verwendung von *n*-Butyllithium als Metallierungsreagenz erhalten werden (Schema 10 und 11). **93** wurde aus 5-Methoxy-1*H*-indol analog Schema 4 dargestellt. 4-Nitrobenzoylchlorid wurde ausgehend von 4-Nitrobenzoesäure, wie analog in Schema 8 (b1) gezeigt, synthetisiert. Nach Abspaltung der Schutzgruppe am Indol-Stickstoff mittels tetra-*n*-Butylammoniumfluorid (TBAF) erhielt man **97-98** als Produkte [91].



Schema 10. Schema für die Synthese von Acylindolen **97** und **98**. (a) 1.0 equiv. *n*-BuLi, -78 °C, THF, (b) 1.5 equiv. TBAF, THF, Rückfluss.

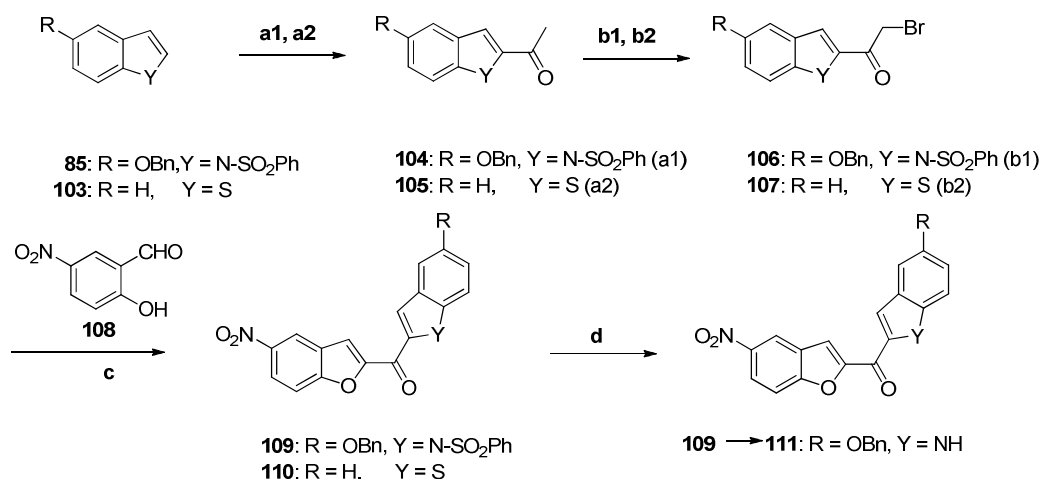
Zur Synthese der am Indolgerüst derivatisierten Verbindung wurde die folgende Sequenz gewählt: Benzoesäurechlorid (**99**) (in Analogie zu Schema 8 aus Benzoesäure dargestellt) bildete mit **71** mittels *n*-Butyllithium eine C-C Knüpfung. Nach Entfernen der Phenylsulfonyl-Gruppe und abschließender Spaltung der Boc-Gruppe in reiner Trifluoressigsäure erhielt man **102** als Phenyl-substituiertes Derivat.



Schema 11. Synthesesequenz für die Synthese von **102**. (a) 2.2 equiv. *n*-BuLi, -78 °C, THF, (b) 1.5 equiv. TBAF, THF, Rückfluss, (c) Trifluoressigsäure.

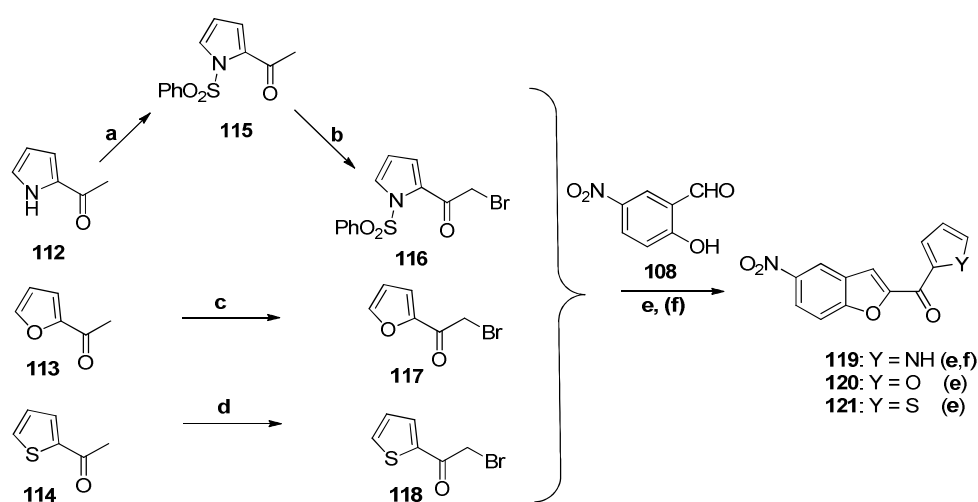
2.4.1. Alternatives Kopplungsverfahren

5-Benzyloxyindol (**51**) wurde als Edukt für ein alternatives Kopplungsverfahren in Anlehnung an Mahboobi *et al.* eingesetzt [105] (Schema 12), um Arylmethanon Derivate, wie z. B. **37** (BS228) zu erhalten. Nach Einführung der Phenylsulfonylgruppe als Schutzgruppe am 5-Benzyloxyindol (**51**) erhielt man **85**, das nach Acetylierung (**104**) in Anlehnung an Jiang *et al.* [106] und Bromierung (**106**) nach Wagle *et al.* [107] als Edukt für die anschließende Kopplung diente. Benzo[*b*]thiophen (**103**) konnte in Anlehnung an Debray *et al.* [108] ebenfalls bromiert werden (**107**). Die Umsetzung von **106** bzw. **107** mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzaldehyd (**108**) führte hierbei unter basischen Bedingungen zunächst zur Alkylierung an der phenolischen OH-Gruppe und nach anschließender Aldolkondensation unter Wasserabspaltung und Aromatisierung zu den gewünschten Produkten **109** bzw. **110**. Das zuvor geschützte Indol **109** musste final noch entschützt werden um **111** als Edukt für **37** (BS228) zu erhalten (Schema 15 und 19).



Schema 12. Schema für eine alternative Kopplungsreaktion. (a1) 1.1 equiv. *n*-BuLi, -78 °C, THF, 11.0 equiv. Ac₂O, (a2) 1.5 equiv. *n*-BuLi, -78 °C, Et₂O, 1 h Rückfluss, 1.05 equiv. DMA, 2 h Rückfluss. (b1) 2.0 equiv. CuBr₂, EtOAc, kat. HBr, **104** in CHCl₃, (b2) 1.2 equiv. Triphenylmethyltribromid, EtOAc, 50°C, (c) 1.0 equiv. K₂CO₃, 2-Butanon, 1.0 equiv. **108**, 80 °C, (d) NaOH (aq., 10%), MeOH, THF (1:1:1), Rückfluss.

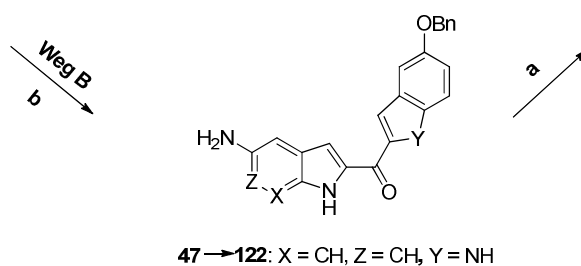
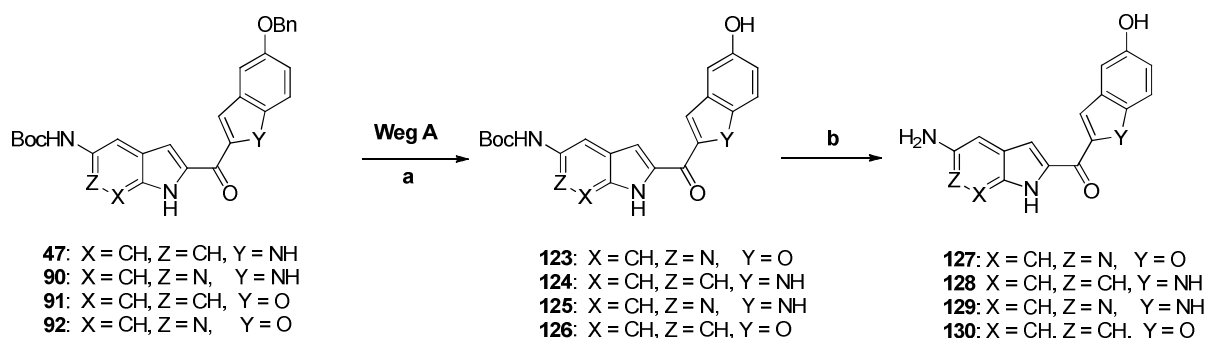
Weitere nach dieser Methode zugängliche Kopplungsprodukte waren **119-121**. Diese konnte man analog zu Schema 12 synthetisieren. Die Ausgangsstoffe hierfür waren bereits acetylierte Heterozyklen wie **112-114**, die mittels verschiedener Methoden bromiert werden konnten [107, 109, 110]. Die erhaltenen Produkte **116-118** konnten in der darauffolgenden Kopplung mit **108** umgesetzt werden.



Schema 13. (a) 0 °C, 1.1 equiv. NaH (60% in Mineralöl), 1.1 equiv. PhSO₂Cl, THF, (b) 2.0 equiv. CuBr₂, EtOAc, kat. HBr, **115** in CHCl₃, (c) 1.1 equiv. Br₂, CHCl₃, (d) 2.0 equiv. CuBr₂, EtOAc, Rückfluss, (e) 1.0 equiv. K₂CO₃, 2-Butanon, 1.0 equiv. **108**, 80 °C, (f) NaOH (aq., 10%), MeOH, THF (1:1:1), Rückfluss.

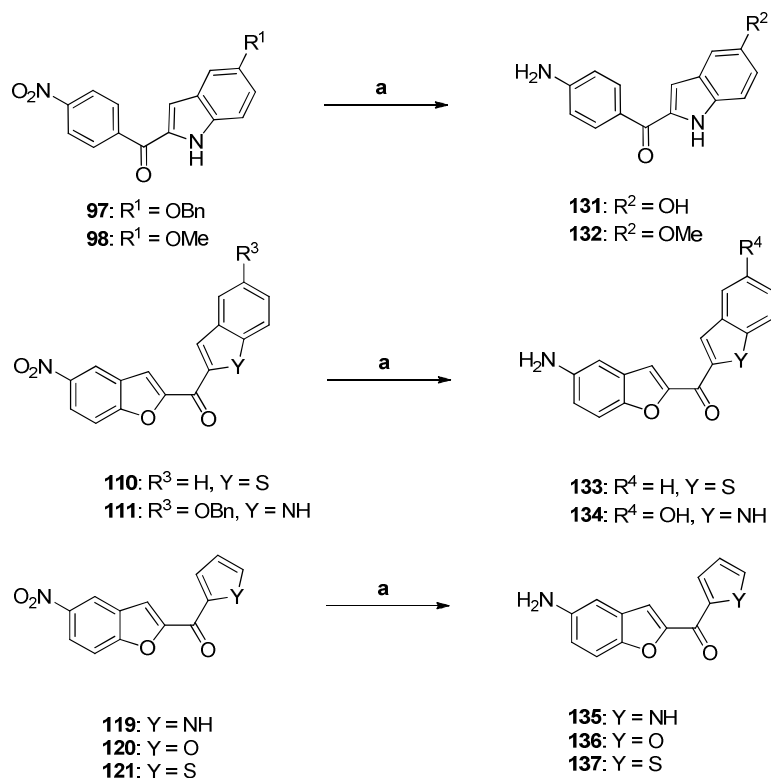
2.4.2. Entschützungsreaktionen

Die Schutzgruppen für die Amino- und Hydroxyfunktion können nach Erhalt der gewünschten Kopplungsprodukte (Schema 9) wieder abgespalten werden. Die Boc-Schutzgruppe der Aminofunktion wird im Säuren mittels Trifluoressigsäure gespalten, während die Benzyl-Schutzgruppe der Hydroxyfunktion hydrogenolytisch mit Ammoniumformiat als Wasserstoffquelle und Pd/C als Katalysator abgespalten wird (Schema 14) [90, 91]. Um zu testen ob die Reihenfolge der Reaktion essentiell für den Erfolg der Reaktion ist, wurde bei **47** die Synthesesequenz variiert. Da die Ausbeuten von **128** über die Zwischenstufe **122** im Vergleich über die Zwischenstufe **124** wesentlich schlechter waren wurden für die weiteren Verbindungen **Weg A** in der Syntheseroute gewählt.



Schema 14. Entschützungsreaktionen zur Synthese von **127-130**. (a) Pd/C (10%), 4.0 equiv. NH₄HCOO, MeOH, THF (1:1), 80 °C, (b) Trifluoressigsäure.

Die Kopplungsprodukte **97** und **111**, die wie in den Schemata 10 und 12 gezeigt dargestellt wurden, waren neben der Nitrogruppe auch mit der Benzyl-oxylgruppe in Position 5' substituiert. In diesem Fall konnte man gleichzeitig hydrogenolytisch sowohl die Schutzgruppe (Benzylether) abspalten als auch die Nitrogruppe zur Aminogruppe reduzieren (Schema 15). Die Nitrogruppe der Verbindungen **98**, **110** und **119-121** (Schema 10, 12 und 13) konnten unter denselben Bedingungen reduziert werden.

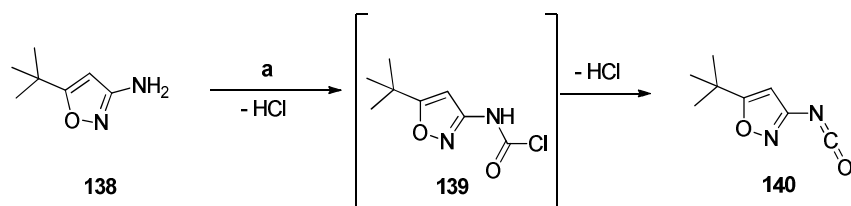


Schema 15. Darstellung von **131-137** aus **97-98**, **110-111** und **119-121**. (a) Pd/C (10%), 4.0 equiv. NH₄HCOO, MeOH, THF (1:1), 80 °C.

2.4.3. Modifikation der Aminogruppe

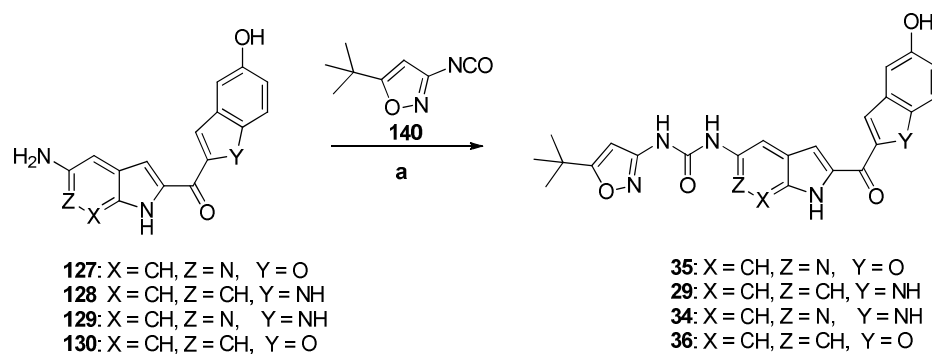
2.4.3.1. Einführung einer Isoxazol-Gruppe

Zur Synthese von 5-*tert*-Butyl-3-isocyanatoisoxazol **140** (**BIZ-NCO**) wurde 5-*tert*-Butylisoxazol-3-amin **138** bei 0 °C in DCM mit Phosgen und Pyridin umgesetzt [111].



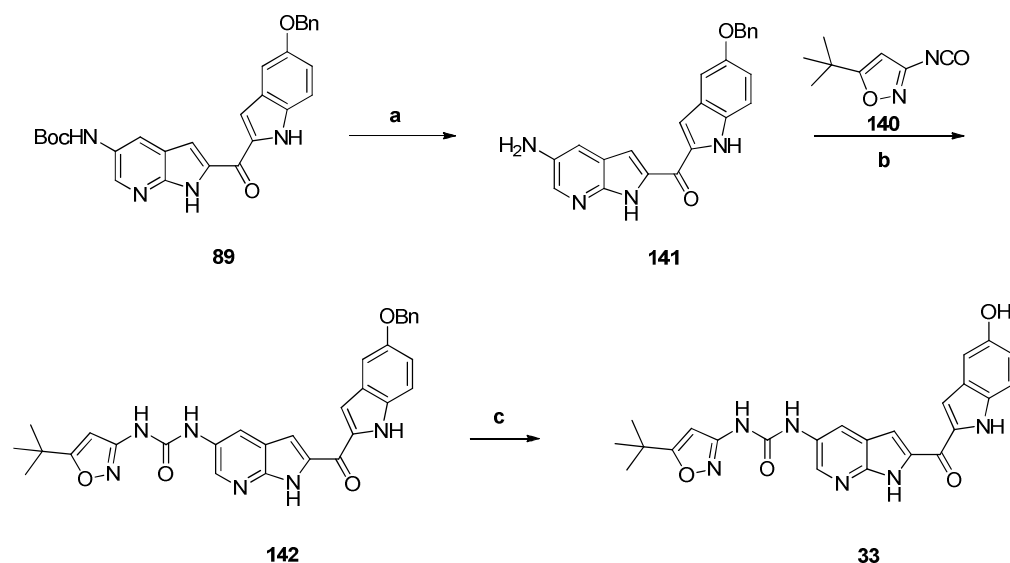
Schema 16. Synthese von 5-*tert*-Butyl-3-isocyanatoisoxazol **140** (**BIZ-NCO**). (a) 0 °C, 0.1 equiv. Phosgen (20% in Toluol), kat. Pyridin, DCM.

Isocyanat **140** wurde als eine 0.1 M Lösung in THF isoliert und direkt im nächsten Schritt eingesetzt, um die Additionsreaktion in Anlehnung an Chao *et al.* [52] mit der freien Aminogruppe der verschiedenen Bisindol-Derivate zum gewünschten Harnstoff einzugehen (Schema 17, analog [94]).



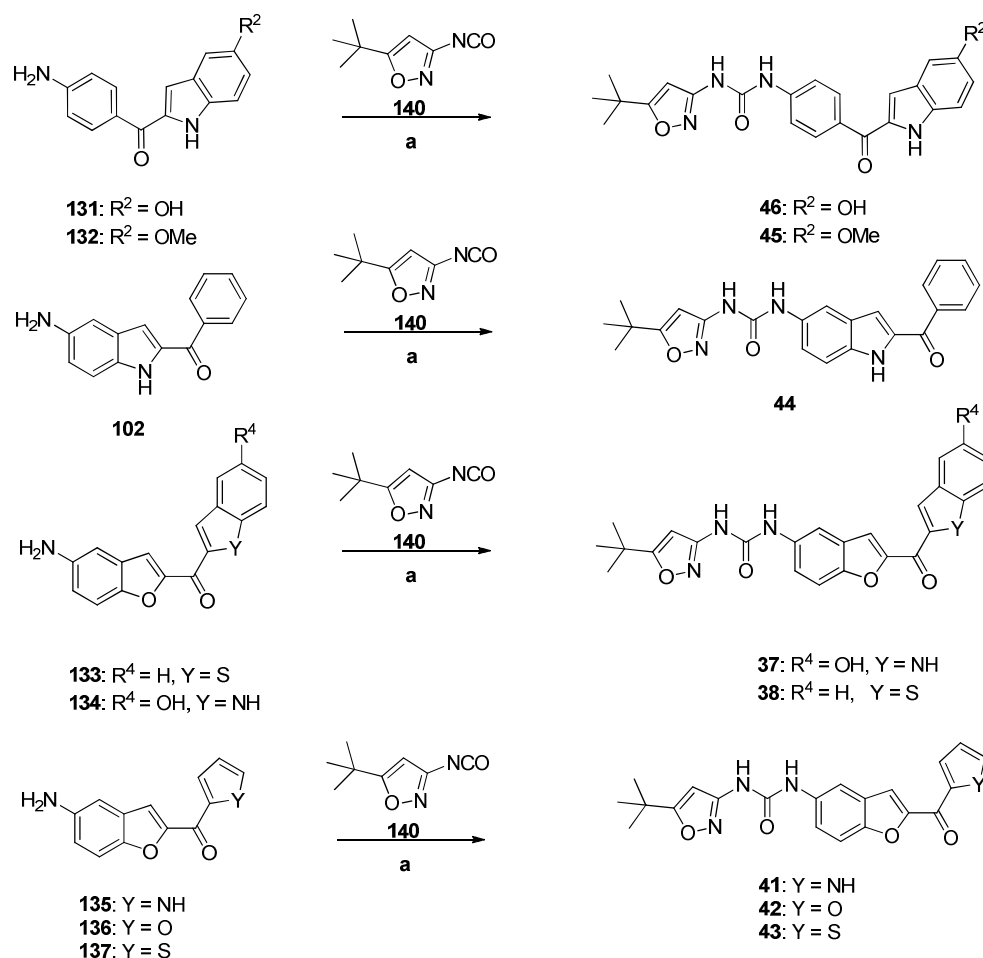
Schema 17. Funktionalisierung der Kopplungsprodukte **127-130**. (a) 0.1 M Lösung 5-(*tert*-Butyl)-3-isocyanatoisoxazol (**140**) in THF, THF, kat. Pyridin.

Als Alternative zum etablierten Syntheseweg wurde zur Einführung von **140 (BIZ-NCO)** eine andere Reaktionsreihenfolge untersucht (Schema 18). Hierbei wurde bereits nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe **141** mit **140 (BIZ-NCO)** modifiziert um **142** zu erhalten. Durch die Abspaltung der Benzylgruppe konnte **33** erhalten werden. Die hydrogenolytische Spaltung von **142** stellte sich jedoch als schwierig heraus, da vermutlich auch die Carbonylgruppe unter diesen Bedingungen zum Alkohol reduziert werden konnte. Deshalb wurde an der Synthesesequenz von Schema 17 festgehalten.



Schema 18. Funktionalisierung des Kopplungsproduktes **89**. (a) Trifluoressigsäure, (b) 0.1 M Lösung 5-(*tert*-Butyl)-3-isocyanatoisoxazol (**140**) in THF, THF, kat. Pyridin, (c) Pd/C (10%), 4.0 equiv. NH_4HCOO , MeOH, THF (1:1), 80 °C.

Neben den in Schema 17 und 18 erhaltenen Verbindungen wurden auch die Verbindungen aus Schema 15 mit **140 (BIZ-NCO)** modifiziert, um zu den gewünschten *tert*-Butylisoxazolharnstoff-Derivaten zu gelangen (Schema 19).

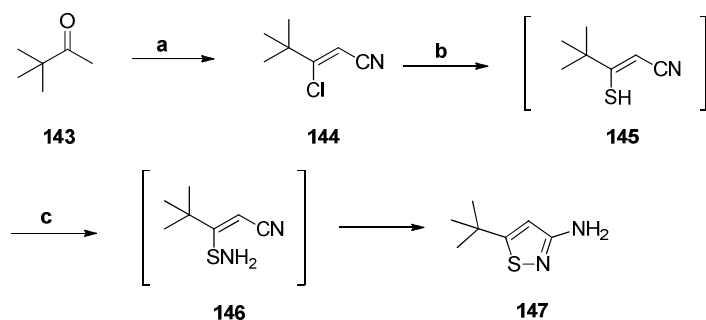


Schema 19. Kopplungsprodukte **37-38**, **41-46**. (a) 0.1 M Lösung 5-(*tert*-Butyl)-3-isocyanatoisoxazol (**140**) in THF, THF, kat. Pyridin.

Um weitere Aussagen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung treffen zu können, wurden neben den Modifikationen am Grundgerüst des Bis(1*H*-indol-2-yl)methanons auch Variationen am *tert*-Butyl-Isoxazolharnstoff-Pharmakophor vorgenommen. So wurden zum Beispiel die *tert*-Butylgruppe gegen eine Methylgruppe ausgetauscht, oder die Heteroatome im Isoxazol Ring wurden variiert (Schema 22).

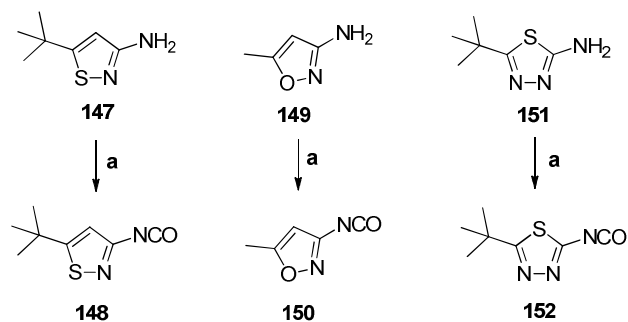
2.4.3.2. Synthese von 3-Amino-5-*tert*-butyl-thiazol (**147**)

Schema 20 veranschaulicht die Synthese von 3-Amino-5-*tert*-butyl-isothiazol (**147**). **147** wurde in Anlehnung an Hackler *et al.* [112] synthetisiert. Dabei wurde *Z*-3-Chlor-4,4-dimethyl-2-pentennitril (**144**) in einer Ein-Topf-Reaktion aus Pinakolon **143** gewonnen. Nach Behandlung von **144** mit Natriumhydrogensulfid wurde **145** *in situ* durch Zugabe von Chloramin (erhalten aus Ammoniak (aq.) und Natriumhypochlorit-Lösung) zu 3-Amino-5-*tert*-butyl-isothiazol **147** cyclisiert.

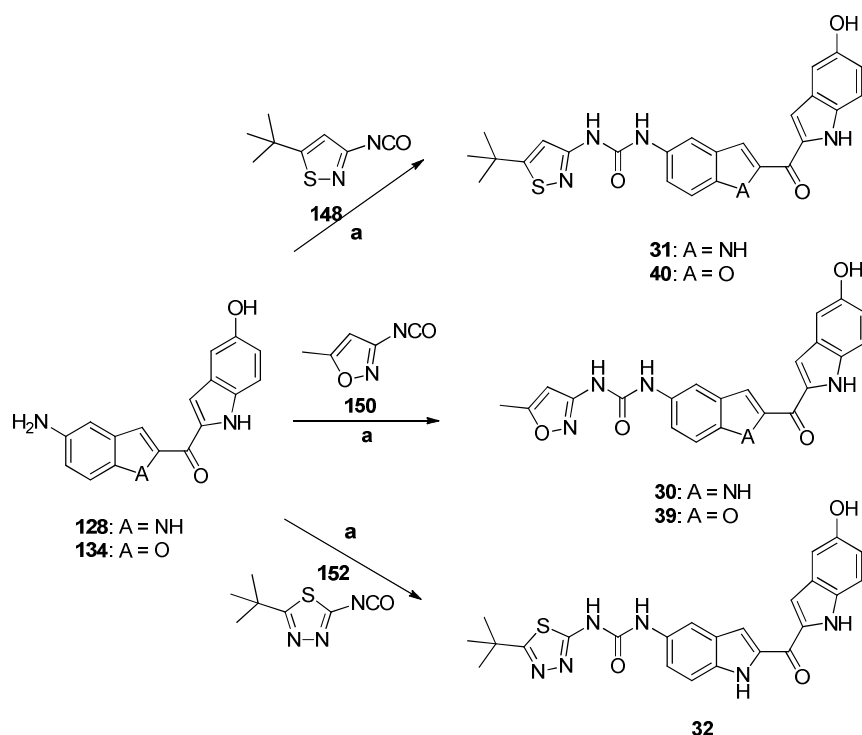


Schema 20. Synthese von 3-Amino-5-*tert*-butyl-isothiazol (**147**). (a) POCl₃, DCE, (H₃NOH)₂SO₄, DMF, 85 °C, (b) NaHS, 1 M HCl (aq.), EtOH, (c) NH₃(aq.), 0.1 M NaClO.

3-Amino-5-*tert*-butyl-isothiazol (**147**), Methylisoxazol-3-amin (**149**) und 5-*tert*-Butyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin (**151**) bildeten bei 0 °C in THF mit Diphosgen die entsprechenden Isocyanate **148** (BIT-NCO), **150** (MIZ-NCO) und **152** (BTD-NCO) (Schema 21). Diese konnten anschließend mit dem Bisindolylmethanon **128** und dessen Derivat **134** zu den gewünschten Harnstoff-Derivaten **30-32** und **39-40** umgesetzt werden (Schema 22) [113].



Schema 21. Synthese von **148**, **150** und **152**. (a) 1.1 equiv. Diphosgen, THF, 0 °C.



Schema 22. Funktionalisierung des Grundgerüsts (**128** und **134**) mit unterschiedlichen heterozyklischen Isocyanaten **148**, **150** und **152**. (a) THF, 50 °C.

2.5 Potentielle irreversible Inhibitoren

Wie zuvor diskutiert, wurde das Konzept der irreversiblen Inhibitoren auf dem Gebiet der TKis aufgrund deren mangelnder Effektivität bei Parke-Davis und Wyeth Ende der 1990er Jahre eingeführt [83, 84].

Um irreversible Inhibitoren zu erhalten, werden bereits aktive reversible Protein-Kinase-Inhibitoren durch die Einführung elektrophiler Gruppen (Michael System) modifiziert. Diese Art von Inhibitoren üben dadurch einen doppelten Bindungsmechanismus aus, indem sie zuerst reversibel in die ATP-Bindungstasche „eintauchen“ und erst dann mit dem Michael-System eine kovalente Bindung mit z. B. einem benachbarten Cystein (Abbildung 15, 16) ausbilden [84].

Trotz der Schwierigkeiten, die oftmals mit einer kovalenten Wirkstoffbindung assoziiert werden, werden solche Kinase-Inhibitoren als vielversprechende Wirkstoffkandidaten angesehen. Diese sollen durch eine dauerhafte Blockierung des katalytischen Zentrums der Kinase das physiologische Gleichgewicht kontinuierlich zwischen ATP und der „Target-Kinase“ verschieben. Dadurch kommt es zu einer Inhibierung der ATP-Bindung und der katalytischen Aktivität, und die damit einhergehenden nachgeschalteten Signale der Kinase werden „downreguliert“ [85].

Diese Art von irreversiblen Inhibitoren ist bereits bei verschiedenen Protein-Kinasen wie z. B. EGFR im Einsatz [114]. Für FLT3 ist sie jedoch bis jetzt noch nicht beschrieben. Daher wurde mit Hilfe der Kristallstruktur von **8** (AC220) in der FLT3-Kinase analysiert [68], ob sich potentiell freie Cysteine, die für eine kovalente Bindung ausschlaggebend wären, in räumlicher Nähe des Inhibitors befinden. Während Cys-828 bereits mit dem Carbonylsauerstoffatom der Harnstofffunktion von **8** (AC220) Wasserstoffbrücken-Interaktionen ausbildet (vgl. Abbildung 12, S.19), befinden sich Cys-694 und Cys-695 in räumlicher Nähe des peripheren Teils des Inhibitors und könnten somit für eine potentielle kovalente Bindung des Inhibitors zur Verfügung stehen (Abbildung 15 und 16) [68].

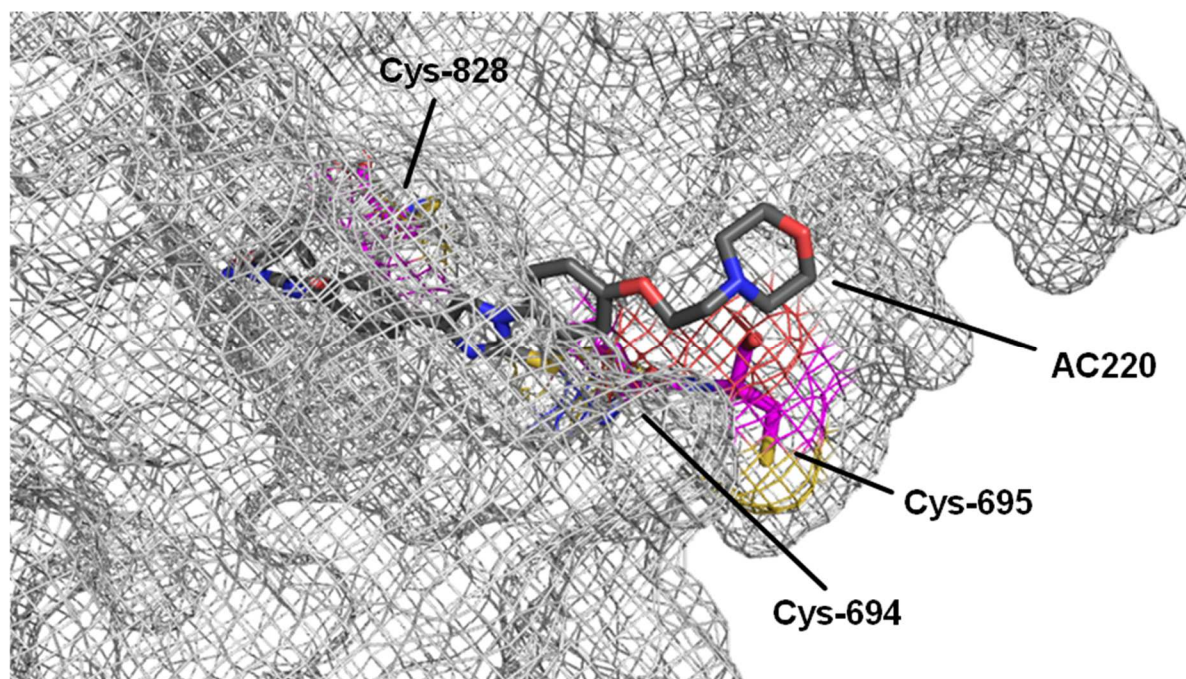


Abbildung 15. FLT3-Kinasedomäne als Gitterdarstellung (silber) mit dem gebundenen FLT3i **8** (AC220) als „Stick“-Darstellung (dunkelgrau), Cysteinreste Cys-694, Cys-695 und Cys-828 als „Stick“-Darstellung (magenta) (PDB:4XUF).

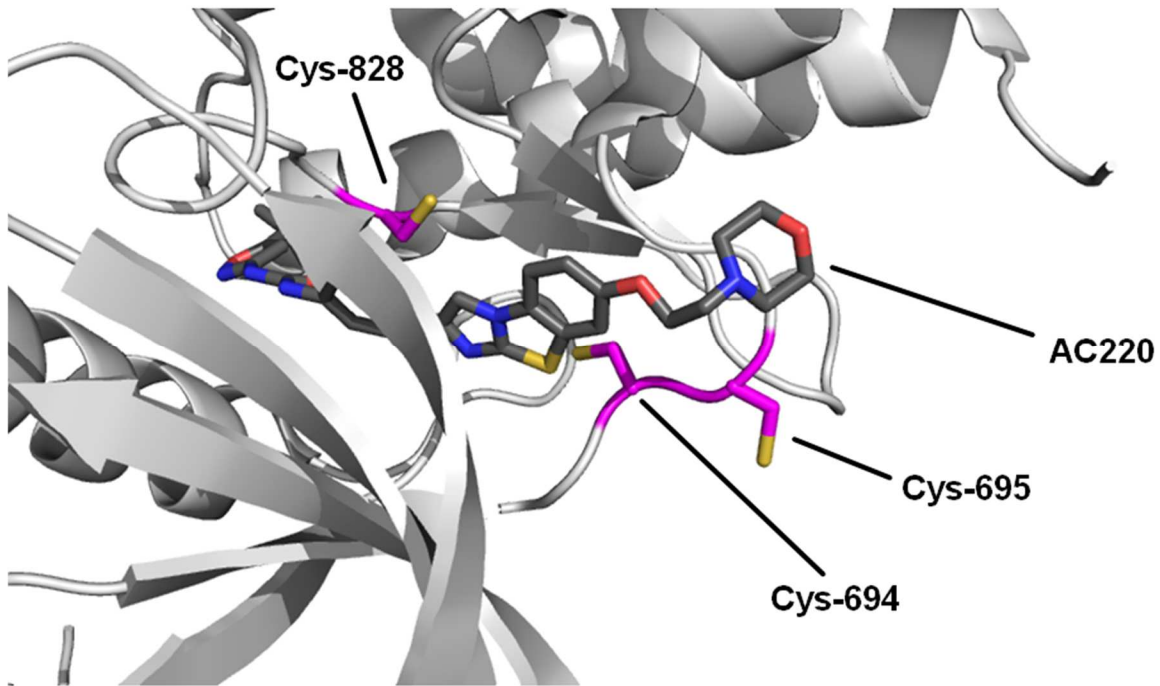
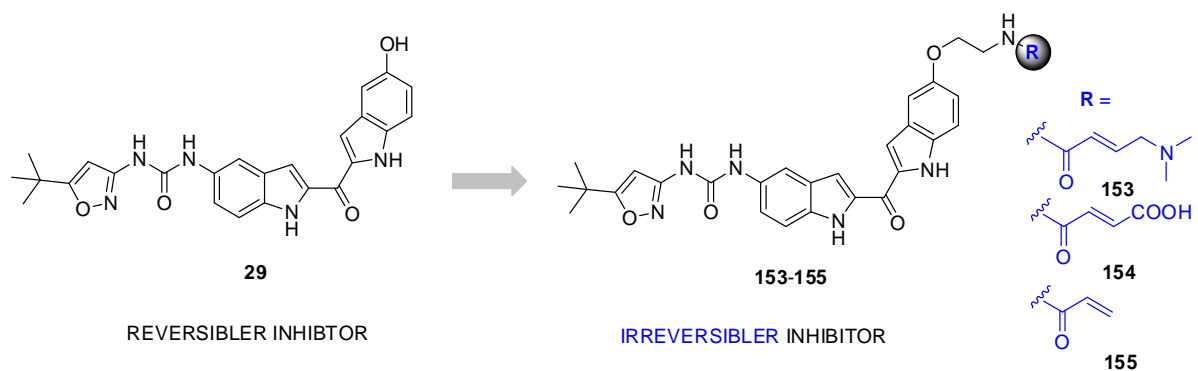


Abbildung 16. FLT3-Kinasedomäne als „Cartoon“-Darstellung (silber) mit dem gebundenen FLT3i **8** (AC220) als „Stick“-Darstellung (dunkelgrau), Cysteinreste Cys-694, Cys-695 und Cys-828 als „Stick“-Darstellung (magenta) (PDB:4XUF).

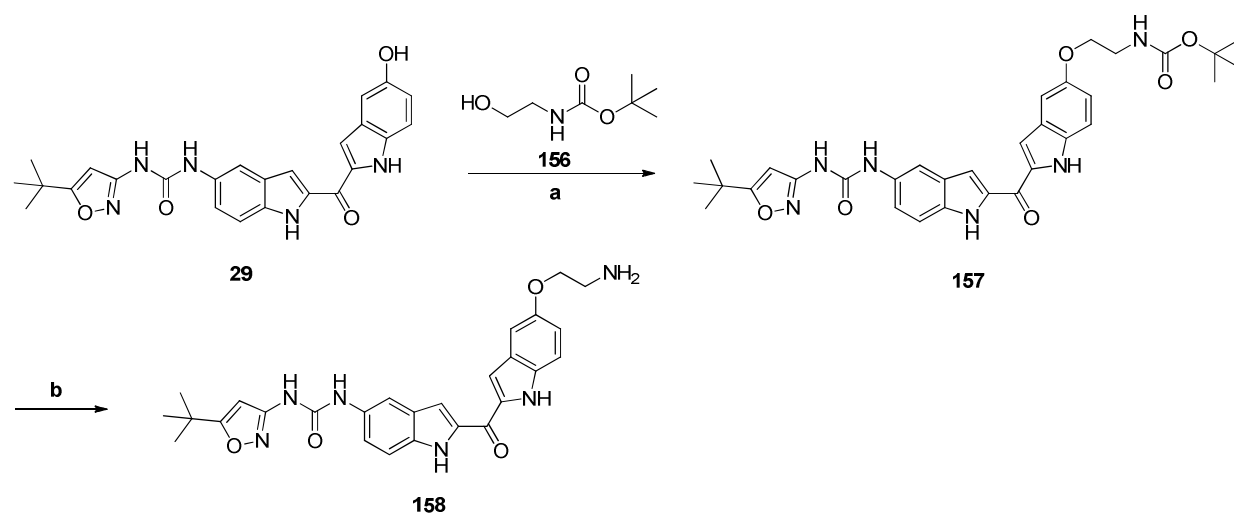
Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit versucht, potentielle irreversible FLT3-Inhibitoren zu synthetisieren. Hierzu wurde der sehr potente reversible FLT3-Inhibitor **29** (S. 21, 66) mit verschiedenen Michael-Systemen modifiziert (blau in Schema 23).



Schema 23. Retrosynthetische Darstellung der potentiellen irreversiblen Inhibitoren **153-155**.

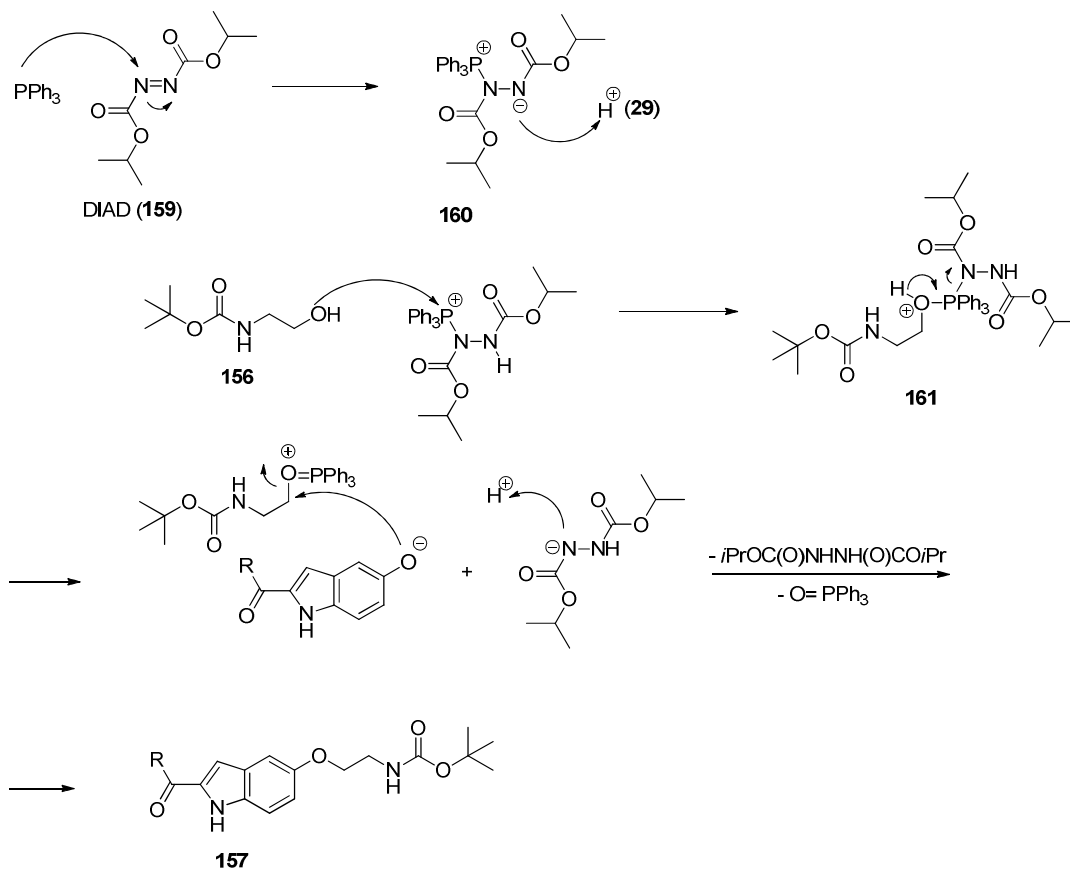
Im Folgenden wird die Synthese solcher potentieller irreversibler Inhibitoren erläutert.

Da eine direkte Funktionalisierung der phenolischen Hydroxylgruppe in 5-Position von **29** strategisch ungünstig zu sein schien (strukturelle Abschätzung der Moleküldimensionen aus der Röntgenstruktur), wurde ein Platzhalter (Spacer) mit einer Kettenlänge von 2 C-Atomen (*N*-Boc geschütztes Ethanolamin) mit Hilfe der Mitsunobu Reaktion eingeführt (Schema 25) [115]. Die Mitsunobu Reaktion ermöglicht die Transformation eines Alkohols in einen Ether. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erhielt man die freie Aminogruppe, welche nun für weitere Reaktionen zugänglich war (Schema 24).



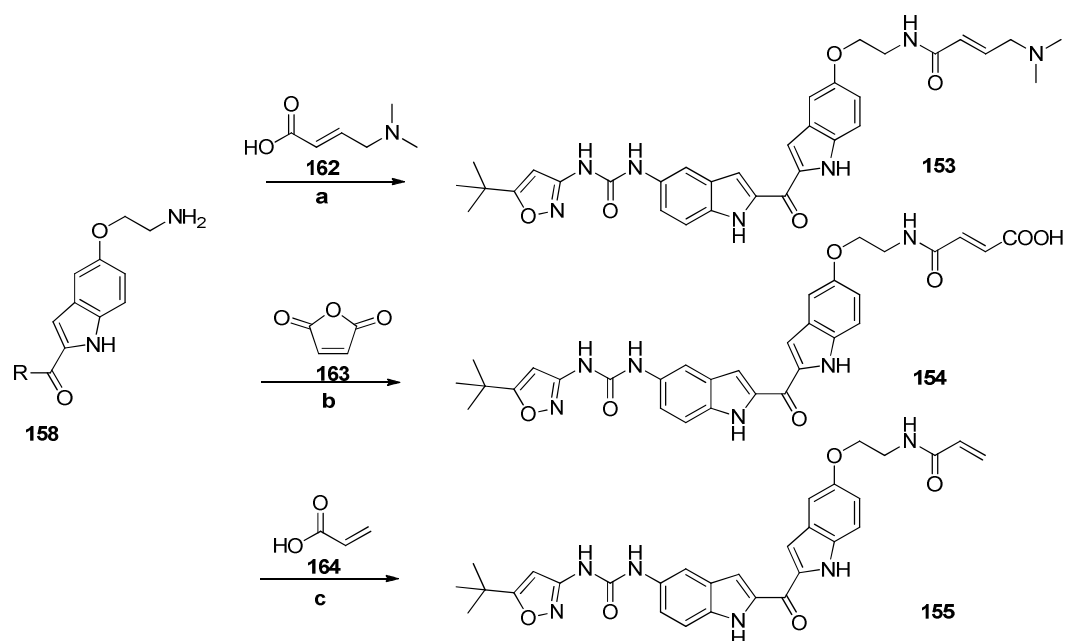
Schema 24. Synthese von **158**. (a) 1.2 equiv. *tert*-Butyl-(2-hydroxyethyl)carbamate (**156**), 1.5 equiv. PPh₃, 1.5 equiv. DIAD, THF, 50 °C, (b) 4 M HCl in Dioxan, Dioxan, 40 °C.

Im einleitenden Schritt bildet Triphenylphosphin mit DIAD (Diisopropylazodicarboxylat) (**159**) ein Betain **160** als Zwischenstufe, welches anschließend **29** deprotoniert. Die freie OH-Gruppe von *tert*-Butyl-(2-hydroxyethyl)carbamate (**156**) greift nun diese Zwischenstufe an und es entsteht **161**. **29** kann nun wiederum als Nukleophil eine S_N2 Reaktion eingehen, wobei DIAD zu einem Hydrazinderivat reduziert wird und Triphenylphosphinoxid als gute Abgangsgruppe das System verlässt (Schema 25).



Schema 25. Darstellung von **157** mittels einer Mitsunobu Reaktion.

An **158** wurden anschließend mit Hilfe von Benzotriazolyl-oxytris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) (*E*-4-(Dimethylamino)but-2-ensäure **162** (in Anlehnung an Kobus *et al.* [116]), Maleinsäureanhydrid **163** (in Anlehnung an Smaill *et al.* [85]) oder Acrylsäure **164** eingeführt. Dadurch konnten Michael-Systeme in den Zielmolekülen **153-155** etabliert werden (Schema 26).



Schema 26. Derivatisierung von **158**. (a) 1.1 equiv. **162** (*(E)*-4-(Dimethylamino)but-2-ensäure), 3.5 equiv. NEt_3 , 1.2 equiv. BOP, DMF, (b) 1.1. equiv. **163** (Maleinsäureanhydrid), DMF, 70°C , (c) 1.1 equiv. **164** (Acrylsäure), 3.5 equiv. NEt_3 , 1.2 equiv. BOP, DMF.

B. Neue Indolderivate als chimäre Verbindungen

1. Einleitung

1.1 Chromatinstruktur

Die strukturelle Organisationsform der DNA in eukaryotischen Zellen in eine höhere Strukturordnung, das Chromatin, ist ein wichtiger Regulationspunkt in der Kontrolle der Genexpression. Das Chromatin befindet sich im Zellkern und setzt sich aus den Einzelkomponenten DNA, Histonen und nicht-Histonproteinen zusammen. Es besteht aus einer sich wiederholenden Basiseinheit, die als Nukleosom bezeichnet wird. Dieser hochkonservierte Nukleoproteinkomplex besteht aus einem so genannten Nukleosomenkern (Core), geformt aus 146 Basenpaaren der DNA [117], der in 1.65 Windungen [118] einer linksgängigen Helix um ein Histonoktamer gewunden ist. Ein solches Oktamer wird aus einem $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer und zwei H2A-H2B Dimeren gebildet. Diese Heterodimerisierung von H3 und H4 mit anschließender Dimerisierung zum $(\text{H3-H4})_2$ -Tetramer sowie die Bildung des H2A-H2B-Dimers sind für die Stabilität des Nukleosomenkerns verantwortlich und ermöglichen somit die kompakte Packung der DNA (Abbildung 17) [117, 119, 120].

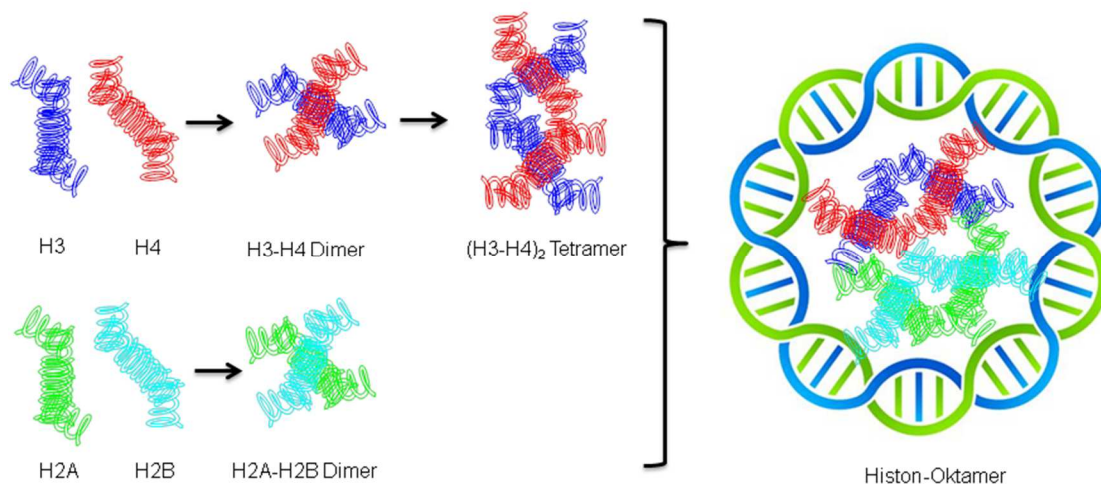


Abbildung 17. Schematische Darstellung des stufenweisen Aufbaus eines Nukleosoms durch Histonproteine. Die DNA ist um ein $(\text{H3-H4})_2$ Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimere gewickelt, um einen Nukleosom-Core-Partikel zu bilden in Anlehnung an Das *et al.* [121].

Dieser Nukleosom-Core-Partikel wird zusammen mit einem so genannten Linker-Histon H1 mit weiteren solcher Nukleosom-Core-Partikeln verknüpft. Hierdurch entsteht eine höhere Strukturordnung, und das führt zur Stabilisierung des Chromatins. Auf diese Weise kann die lineare DNA etwa um den Faktor 30-40 verdichtet werden [118]. Die H1-Linker-Histone sind

aber im Gegensatz zu den Histonproteinen des Nukleosomen-Cores keine essentiellen Bestandteile des Chromatins [122]. Unter physiologischen Bedingungen ist die Assoziation von H1 mit dem Chromatin weniger stabil als die des Nukleosomen-Cores [119].

Die N-terminalen Enden der vier Core-Histone können posttranslational durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung oder Sumoylierung modifiziert werden [123-125]. Die daraus resultierenden Veränderungen der Chromatinstruktur sind an der Kontrolle transkriptioneller Prozesse beteiligt [124, 125].

1.2 Posttranslationale Veränderung der Chromatinstruktur

Aus dem Nukleosom ragt an der Oberfläche der lysinreiche N-Terminus der Proteinkette heraus. Diese lysinreiche Sequenz kann durch bestimmte Enzyme posttranslational modifiziert werden. Zu diesen Enzymen gehören z. B. die Histon-Acetyltransferasen (HATs), die für die Acetylierung spezifischer Lysinseitenketten zuständig sind. Die Histon-Methyltransferasen (HMTs) methylieren Lysin- und Argininreste, während die Histon-Kinasen für die Phosphorylierung von spezifischen Serinresten verantwortlich sind. Darüber hinaus führen die für die Ubiquitylierung und Sumoylierung verantwortlichen Enzyme zur Anheftung des Proteins Ubiquitin bzw. einer SUMO-Protein Einheit (small ubiquitin-related modifier) [126]. Als Gegenspieler hierzu dienen Histon-Deacetylasen (HDACs), Methylasen, Phosphatasen und Ubiquitin-Proteasen, welche das Gleichgewicht solcher Modifikationen steuern [117]. Diese Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskaskaden durch hochselektive chemische Histonmodifikationen dienen somit der Informationssteuerung im Organismus (Entwicklung der DNA und somit das Ablesen dieser durch DNA-bindende Enzyme/Transkriptionsfaktoren).

1.3 Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen

Die bei weitem am häufigsten vorkommenden und am besten charakterisierten posttranslationalen Veränderungen an Histonproteinen sind Acetylierungen bzw. Deacetylierungen [126]. Dabei werden N-terminal positionierte Lysinreste der Histone acetyliert bzw. deacetyliert. Die Einstellung des dynamischen Gleichgewichts zwischen diesen beiden Reaktionen wird von zwei kompetitiven Enzymfamilien, den Histon-Acetyltransferasen (HATs) und den Histon-Deacetylasen (HDACs), reguliert. Histon-Deacetylasen katalysieren dabei die reversible Deacetylierung von Lysinresten an Histonen, während die Histon-Acetyltransferasen dafür verantwortlich sind, dass an Histonproteinen die positiv geladenen Aminogruppen (Lysinreste) reversibel durch ladungsneutrale

Acetylaminoreste ersetzt werden [63, 94, 126, 127]. Durch den Verlust der positiven Ladung der Lysinseitenketten kommt es zu einer geschwächten Interaktion mit der negativ geladenen DNA, wodurch die Chromatinstruktur gelockert wird (Abbildung 18b) [128]. Die Deacetylierung von Histonproteinen ist daher vor allem für die Stabilisierung der Chromatinstruktur und das damit verbundene Ruhen transkriptioneller Aktivität d.h. die Gen Stilllegung (gene-silencing) verantwortlich [94, 128].

Die Modifikationsmuster an den Histonproteinen (Histon-Code) bestimmen also den Packungsgrad der DNA, wodurch die Zugänglichkeit verschiedener Genabschnitte gegenüber der Transkriptionsmaschinerie reguliert werden kann [94, 126].

Fehlregulationen von transkriptionellen Prozessen können zu Defekten im Proteom (dem Expressionsmuster der Zelle) und unter Umständen zu malignen Erkrankungen führen. Eine gezielte Beeinflussung durch so genannte „small molecule drugs“ an solchen Enzymen z. B. durch (nicht)-kovalente Modulation, die für diese Modifikationen des Chromatins verantwortlich sind, kann zu Veränderungen der Genexpression führen. Solche „small molecule drugs“ können in der Tumorthherapie zu Veränderungen, wie z. B. Zellzyklusarrest, Differenzierung oder Apoptoseinduktion führen [129, 130].

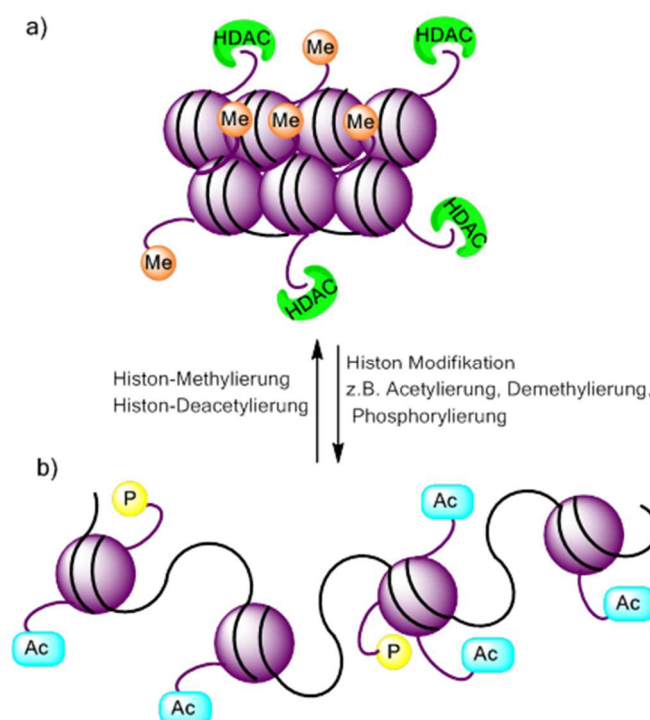


Abbildung 18. Nucleosomen aus DNA bestehend (schwarze Linie), um das Histonoktamer gebunden (violett). Posttranslationale Modifikationen von Histon-Tails via Methylierung (Me), Phosphorylierung (P) oder Acetylierung (Ac) beeinflussen die höhere Ordnung der Nucleosomenstruktur, welche ATP-abhängig reguliert werden kann. Darstellung gegensätzlicher Aktionen von HDAC und HAT. **a)** Histon-Methylierung und Histon-Deacetylierung induzieren eine enge Chromatin-Konformation und translationale Repression. **b)** Histon-Acetylierung und Demethylierung führen zur Lockerung des Chromatins und somit zur translationalen Aktivierung in Anlehnung an Bolden *et al.* [129].

1.4 Histon-Deacetylasen

Die erste Deacetylase Aktivität wurde 1969 identifiziert, bald nach der Entdeckung der Histon-Acetylierung 1964 [131]. Jedoch gelang die Isolierung und Identifizierung von humanen HDACs [132] [133] erst in den 1990er Jahren. Bis heute wurden 18 solcher Histon-Deacetylasen kloniert und teilweise näher charakterisiert. Die Einteilung der humanen HDACs erfolgt aufgrund ihrer Sequenzhomologie in 4 Hauptklassen [126, 133, 134].

- Klasse I-HDACs

Sie besitzen eine hohe Sequenzhomologie mit dem Transkriptionsregulator Rpd3 (reduced potassium dependency 3) der Hefe. Die Klasse I umfasst dabei die HDACs 1, 2, 3, und 8. Bis auf HDAC 3 sind die Enzyme dieser Klasse vornehmlich im Zellkern lokalisiert [117, 126, 135, 136].

- Klasse II-HDACs

HDACs II besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit mit der Hefe HDA1 (Histon-Deacetylase 1) und umfassen die HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10. Die Enzyme können zwischen Zellkern und Zytoplasma der Zelle diffundieren und werden nicht in allen Gewebekompartimenten exprimiert, bevorzugt jedoch in den Muskel-Kompartimenten wie z. B. dem Herz [117, 135, 137, 138]. Dies lässt vermuten, dass die Klasse II-Enzyme in zelluläre Differenzierungsvorgänge und Entwicklungsprozesse involviert sind [137].

Die Klasse II-HDACs werden entsprechend ihrer Struktur der Deacetylase-Domäne in zwei Untergruppen unterteilt. Die Klasse IIa HDACs (HDAC 4, 5, 7 und 9) bestehen aus zwei Teilstrukturen, einer zinkabhängigen katalytischen Domäne und einer N-terminalen Verlängerung mit ca. 600 Aminosäurebausteinen, welche zur Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Co-Repressoren führt. Die Klasse IIb-HDACs (HDAC 6 und 10) hingegen verfügen über zwei in Reihe liegende katalytische Domänen [126, 139, 140].

- Klasse III-HDACs (SIRT 1-7)

Klasse III-HDACs gehören aufgrund ihrer strukturellen Homologie zur Sir2/Hst (Silencing Protein) der Hefe zur Familie der Sirtuine (SIRTs). Das aktive Zentrum besteht hier aus ca. 275 Aminosäureresten und benötigt zur Katalyse den Cofaktor NAD⁺. Dieses Coenzym verbindet z. B. die Aktivität der Sirtuine mit dem Zellstoffwechsel [117, 136, 138, 141]. Außerdem besitzen die Klasse III-HDACs sowohl zwei CXXC-Motive (Zinkfinger-Domänen) als auch mindestens eine hydrophobe Region (Leucin-Zipper), die Protein-Protein und Protein-DNA Wechselwirkungen erleichtern [126].

- Klasse IV-HDAC (HDAC 11)

Diese erst 2002 isolierte Form der HDACs kommt hauptsächlich in Niere, Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur und Hoden vor und ist hauptsächlich im Kern der Zelle lokalisiert [142, 143]. HDAC 11 hatte bislang keine definierte physiologische Funktion. Vor kurzem jedoch wurde eine negativ regulierte Expression des Gens für Interleukin-10 (IL-10) in Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) durch HDAC 11 nachgewiesen. Diese sind z. B. für die Immunantwort auf eingedrungene Erreger oder veränderte Körperzellen verantwortlich [144].

1.5 Einfluss von HDAC bei Tumorerkrankungen

In gesunden Zellen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) [145, 146], das sowohl für ein zellspezifisches Genexpressionsmuster, als auch für das normale Wachstumsverhalten der Zellen verantwortlich ist. Störungen des Gleichgewichtes zwischen HAT und HDAC äußern sich in Änderungen der transkriptionellen Aktivität und können z. B. zu einer verminderten Expression von Tumorsuppressorgenen führen [147].

Durch eine gesteigerte HDAC Aktivität kommt es zu einer dauerhaften Deacetylierung der Histone und somit auch z. B. zur Unterdrückung bestimmter Proteinbiosyntheseprozesse (z. B. durch gene-silencing). Beispielsweise führt HDAC 1 zu einer Herabsetzung des Tumorsuppressorgens p53 [146], während HDAC 2 im Alterungsprozess der Zellen eine wichtige Rolle spielt (replikative Seneszenz) [148]. Solche Fehlregulationsprozesse in der Histon-Acetylierung stehen auch im direkten Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren [149].

1.6 HDAC-Inhibitoren

1.6.1. Allgemeines

Epigenetische Veränderungen sind an der Pathogenese vieler Erkrankungen beteiligt. Histon-Deacetylasen (HDACs) sind epigenetische Regulatoren, die in Tumorzellen häufig überexprimiert sind und zur Fehlregulation von Zellwachstum und -differenzierung ursächlich beitragen. Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) werden deshalb als aussichtsreiche Wirkstoffkandidaten für die Tumorthherapie angesehen und umfangreich charakterisiert. HDACi hemmen die Deacetylierung von Histonen und von vielen anderen Proteinen [131, 147]. Hierdurch modulieren HDACi die Chromatinstruktur und die Genexpression. Dazu zählt auch die Re-Expression von Tumorsuppressorgenen, welche zu zellulärer Differenzierung,

Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion führt. HDACi unterschiedlicher struktureller Substanzklassen befinden sich derzeit in präklinischen und klinischen Studien zur Krebstherapie und werden im Folgenden vorgestellt [150-152].

1.6.2. Strukturklassen

Hydroxamsäuren

Sie sind zurzeit die größte Gruppe der HDACi [124]. Ein gängiges Pharmakophormodell für Hemmstoffe von Zink-abhängigen HDACs unterteilt die chemische Struktur in a) eine Gruppe, die mit Aminosäuren am Eingang der Bindungsstelle interagiert („cap group“) - die gezielte Modifikation dieser Gruppe kann als vielversprechende Strategie zur Generierung von Isoenzym-selektiven HDACi eingesetzt werden [153], b) einen aliphatischen Linker trägt und c) eine Gruppe, die mit dem katalytisch wirksamen Zink im aktiven Zentrum interagiert (Chelat bildende Kopfgruppe „warhead“) [124].

Hydroxamsäuren sind reversible Inhibitoren der Klasse I und II HDACs [135], zu denen unter anderem **166** (Trichostatin A, TSA) und **167** (Suberoylanilidhydroxamsäure, SAHA) gehören.

- TSA (Trichostatin A) (166):

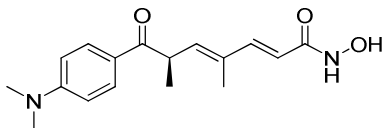


Abbildung 19. Struktur von **166** (TSA).

166 (TSA) war einer der ersten HDACi. Jedoch machte die starke Toxizität dieser Verbindung für den Patienten den klinischen Einsatz unmöglich. Viele darauf folgende Wirkstoffe wurden von der Struktur des Trichostatin A abgeleitet [135]. **166** (TSA) selbst wird heute noch oft als Referenzsubstanz eingesetzt [135, 137].

- SAHA (Suberoylanilidhydroxamsäure) (167):

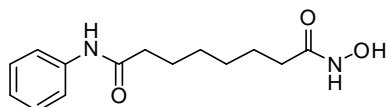


Abbildung 20. Struktur von **167** (SAHA).

167 (SAHA) (Zolinza™) wurde bereits von der US-amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) zur Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen [154] und wird auch bei Patienten mit verschiedenen leukämischen Erkrankungen getestet [155].

Strukturanalysen von **167** (SAHA) und einem HDAC-ähnlichen Protein haben gezeigt, dass **167** (SAHA) in die Tiefe der katalytischen Tasche eindringen kann und somit sein Hydroxamsäurerest mit dem Zinkion direkt interagiert (Abbildung 21) [135, 156, 157]. Durch die Interaktion mit dem Zinkion wird die Deacetylierung der Histone verhindert, während die Histon-Acetylierung nicht beeinflusst wird. Die daraus resultierende erhöhte Expression von Genen soll als Gegenspieler des Tumorwachstums agieren [158].

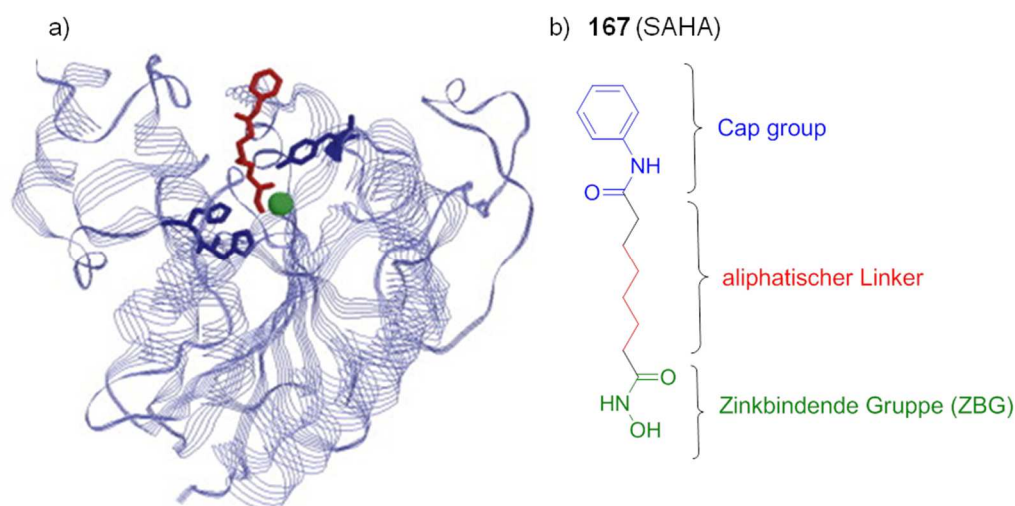


Abbildung 21. (a) Modell eines HDAC-HDACi Komplexes. HDAC 8 – blau, Helices und Faltschichten sind als Bänder, Schleifen und Röhren dargestellt. Aminosäuren (dunkelblau) und Zn^{2+} -Ion (grün) des katalytischen Zentrums sind hervorgehoben. Der Inhibitor **167** (SAHA) ist in rot dargestellt. (b) Hier ist der bekannte HDACi **167** (SAHA) dargestellt. Reproduziert mit Genehmigung nach Krämer *et al.* [156].

- LBH-589 (Panobinostat) (**168**):

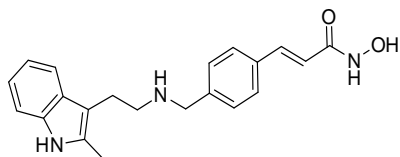


Abbildung 22. Struktur von **168** (LBH-589).

168 (LBH-589) gehört ebenfalls zur Strukturklasse der Hydroxamsäuren und ist eine Weiterentwicklung von **167** (SAHA), wobei seine Wirksamkeit vom mikromolaren zum nanomolaren Bereich gesteigert werden konnte [159]. **168** (LBH-589) (Farydak®) [160] wird bereits für die Behandlung des multiplen Myeloms eingesetzt. Außerdem befindet es sich derzeit in der klinischen Phase 2 für die akute lymphoide Leukämie (ALL) (NCT02518750).

Benzamide

Eine weitere Verbindungsklasse der HDACi sind Benzamide. Zu diesen zählen z. B. Entinostat **169** (MS-275) und seine Derivate:

- MS-275 (Entinostat) (169):

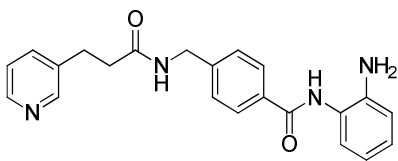


Abbildung 23. Struktur von **169** (MS-275).

Der Hemmmechanismus von **169** (MS-275) konnte noch nicht vollständig geklärt werden, jedoch wird vermutet, dass die Diaminophenylgruppe für die Inhibierung von HDAC entscheidend ist, da die beiden Aminogruppen mit dem Zink-Kation einen Chelatkomplex ausbilden könnten [135, 161]. **169** (MS-275) wirkt in verschiedenen Tumorzelllinien antiproliferativ [162, 163].

Carbonsäuren oder kurzkettige Fettsäuren

Vertreter dieser Gruppe sind z. B. **170** (Natriumbutyrat) und **171** (Valproinsäure). Jedoch gehören nur wenige Substanzen dieser Gruppe an. Diese Klasse von HDACi sind deutlich weniger potent als Hydroxamsäuren [135, 137]. *In vitro* kann zwar eine Hemmung der HDACs im millimolaren Bereich erreicht werden, *in vivo* jedoch sind diese Dosierungen nicht realisierbar. Trotzdem und trotz ihrer pleiotropen Effekte gehören die Carbonsäuren zu den bestuntersuchten HDACi [117, 135], und **171** ist für die Behandlung von Epilepsie und einigen Tumorarten zugelassen [135].

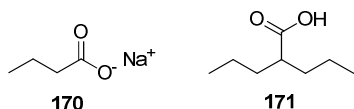


Abbildung 24. Strukturformeln von **170** (Natriumbutyrat) und **171** (Valproinsäure).

1.6.3. Histondeacetylase-Inhibitoren bei akuten Leukämien

HDACi hemmen die Deacetylierung von Histonen an Lysinresten und ändern dadurch die Expression zahlreicher Gene, z.B. die Expression von Genen für anti-proliferative und proapoptotische Proteinmoleküle. Erst in den letzten Jahren ist klar geworden, dass Acetylierungsereignisse neben den Histonen einen großen Kreis weiterer Proteine regulieren [63, 131]. Nach HDAC-Hemmung kann deren Hyperacetylierung anti-neoplastische Wirkungen vermitteln. HDACi-Behandlung von Zellen führt so beispielsweise zur Modulation der Funktion von STAT-Proteinen (Signal Transducer and Activator of Transcription), sowie zur Destabilisierung von Klientenproteinen des Hitzeschock-Proteins 90 (Hsp90) [147, 164, 165]. Aufgrund ihrer anti-tumoralen Effekte werden HDACi als mögliche Therapeutika für die

AML [166] in klinischen Versuchen, sowohl als Einzelsubstanzen als auch in Kombination mit etablierten Zytostatika, untersucht respektive eingesetzt [134].

Aktuell werden verschiedene HDACi in klinischen Studien zur Mono- oder Kombinationstherapie [134, 167] von soliden und hämatologischen Tumoren untersucht. Auch bei akuten Leukämien sollen HDAC-Inhibitoren eine zukünftige Behandlungsmöglichkeit sowohl in Mono- als auch in Kombinationsbehandlung darstellen [168].

Bei **167** (SAHA) konnte in Phase 1 der klinischen Studie eine signifikante antileukämische Aktivität bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie beobachtet werden. **167** (SAHA) hemmt effektiv die HDAC-Aktivität sowohl im peripheren Blut als auch in den Zellen des Knochenmarks. **167** (SAHA, Vorinostat) hat die klinische Phase 2 in der Monotherapie (NCT00305773) abgeschlossen und läuft aktuell in Phase 3 als Kombinationstherapie weiter (NCT01802333).

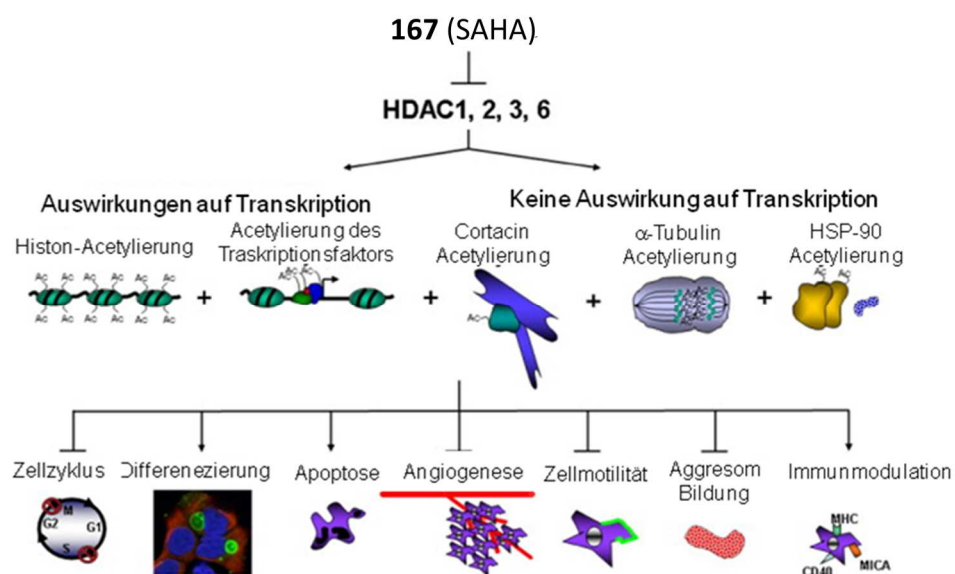


Abbildung 25. Verschiedene Mechanismen zur Darstellung der Zellfunktionen bei Tumorwachstum. Reproduziert mit Genehmigung nach Richon *et al.* [169].

2. Chemischer Teil II

2.1 Chimäre Verbindungen mit Strukturelementen von FLT3i und HDACi Aktivität

Die Anwendung von FLT3-Inhibitoren als Monotherapie bei der Behandlung von AML führt lediglich zu einer niedrigen Ansprechrate [24, 170-172]. Ferner ist die Entwicklung von Resistenzen, die auf der Selektion von Zellklonen mit sekundär mutierten, FLT3i-insensitiven Versionen von FLT3-ITD beruhen, zu beobachten [173, 174]. Daher wird eine Kombination von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKi) mit anderen Wirkprinzipien gegenwärtig als besonders erfolgversprechend angesehen. An erster Stelle steht dabei die Kombination mit etablierten Behandlungsprinzipien, wie z. B. der Einsatz von Zytostatika [170-172] oder die allogene Stammzelltransplantation [174-177]. Eine potentiell ebenfalls aussichtsreiche Kombinationsmöglichkeit erlauben Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi). HDACi werden aufgrund ihrer anti-tumoralen Effekte als mögliche Therapie für AML bereits in klinischen Versuchen sowohl in Einzelgaben als auch in Kombination mit etablierten Zytostatika untersucht [177].

Des Weiteren zeigten Untersuchungen an Zellmodellen der AML, dass die Kombination von FLT3i und HDACi vielversprechende anti-leukämische, wirkungsverstärkende Effekte mit sich bringen [178, 179]. Pietschman *et al.* [151] untersuchten dazu die kombinatorische Wirkung von **168** (LBH-589) (pan-HDACi) und **24** (Tabelle 1, S. 17) (Mahboobi *et al.* 2006 [91]). Die beiden Substanzen wurden dabei auf Induktion der Apoptose als sub-G₁ Population in Zellzyklusanalysen untersucht.

Bei Einzelbehandlungen erhielt man lediglich eine Apoptoserate von weniger als 10%, während beide Substanzen, in Kombination eingesetzt, eine starke zytostatische Wirkung in Bezug auf die Reduktion der S-Phase und der G₂/M Population ausübten (Abbildung 26a). Bei der Kombinationsbehandlung mit 10 nM **168** (LBH-589) und 300 nM **24** konnte man eine Apoptoserate von annähernd 90% erhalten [151].

Die Einzelbehandlungen mit den beiden Inhibitoren sowie die Kombinationsbehandlung führten in MV4-11-Zellen, welche endogenes FLT3-ITD exprimieren, Dosis-abhängig zu der gewünschten Induktion von Apoptose (Abbildung 26b). Die mittlere Dosis-Wirkungs Beziehung kann nach Chaou und Talalay berechnet werden (CI) und besagt, dass ein CI Wert < 1 für Synergismus steht (Tabelle in Abbildung 26b). Diese Daten zeigen deutlich eine synergistische Wirkung beider Substanzen und belegen, dass die Kombination von HDACi und FLT3i gegenüber der Einzelgabe deren Wirkung signifikant verstärken kann [151].

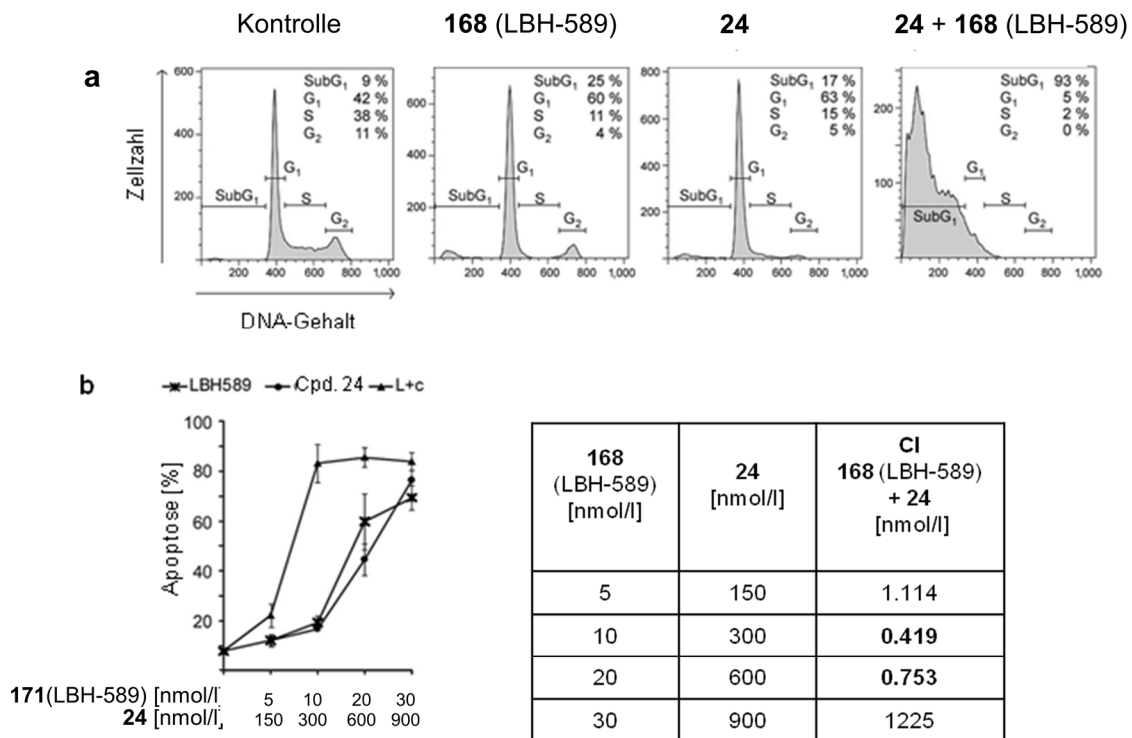


Abbildung 26. Der HDACi **168** (LBH-589) und der selektive FLT3-Inhibitor **24** zeigen eine kombinatorische Wirkung bei der Induktion von Apoptose in FLT3-ITD-exprimierenden AML-Zellen. **(a)** Zellzyklusprofil in MV4-11-Zellen als Histogramme. Die Behandlung erfolgte mit 10 nM **168** (LBH-589), 300 nM **24** oder der Kombination beider Substanzen in diesen Konzentrationen. **(b)** Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseraten in MV4-11-Zellen. Reproduziert mit Genehmigung nach Pietschmann *et al.* [151].

Ein weiteres Beispiel für solch einen dualen Inhibitor ist **172** (CUDC-101). Dieser duale Tyrosinkinase-(EGF/Her2) und HDAC-Inhibitor hat die klinische Phase 1b für Kopf-Hals-Karzinome sowie Leber-, Brust-, Lungen- und Magenkrebs (NCT01171924) abgeschlossen. Durch die Kombination der Grundstruktur von **13** (Erlotinib) (EGF/Her2-Inhibitor) mit HDAC-inhibitorischen Strukturelementen (Abbildung 27) wurde ein neuartiger dual wirksamer Inhibitor kreiert. Dessen Inhibitorwirkung liegt im enzymatischen Assay um den Faktor 5-10 höher als die der einzelnen Substanzen. Ferner liefert der chimäre Wirkstoff **172** (CUDC-101) eine signifikant verbesserte Hemmung des Wachstums von Krebs-Zelllinien im *in vitro* System gegenüber einer kombinierten Anwendung der einzelnen Substanzen. Zusätzlich soll das Präparat eine höhere Verträglichkeit und verbesserte Pharmakokinetik aufweisen [180, 181].

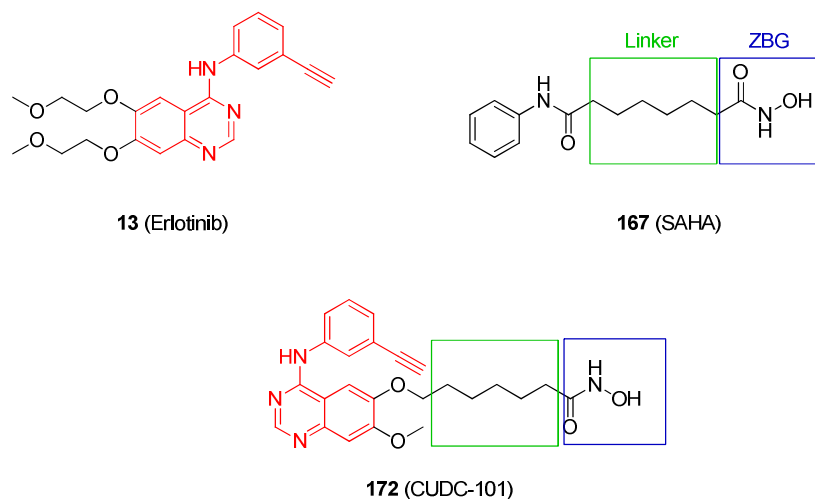


Abbildung 27. Darstellung des EGF/Her2-Inhibitors **13** (Erlotinib), des HDAC-Inhibitors **167** (SAHA) und des daraus abgeleiteten Hybridmoleküls **172** (CUDC-101).

2.2 Zielsetzung

Basierend auf diesen synergistischen Effekten war es das Ziel dieser Arbeit, eine neue Generation von Hybriden zu entwickeln, welche sowohl eine FLT3i als auch eine HDACi-Aktivität aufweisen (Konzept der „2 warheads“) [182]. Derartige Zwei-Komponenten-Verbindungen sollen beide Wirkprinzipien in einer Verbindung vereinen und so z. B. das Auftreten resistenter Klone, die nur mit einem oder einer unzureichenden Menge einer der beiden Agentien in Kontakt sind, ausschließen.

Diese Hybride sollten daher das Grundgerüst der bereits synthetisierten FLT3-Inhibitoren aufweisen, wie z. B. **29**, **30** oder **36**, und zum anderen mit den Strukturmerkmalen von verschiedenen HDAC-Inhibitoren wie z. B. **167** (SAHA), **168** (LBH-589) oder **169** (MS-275) modifiziert werden (Abbildung 28).

Darüber hinaus sollten diese neu synthetisierten Wirkstoffe im Zellsystem auf ihre potenziellen Eigenschaften hin getestet werden. Es sollte festgestellt werden, ob diese in der Lage sind, Wechselwirkungen mit dem FLT3-Rezeptor einzugehen bzw. mit dem katalytischen Zentrum der Histondeacetylasen zu interagieren, um die gewünschten Effekte wie oben beschrieben erzielen zu können.

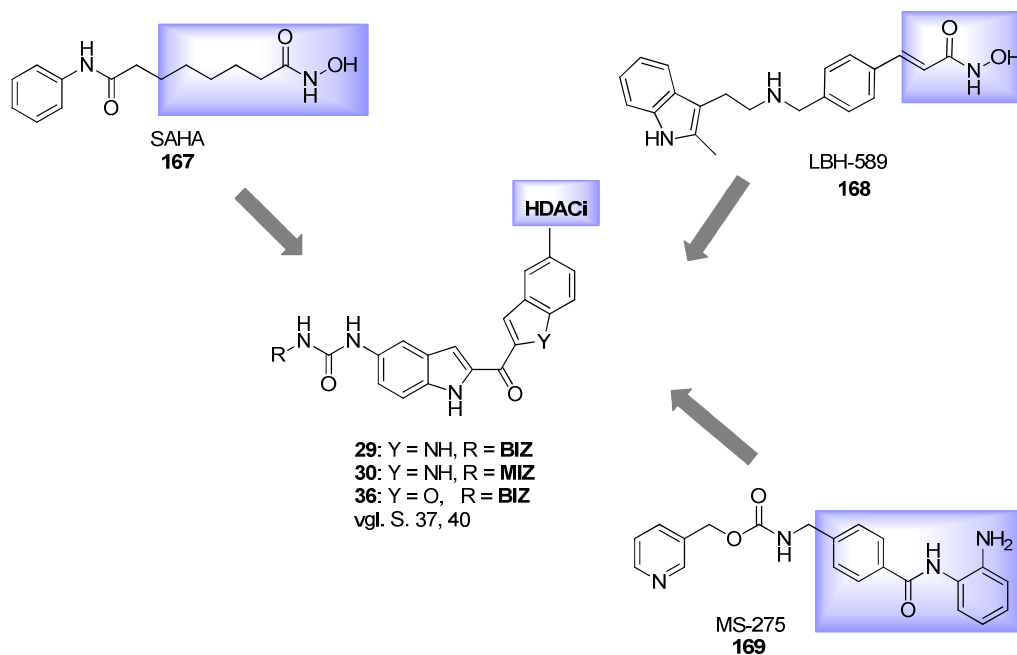
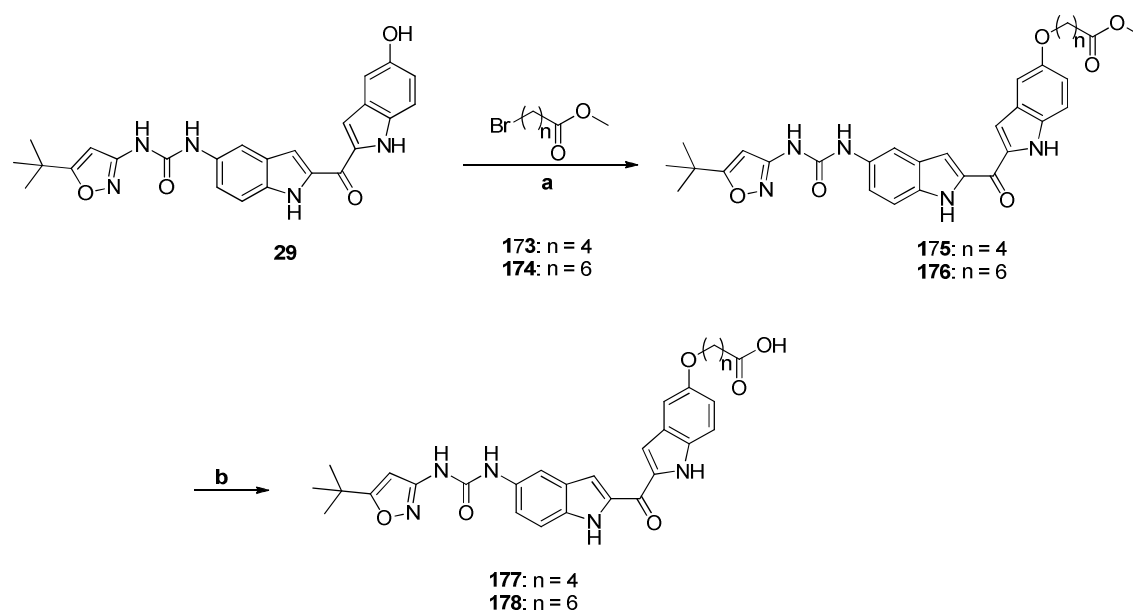


Abbildung 28. Übersicht von strukturellen Kombinationsmöglichkeiten zu chimären Verbindungen.

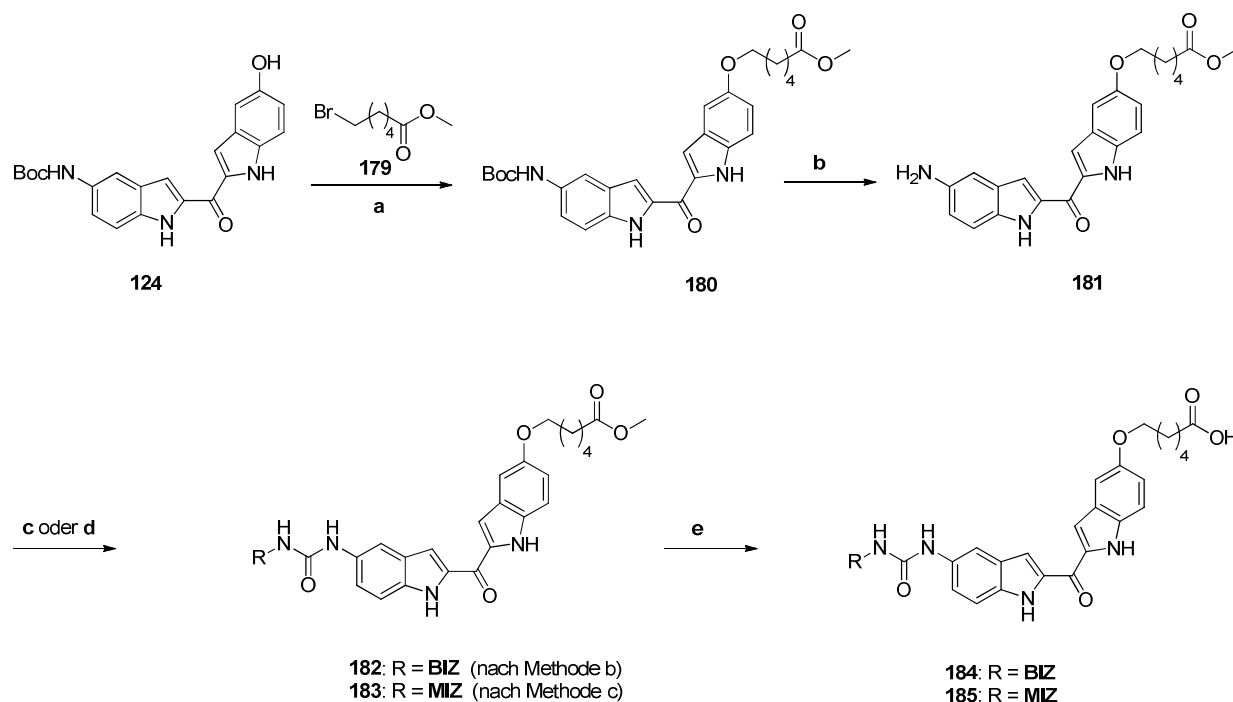
2.3 Synthese chimärer Verbindungen mit einem Strukturelement von 167 (SAHA)

29 und seine Analoga (Abbildung 28) wurden, wie in Kapitel Chemischer Teil I beschrieben, in einer mehrstufigen Synthese dargestellt. Sie dienten als Edukte für die Modifikation mit Partialstrukturen des HDAC-Inhibitors **167** (SAHA) und dessen Analoga (Schema 27-30). Im ersten Schritt wurde **29** mit den entsprechenden ω -Bromcarbonsäuremethylestern ($n = 4, 5, 6$) alkyliert. Die Kettenlänge von $n = 6$ (**176**) entspricht dabei der von **167** (SAHA), während die Verbindung **175** ($n = 4$) als strukturelles Derivat angesehen werden kann (Schema 27). Desweiteren wurden in Schema 28 nicht nur die Länge der Seitenkette ($n = 5$) weiter variiert, sondern auch Modifikationen an der Isoxazolseitenkette vorgenommen (*t*Bu vs. Me).



Schema 27. Synthese der orthogonal funktionalisierten FLT3-Inhibitoren **177** und **178**. (a) 1.1 equiv. NaH (60% in Mineralöl), 1.2 equiv. 7-Bromönanthensäuremethylester ($n = 6$) **174** oder 5-Bromvaleriansäuremethylester ($n = 4$) **173**, 0 °C, DMF, (b) 1.2 equiv. LiOH, H₂O:MeOH:THF (1:1:2).

Um alternative Darstellungsweisen solcher funktionalisierter Inhibitoren zu untersuchen, wurde die Synthesesequenz zur Einführung der Alkylcarbonsäureester im Vergleich zu Schema 27 modifiziert. Ausgehend von **124** wurde daher zunächst die entsprechende Estergruppe eingeführt (**180**), bevor durch eine Additionsreaktion mit **140 (BIZ-NCO)** bzw. **150 (MIZ-NCO)** die gewünschten Produkte **182** und **183** erhalten wurden (Schema 28). Durch basische Esterspaltung unter milden Bedingungen konnten nach Schema 27 und 28 die freien Carbonsäuren **177-178** und **184-185** erhalten werden.

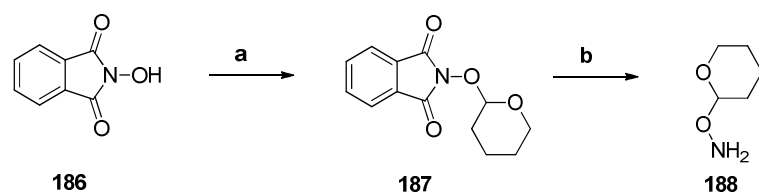


Schema 28. Synthese von **184** und **185**. (a) 1.1 equiv. NaH (60% in Mineralöl), 1.2 equiv. 6-Bromcapronsäuremethylester, 0 °C, DMF, (b) Trifluoressigsäure (c) 0.1 M Lösung **140** in THF, kat. Pyridin, THF, (d) **150**, 1.1 equiv. Diphosgen, THF, (e) 1.2 equiv. LiOH, H₂O:MeOH:THF (1:1:2).

2.3.1. Synthese von **188** (NH₂OTHP)

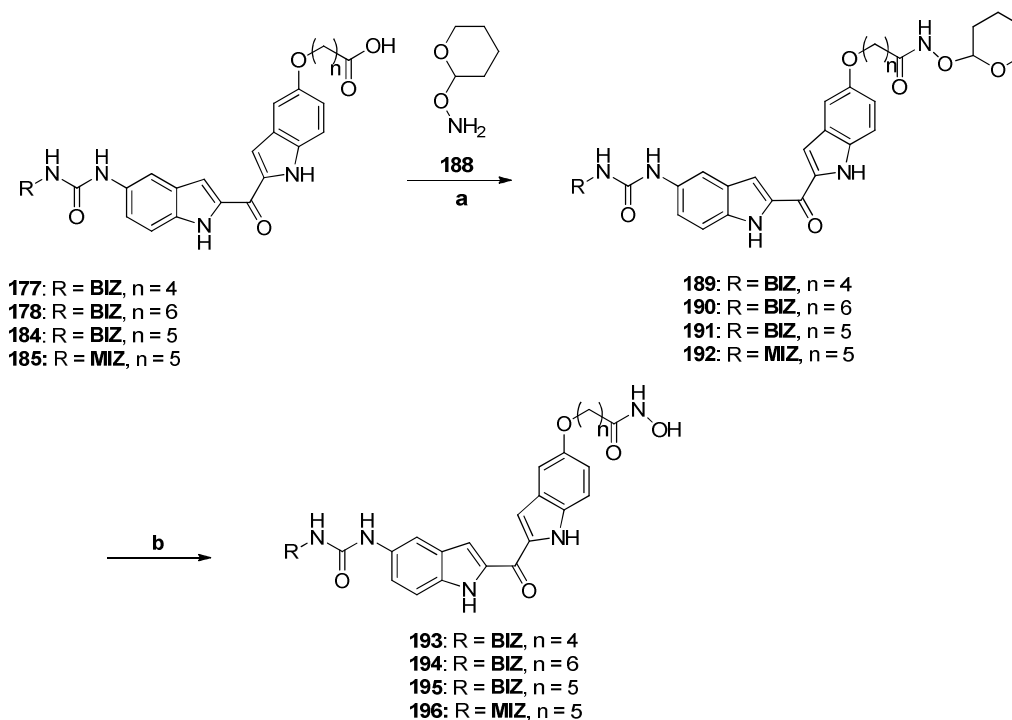
Um die entsprechenden Hydroxamsäuren **193-196** zu generieren, wurde zunächst *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (**188**) in zwei Schritten synthetisiert (Schema 29).

N-Hydroxyphthalimid (**186**) wurde im ersten Schritt mit Dihydropyran unter Säurekatalyse geschützt (**187**) [183]. Anschließend konnte mittels Hydrazinolyse mit Methylhydrazin das gewünschte *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (**188**) erhalten werden [183].



Schema 29. Synthese von **188** (*O*-(Tetrahydropyran-2-yl)hydroxylamin). (a) 1.1 equiv. Dihydropyran, kat. *p*-Toluolsulfonsäure, Dioxan:DCM 1:1, (b) 1.15 equiv. Methylhydrazin, Benzol, 80 °C.

Die Umsetzung der jeweiligen Carbonsäuren mit **188** (*O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin) und die anschließende saure Acetalspaltung lieferten die entsprechenden Hydroxamsäuren **193-196** (Schema 30).

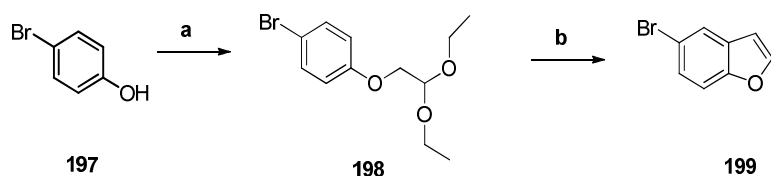


Schema 30. Synthese von **193-196**. (a) 1.2 equiv. BOP, 3.0 equiv. NH_2OTHP (**188**), 3.0 equiv. NEt_3 , THF/DMF, (b) 0.6 M HCl (aq.), MeOH.

Dazu wurden die Carbonsäuren **177**, **178** und **184-185** mit **188** (*O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin) amidiert [184]. Die Freisetzung zur Hydroxamsäure konnte durch Spaltung des Acetals mit wässriger verdünnter Salzsäure in Methanol bewerkstelligt werden [184]. Man erhielt auf diese Weise die gewünschten chimären Verbindungen, welche neben dem FLT3-inhibitorischen Pharmakophor auch das HDACi-Strukturelement von **167** (SAHA) aufweisen (**193-196**).

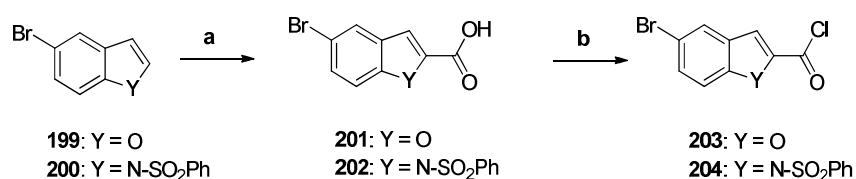
2.4 Synthese chimärer Verbindungen mit einem Strukturelement von **168** (LBH-589)

5-Brombenzofuran (**199**) wurde ausgehend von 4-Bromphenol (**197**) in zwei Stufen nach Marom *et al.* [185] synthetisiert. 4-Bromphenol (**197**) konnte nach Deprotonierung mit Natriumhydrid mit Bromacetaldehyddiethylacetal zum 1-Brom-4-(2,2-diethoxyethoxy)benzol (**198**) reagieren. Nach Ringschluss mittels Polyphosphorsäure in Benzol konnte **199** isoliert werden (Schema 31) [185].



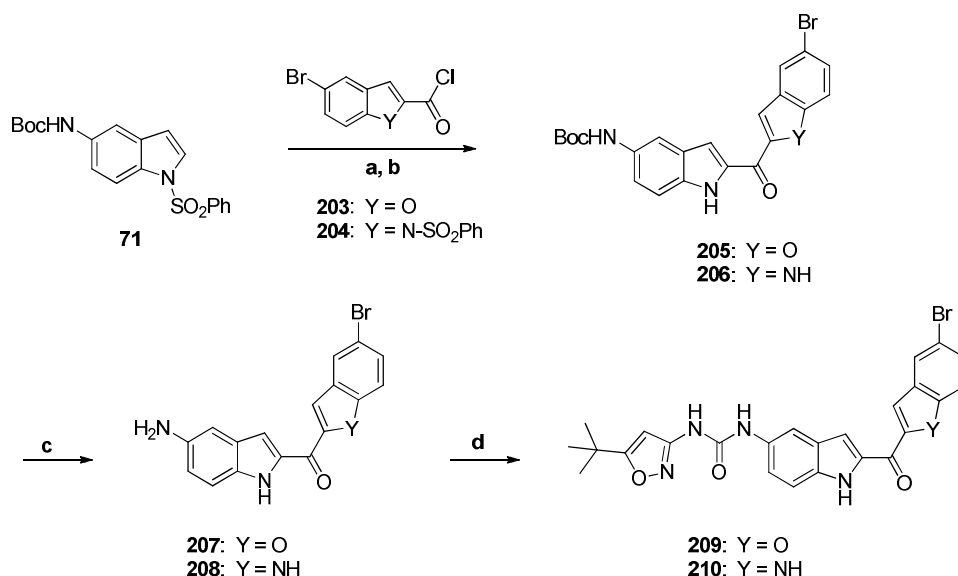
Schema 31. Darstellung von 5-Brombenzofuran (**199**). (a) 1.25 equiv. NaH, 1.2 equiv. Bromacetaldehyddiethylacetal, DMF, 100 °C, (b) 10% Polyphosphorsäure, Benzol, Rückfluss.

5-Bromindol wurde wie in Schema 4 phenylsulfoniert (**200**). **199** und **200** wurden anschließend mittels LDA in Position 2 metalliert und durch Zugabe von CO₂ (Trockeneis) mit anschließender saurer Aufarbeitung carboxyliert. Die so erhaltenen Carbonsäuren wurden mit Thionylchlorid in ihre Carbonsäurechloride **203** und **204** überführt (Schema 32).



Schema 32. Darstellung von 5-Brombenzofuran-2-carbonsäurechlorid (**203**) und 5-Brom-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-2-carbonsäurechlorid (**204**). (a) 1.1 equiv. LDA, -78 °C, THF, Trockeneis, (b) SOCl₂, Rückfluss.

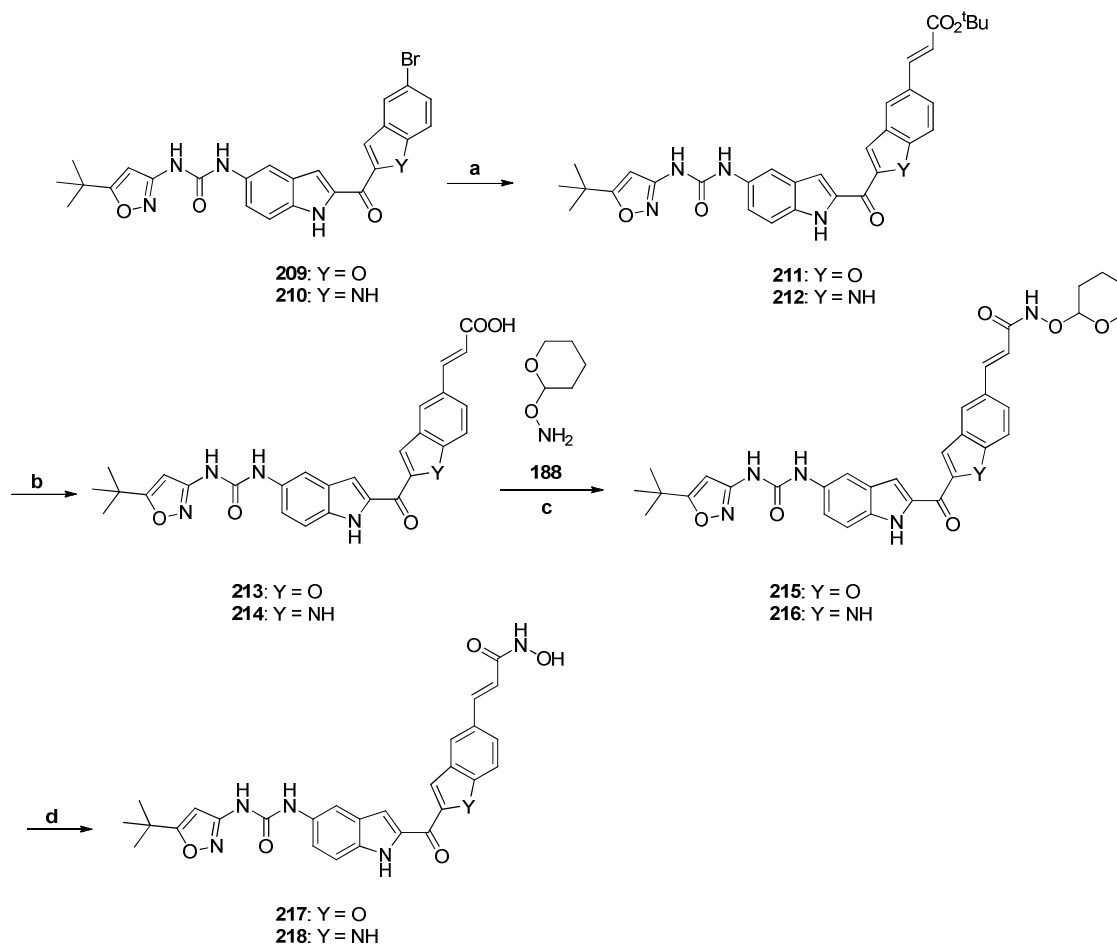
Die Kopplungsreaktion (analog Schema 9) und die darauffolgenden Schritte wurden analog zu den Schemata 12 und 17 durchgeführt, um **209** und **210** zu erhalten (Schema 33).



Schema 33. Synthese von **209** und **210** (a) 2.2 equiv. *t*-BuLi, -78 °C, THF, (b) 2.5 equiv. TBAF, THF, Rückfluss, (c) 2 M HCl (aq.), THF, (d) 0.1 M Lösung von 5-(*tert*-Butyl)-3-isocyanatoisoxazol (**140**) in THF, THF, kat. Pyridin.

Durch eine Palladium-vermittelte Kreuzkupplung (Heck-Reaktion) [186] (Schema 34) von **209** und **210** mit *tert*-Butylacrylat konnte der α,β -ungesättigte Ester eingeführt werden [187], welcher später in eine Hydroxamsäure überführt wurde (das Strukturelement des HDACi **168**

(LBH-589)). Die *tert*-Butylester **211** und **212** konnten mittels Trifluoressigsäure zu **213** und **214** gespalten werden. Die nachfolgende Amidierung mit NH₂OTHP (**188**) und die abschließende Acetalspaltung erfolgte wie in Schema 30 dargestellt. Man erhielt somit die gewünschten chimären Verbindungen **217** und **218**, welche nun ein strukturelles Element von **168** (LBH-589) aufweisen (Schema 34).



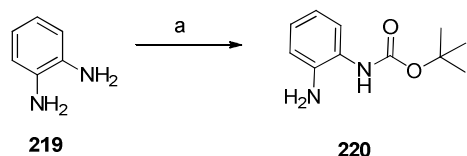
Schema 34. Synthese von **217** und **218**. (a) 0.1 equiv. Tri-*o*-tolyl-phosphin, 0.1 equiv. Pd(OAc)₂, 16.0 equiv. *tert*-Butylacrylat, Rückfluss, 3.0 equiv. NEt₃, THF, (b) Trifluoressigsäure, (c) 1.2 equiv. BOP, 3.0 equiv. NH₂OTHP (**188**), 3.0 equiv. NEt₃, THF:DMF 2:1, (d) 0.6 M HCl (aq.), MeOH.

2.5 Synthese chimärer Verbindungen mit einem Strukturelement von **169** (MS-275)

2.5.1. Synthese von **225** (*N*-(2-aminophenyl)-4-(((2-(5-(3-(5-(*tert*-butyl)isoxazol-3-yl)harnstoff)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)methyl)benzamid)

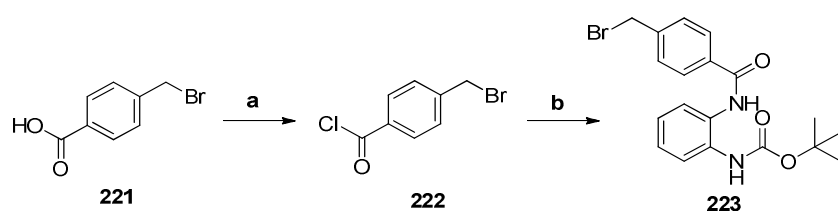
Der Benzamid-Substituent (Element von **169** (MS-275)) konnte durch eine zweistufige Synthese ausgehend von *o*-Aminoanilin (**219**) erhalten werden [188].

Im ersten Schritt führte man selektiv *eine* Boc-Schutzgruppe für *o*-Aminoanilin (**219**) mit Di-*tert*-butyl-dicarbonat ein und man erhielt **220**.



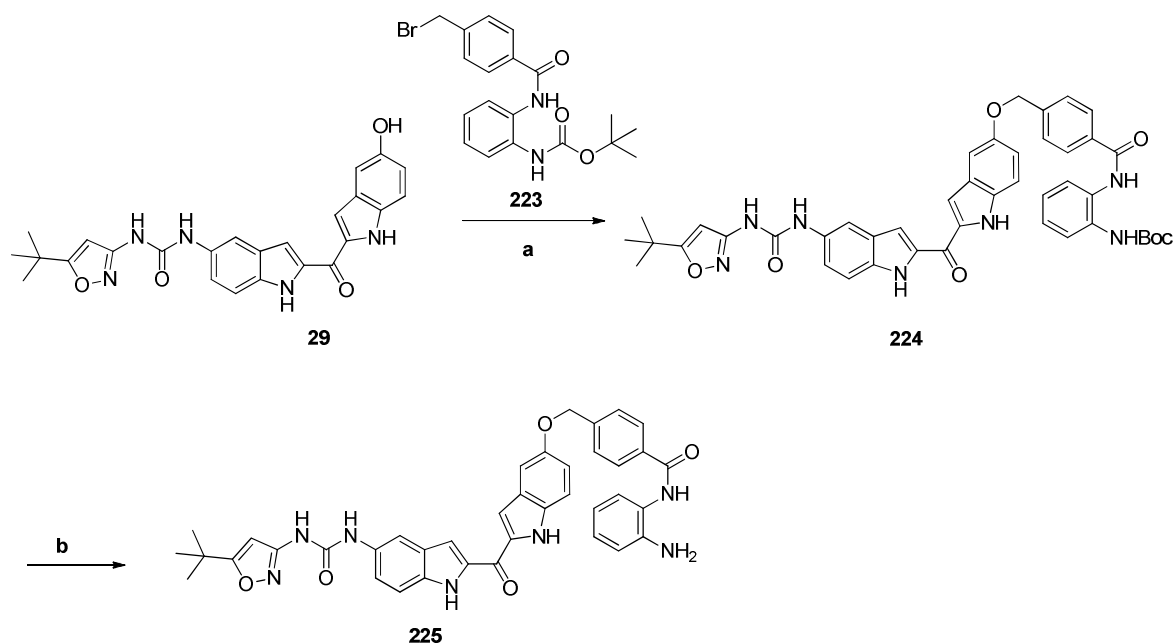
Schema 35. Synthese von *tert*-Butyl 2-aminophenylcarbamate (**220**). (a) 1.2 equiv. Boc₂O, THF.

Im nächsten Schritt wurde zunächst 4-(Brommethyl)benzoesäure (**221**) mit Hilfe von Thionylchlorid in ihr 4-(Brommethyl)benzoylchlorid (**222**) überführt. Dieses konnte anschließend *in situ* mit dem im ersten Schritt erhaltenen *tert*-Butyl-2-aminophenylcarbamate (**220**) zum gewünschten *tert*-Butyl-2-(4-(brommethyl)benzamido) phenylcarbamate (**223**) umgesetzt werden [188].



Schema 36. Synthese von *tert*-Butyl 2-(4-(bromomethyl)benzamido)phenylcarbamate (**223**). (a) SOCl₂, Rückfluss, (b) 1.0 equiv. **220**, 1.2 equiv. Pyridin, DCM.

Durch Alkylierung der Hydroxylgruppe von **29** mit *tert*-Butyl 2-(4-(bromomethyl)benzamido)phenylcarbamate (**223**) erhielt man **224**. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe ließ sich **225** als Produkt darstellen (Schema 37). Dieses enthielt nun als HDAC-inhibitorische Sequenz das *o*-Aminobenzamid Strukturelement von **169** (MS-275).



Schema 37. Synthese von **225**. (a) 1.1 equiv. NaH, 1.1 equiv. **223**, DMF, (b) Trifluoressigsäure.

C. Pharmakologischer Teil

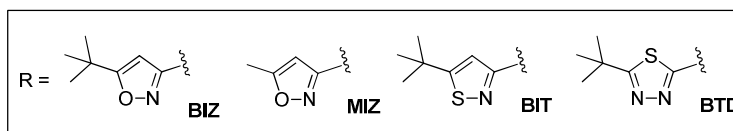
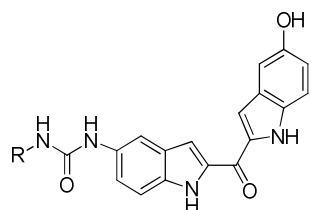
1. Ergebnisse

1.1 FLT3-Inhibitoren

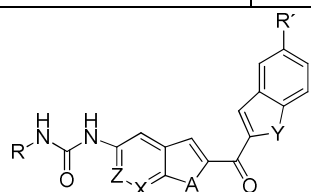
Die FLT3-Rezeptortyrosinkinase ist in der AML sehr häufig fehlreguliert, sodass Inhibitoren dieser Kinase eine potentielle Therapiestrategie gegen AML darstellen. Die im Chemischen Teil I beschriebenen Verbindungen wurden auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung dieser Kinase mit den beschriebenen pharmakologischen Methoden (Kapitel F. 2) getestet.

1.1.1 Proliferationsassay in MV4-11-Zellen

Die neu synthetisierte Serie von FLT3-Inhibitoren aus dem Chemischen Teil I wurde hierfür in einer humanen AML-Zelllinie (MV4-11) einem Proliferationsassay in Bezug auf ihre Zellviabilität unterzogen. Anhand der gewonnenen Daten wurde der IC_{50} -Wert der einzelnen Verbindungen bestimmt (Tabelle 4).

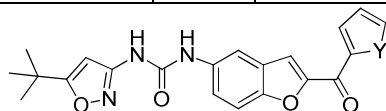


Verb.	R	IC_{50} [nM]
29	BIZ	1.71 ± 0.412
30	MIZ	> 100
31	BIT	5.15 ± 0.618
32	BTD	14.42 ± 0.657

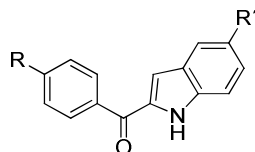


Verb.	X	Z	A	Y	R'	R	IC_{50} [nM]
33	N	CH	NH	NH	OH	BIZ	> 100
35	CH	N	NH	O	OH	BIZ	29.75 ± 0.586

36	CH	CH	NH	O	OH	BIZ	0.78 ± 0.648
37 (BS228)	CH	CH	O	NH	OH	BIZ	0.64 ± 0.859
38	CH	CH	O	S	H	BIZ	10.74 ± 0.744
39	CH	CH	O	NH	OH	MIZ	24.31 ± 0.725
40	CH	CH	O	NH	OH	BIT	3.77 ± 0.746



Verb.	Y	IC ₅₀ [nM]
41	NH	9.94 ± 0.682
42	O	2.75 ± 0.756
43	S	7.92 ± 0.773



Verb.	R	R'	IC ₅₀ [μM]
44	H	NH-CO-NH- BIZ	> 1
45	NH-CO-NH- BIZ	OCH ₃	> 1
46	NH-CO-NH- BIZ	OH	> 1
8 (AC220)			1.20 ± 0.659 nM

Tabelle 4. Inhibition des FLT3-Tyrosinkinase-Rezeptors durch Bis(1*H*-indol-2-yl)methanone und Derivate im MV4-11 Proliferationsassay (N = 3). Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mit der Software Prism Graphpad.

Die durch die Modifikation der Leitstruktur **29** erhaltenen Verbindungen und ihre zugehörigen IC₅₀-Werte sind in Tabelle 4 dargestellt. **8** (AC220) (Abbildung 11, S. 19), ein potenter FLT3-Inhibitor wurde als Referenzverbindung verwendet.

Es wurden sowohl Veränderungen im Grundkörper der Bisindole als auch in der Seitenkette des Isoxazolrestes vorgenommen. Dabei wurden 5-(*tert*-Butyl)isoxazol (**BIZ**) wie in **29** durch verschiedene Derivate, wie z. B. 5-Methylisoxazol (**MIZ**) in **30** oder 5-(*tert*-Butyl)isothiazol (**BIT**) in **31** oder 5-(*tert*-Butyl)-1,2,4-thiadiazol (**BTD**) in **32** ersetzt.

Es konnte dabei ein Zusammenhang bezüglich der Affinität gegenüber dem FLT3-Rezeptor und dem Harnstoff-Derivat (**29-32**) beobachtet werden. Die Verbindungen, die mit der Struktur **MIZ** modifiziert wurden, zeigten im Vergleich zu **BIZ** eine verminderte inhibitorische Wirksamkeit. Es scheint daher für die Bindung in der ATP-Tasche wichtig zu sein, dass der Alkyl-Rest eine gewisse Größe aufweist um diese auszufüllen. Man konnte diesbezüglich eine Reihenfolge hinsichtlich der Modifikation am Harnstoff-Derivat und ihrer Affinität für den Rezeptor festlegen: **BIZ** > **BIT** > **BTD** >> **MIZ**.

Weitere Veränderungen der Struktur wurden sowohl *im* Bisindolylmethanon-Grundgerüst als auch *am* Grundgerüst selbst durchgeführt, wie z. B. „Azaindole“. Der zusätzliche Stickstoff in Position 7 im Ring (**33**) führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch den zusätzlichen Stickstoff ungünstige Wechselwirkungen mit der Binde-Tasche entstehen.

Außerdem wurden auch Benzofurane anstelle von Indolen eingeführt (**35-37**). Bei **35** führte dies zu einer erheblichen Aktivitätssteigerung. Im Vergleich zu **33**, das aus einem Azaindol neben dem Indol-Grundgerüst bestand, führte der Ersatz des Indols durch ein Benzofuran zur Steigerung der inhibitorischen Wirkung (> 100 nM vs. 30 nM). Auch bei **36** und **37** (BS228) konnte diese Affinitätszunahme gegenüber **29** (ca. 2.2 - 2.7 fach) beobachtet werden.

Aus weiteren Untersuchungen (Tabelle 5 und 6) resultierte, dass **37** (BS228) die potenteste Verbindung in dieser Serie war. Es wurden daraufhin noch weitere Modifikationen an **37** (BS228) durchgeführt. Ebenfalls wurde die Isoxazolseitenkette **BIZ** durch **MIZ** (**39**) und **BIT** (**40**) ersetzt (Tabelle 4). Die ermittelten IC₅₀-Werte stimmten mit den zuvor gemachten Beobachtungen bezüglich der Veränderung der inhibitorischen Wirkung überein. Das Derivat mit 5-Methylisoxazol **MIZ** zeigte neben **BIZ** und **BIT** die geringste inhibitorische Wirkung. Außerdem wurde das Indol durch Benzothiophen (**38**), Pyrrol (**41**), Furan (**42**) oder Thiophen (**43**) substituiert. Alle Derivate wiesen weiterhin eine gute Affinität gegenüber dem FLT3-Rezeptor auf, jedoch nicht so stark wie **37** (BS228).

Neben den Bisindolylmethanonen wurden auch sogenannte 2-Aroylderivate (**44-46**) synthetisiert. Diese zeigten jedoch lediglich eine Wirksamkeit > 1 µM, sodass diese Art von Modifikation nicht weiterverfolgt wurde.

1.1.2 Messung der Apoptoseinduktion durch FLT3-Inhibitoren mittels Durchflusszytometrie

Neben dem Proliferationsassay wurde auch die Apoptoseinduktion (Abbildung 29) beziehungsweise der Anteil an Zellen, der sich in der subG₁-Zellzyklusphase befindet, gemessen. Dazu wurden zunächst die synthetisierten Verbindungen (**29-33** und **35-37**) in verschiedenen Konzentrationen zu unterschiedlichen Inkubationszeiten in Vergleich zu **8** (AC220) untersucht.

Die durchflusszytometrische Analyse (*engl.* Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)) mit Propidiumiodid (PI) gefärbten Zellen erlaubt die Untersuchung des Zellzyklusprofils. PI interkaliert in die DNA, und aufgrund der eingelagerten Menge an PI lassen sich die einzelnen Phasen des Zellzyklus mit Hilfe eines Durchflusszytometers ableiten. Die subG₁-Zellzyklusphase stellt dabei den Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen dar, welche lediglich noch fragmentierte DNA enthalten.

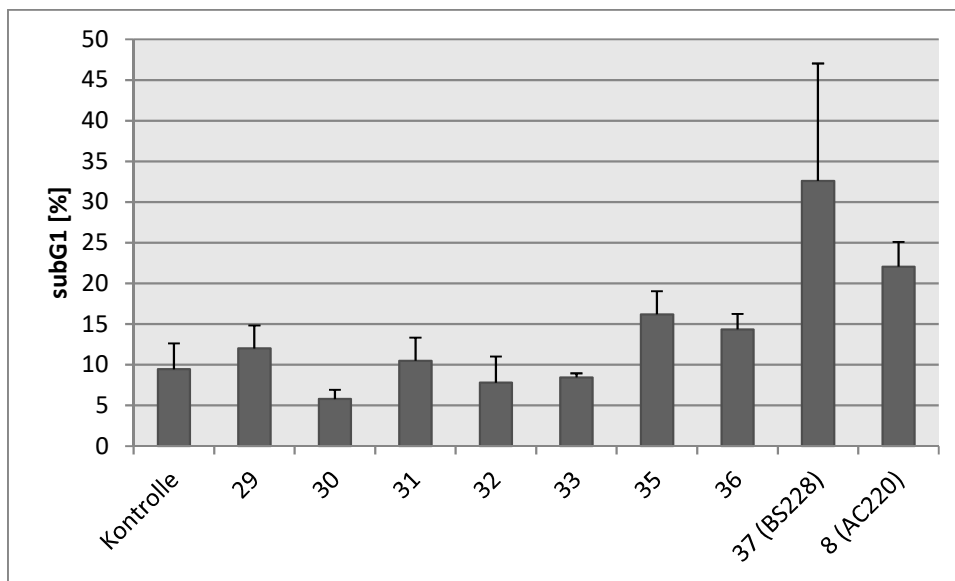


Abbildung 29. Apoptose-Induktion in FLT3-ITD exprimierenden Zellen durch FLT3i. MV4-11-Zellen wurden mit 10 nM des Wirkstoffes für 48 h behandelt (N = 2). Anschließend wurde die Fraktion apoptotischer Zellen (subG₁-Fraktion) bestimmt und mit Hilfe von FACS Diva Software ausgewertet.

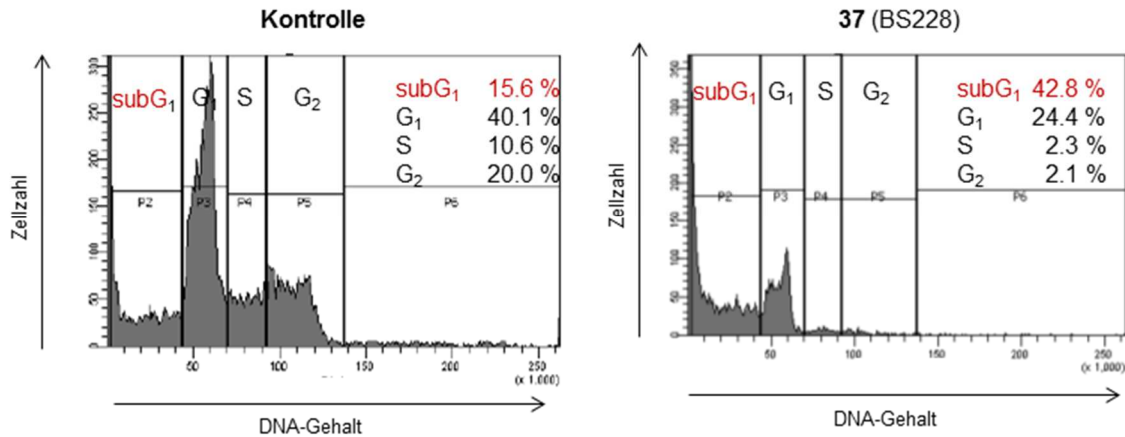


Abbildung 30. Auszug aus FACS Diva Software: Zellzyklus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) und von **37** (BS228) 10 nM nach 48 h.

Aus Abbildung 30 ist der Vergleich zwischen einem normalen Zellzyklus (Kontrolle) und einer Apoptose induzierenden Substanz **37** (BS228) ersichtlich. Bei **37** (BS228) ist im Vergleich zur Kontrolle die subG₁-Phase der fragmentierten und apoptotischen Zellen, die durch degradierte DNA charakterisiert sind, stark erhöht (42.8% vs. 15.6% in der Kontrolle). Außerdem wurde das Zellwachstum sowohl in der S- als auch in der G₂-Phase stark reduziert.

1.1.3 Proliferationsassay in FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen

Aufgrund der günstigen Pharmakokinetik *in vivo*, sowie der Fähigkeit, FLT3-ITD spezifisch im nanomolaren Bereich *in vitro* zu hemmen, ist **8** (AC220) einer der vielversprechendsten TKi gegen FLT3-ITD-positive AML [93]. Bei der Therapie von FLT3-ITD-positiven Patienten mit **1** (PKC412) [28] oder **8** (AC220) [74] entstehen bei einem großen Anteil der behandelten Patienten sekundäre FLT3-Mutationen [74]. Mutationen in der Aktivierungsschleife des FLT3-Rezeptors der FLT3-ITD (Positionen D835 und Y842), des „gatekeeper residue F691“ [74], oder Mutationen in der ATP-Bindungsdomäne an N676 [75] führen zu einer Verringerung oder gar einem Verlust der Aktivität von **8** (AC220) [24, 76].

Aufgrund dessen wurden neue Wirkstoffe entwickelt, die auch bei Therapie-assoziierten FLT3-Mutationen zusätzlich zur FLT3-ITD ihre Wirksamkeit nicht verlieren. Bekannte Beispiele hierfür sind **9** (Crenolanib) [70-72, 78], **10** (G-749) [79] und **11** (TTT-3002) [80] (Abbildung 7). **9** (Crenolanib) wurde ursprünglich als PDGFR-Inhibitor [69] entwickelt, ist zur Zeit jedoch der wirksamste und erfolgversprechendste TKi gegen Therapie-assoziierte sekundäre FLT3-Mutationen mit einem FLT3-ITD Hintergrund.

Die hier synthetisierten Verbindungen, die bereits im AML-Zelltest sehr wirksame FLT3-Inhibitoren waren (**29**, **36** und **37** (BS228): IC₅₀-Werte im niedrigen nanomolaren Bereich),

wurden daher auch an FLT3-ITD-positiven Zellen mit einer sekundären FLT3-Mutation getestet, welche durch die Therapie mit **8** (AC220) hervorgerufen werden. Dazu wurden murine Ba/F3-Zellen verwendet, welche neben FLT3-WT, FLT3-ITD, FLT3-D835Y (häufigste TKD-Mutante) zusätzlich zu einer FLT3-ITD auch eine der beiden FLT3-TKD-Mutationen D835Y und N676K exprimieren (Tabelle 5 und 6).

Ba/F3-Zellen	37 (BS228) IC ₅₀ [nM]	36 IC ₅₀ [nM]	29 IC ₅₀ [nM]
D835Y	1.14 ± 0.853	19.66 ± 0.824	28.10 ± 0.916
D835Y-N676K	17.53 ± 0.900	64.61 ± 0.859	105.6 ± 0.763
ITD	2.06 ± 0.346	< 5 (n.b.)	< 5 (n.b.)
ITD-D835Y	17.93 ± 0.914	> 100 (n.b.)	> 100 (n.b.)
ITD-N676K	16.51 ± 0.973	14.39 ± 0.829	11.29 ± 0.958
WT	2.95 ± 0.852	< 5 (n.b.)	< 5 (n.b.)

Tabelle 5. Übersicht der IC₅₀-Werte von **29**, **36** und **37** (BS228) in Ba/F3-Zellen. Die Zellen wurden 72 h mit einer Konzentrationsreihe der entsprechenden Verbindung inkubiert und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt (N = 3). Die Werte wurden zur Leerkontrolle prozentual ins Verhältnis gesetzt. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels der Software Prism Graphpad (n.b. = nicht bestimmt).

Ba/F3-Zellen	37 (BS228) IC ₅₀ [nM]	8 (AC220) IC ₅₀ [nM]	Aktivitäts- verhältnis
D835Y	1.14 ± 0.853	6.56 ± 0.342	5.8
D835Y-N676K	17.53 ± 0.900	39.32 ± 0.504	2.2
ITD	2.06 ± 0.346	7.59 ± 0.789	3.7
ITD-D835Y	17.93 ± 0.914	136.40 ± 0.992	7.6
ITD-N676K	16.51 ± 0.973	19.63 ± 0.940	1.2
WT	2.95 ± 0.852	3.56 ± 0.326	1.2

Tabelle 6. Vergleich der IC₅₀-Werte und des Aktivitätsverhältnisses von **37** (BS228) vs. **8** (AC220).

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, zeigte **37** (BS228) gegenüber allen transfizierten Zelllinien eine sehr gute inhibitorische Wirkung. Bei **36** und **29** hingegen konnte ein deutlicher Wirkungsverlust in der TKD-Mutation (D835Y) und der Doppelmutation ITD-TKD (D835Y N676K) beobachtet werden. Die Mutation an ITD-D835Y führte zum vollständigen Wirkungsverlust von **36** und **29**, während die Mutation an ITD-N676K keinen Einfluss auf ihre inhibitorische Wirkung zeigte. Auch im Wildtyp (WT) konnte eine ebenfalls gute inhibitorische Wirkung (< 5 nM) erreicht werden. Ein direkter Vergleich der IC₅₀-Werte und der Aktivitätsunterschiede von **37** (BS228) gegenüber **8** (AC220) ist in Tabelle 6 dargestellt.

Hervorzuheben ist, dass **37** (BS228) in allen untersuchten Zelllinien die inhibitorische Wirksamkeit von **8** (AC220) mindestens erreicht, bzw. z.T. eine signifikant bessere aufweist. Vor allem in der ITD-D835Y und der TKD-Mutation (D835Y) zeigt **37** (BS228) eine 7.6 fach (17.93 vs. 136.40 nM) bzw. 5.8 fach (1.14 vs. 6.56 nM) höhere inhibitorische Wirkung im Vergleich zu **8** (AC220).

37 (BS228) ist somit in der Lage, neben FLT3-WT (Tabelle 5) auch die durch die Therapie mit **8** (AC220) assoziierten Mutanten zu inhibieren (Tabelle 6). **37** (BS228) zeigt sogar eine vergleichbare Wirkung mit dem TKi **9** (Crenolanib) [72, 74]. In Bezug auf die Mutation in FLT3-TKD (D835Y) zeigt **37** (BS228) sogar eine höhere inhibitorische Wirkung als **9** (Crenolanib), **10** (G-749) oder **11** (TTT-3002) (vgl. **Tabelle S1** [72], **Tabelle 1** [79] im Anhang H S. 181). Die zusätzliche N676K Mutation reduziert die Empfindlichkeit der FLT3-ITD und D835Y, was auch bei **10** (G-749) beobachtet wurde. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass **37** (BS228) ein potenter Inhibitor gegenüber FLT3-ITD oder FLT3-TKD-Mutationen ist und zugleich kaum einen Aktivitätsverlust gegenüber sekundären FLT3-Mutationen aufweist.

1.1.4 Proliferationsassay in Zellen mit c-Kit Mutationen

Der Stammzellfaktor-Rezeptor KIT gehört ebenfalls zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen Klasse III – wie FLT3 und besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne. Durch Bindung seines Liganden, des Stammzellfaktors (SCF), kommt es zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase. Diese Bindung beeinflusst wiederum über verschiedene Signaltransduktionswege wie z. B. PI3K/AKT, JAK/STAT und RAS/RAF Prozesse wie Zellteilung, Apoptose und Differenzierung [189, 190]. Um die normale Hämatopoese nicht zu stark zu beeinflussen bzw. zu hemmen, soll eine gleichzeitige Inhibition von FLT3 und KIT vermieden werden. Zum Beispiel verursacht **8** (AC220) durch die starke Hemmung von FLT3 und c-KIT schwere Myelosuppressionen in Leukämiepatienten [72]. Aber auch TKi wie **3** (Sorafenib) oder der HDACi **168** (LBH-589) hemmen dual FLT3 und c-KIT [72].

Um eine gleichzeitige Inhibition von FLT3 und KIT auszuschließen, wurde **37** (BS228) in einem Proliferationsassay mit Zelllinien getestet, die eine cKIT-Mutation enthalten.

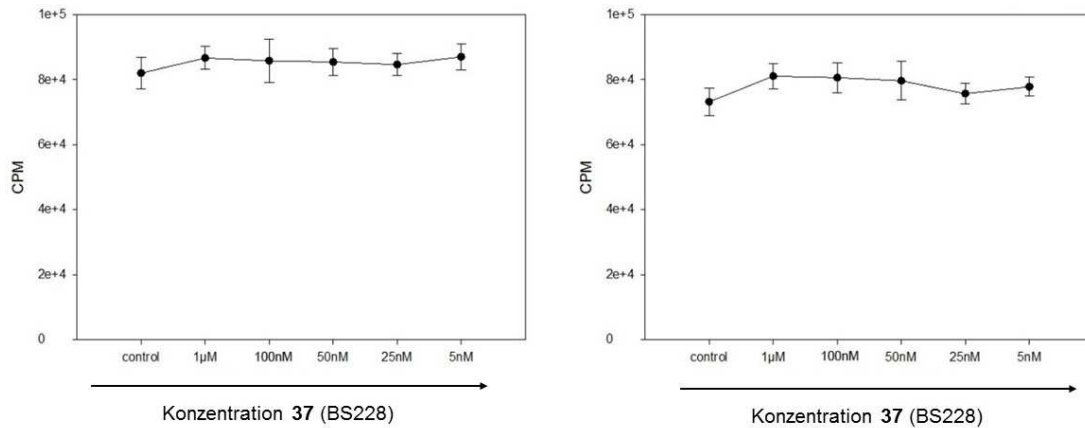


Abbildung 31. HMC1.1 (links) und HMC1.2-Zellen (rechts) wurden mit DMSO als Kontrolle oder dem Inhibitor **37** (BS228) 54 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit [³H] Thymidin (1 µCi) in 25 µl IMDM-Medium behandelt und weitere 18 h kultiviert. Die Radioaktivität konnte anschließend mittels eines β-Scintillations-Zählers (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) gemessen werden. Die Messungen wurden von Herrn Dr. Sebastian Drube am Institut für Immunologie am Uniklinikum in Jena durchgeführt (CPM = counts per million).

Die Proliferationsdaten der Zelllinien mit KIT-Mutationen wie HMC1.1, die die V560G c-KIT Mutante tragen, oder HMC1.2, die die Doppel-Mutation der Imatinib-insensitiven V560G/D816V-c-KIT Mutante aufweisen, zeigten, dass **37** (BS228) selbst bei einer Konzentration von 1 µM und 72 h keine Wachstumshemmung bewirkt (Abbildung 31).

Demgegenüber sind FLT3-ITD-abhängige MV4-11-Zellen bereits bei einer Behandlung von 10 nM **37** (BS228) nach 48 h zu über 40% tot (Abbildung 30). Daher könnte die normale Hämatopoese möglicherweise bei einer Verabreichung von **37** (BS228) – trotz einer gewünschten Eliminierung FLT3-ITD-positiver AML-Zellen – nicht zum Erliegen kommen. Die hohe Selektivität von **37** (BS228) gegenüber mutiertem FLT3 wird auch durch den später beschriebenen Kinobead-Versuch (Kapitel C. 1.1.7) untermauert.

1.1.5 Westernblot in MV4-11- Zellen

Um die gewünschte Hemmung der Aktivität von FLT3-ITD durch **37** (BS228) oder **8** (AC220) nachzuweisen, wurden Ganzzelllysate der FLT3-ITD exprimierenden MV4-11-Zellen über Immunoblot analysiert. Spezifische Antikörper ermöglichen den Nachweis von phosphoryliertem FLT3 und der phosphorylierten Form des FLT3-ITD Substrats, des sogenannten STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription-5; der bedeutendste nachgeschaltete Signaltransduktionsweg von FLT3-ITD) (Abbildung 32) [191, 192].

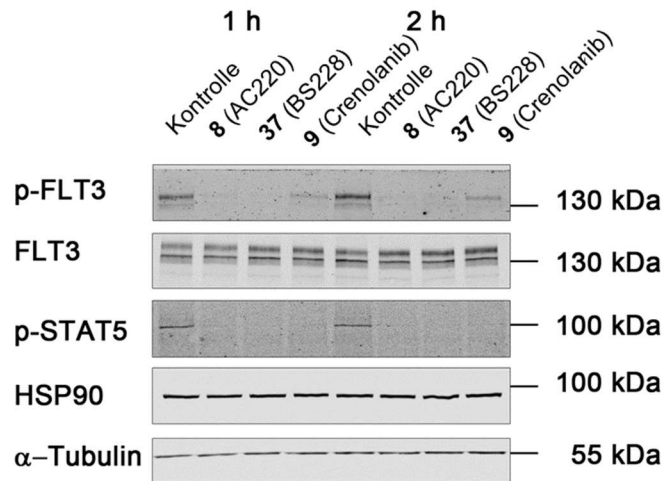


Abbildung 32. Die MV4-11-Zellen wurden mit jeweils 5 nM verschiedener FLT3i für 1 oder 2 h inkubiert. Danach folgte eine Lyse der Zellen, um Ganzzelllysate für eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot zu erhalten (N = 3). α -Tubulin und HSP90 dienten als Ladekontrolle. Der Westernblot wurde von Frau Mandy Bayer am Institut für Toxikologie am Uniklinikum in Mainz durchgeführt.

37 (BS228) und **8** (AC220) führten bereits ab einer Konzentration von 5 nM zu einer deutlichen Hemmung der Aktivität des Rezeptors nach nur 1 h Inkubationszeit, welche anhand der Reduktion der Phosphorylierung von FLT3-ITD (FLT3 \rightarrow pFLT3) nachgewiesen wurde. **9** (Crenolanib) zeigt bei einer solchen Konzentration (5 nM) hingegen noch ein Signal bei der Phosphorylierung von FLT3-ITD, was lediglich für eine Reduktion, aber nicht für eine Hemmung der Aktivität des Rezeptors spricht. Die nachgeschaltete, phosphorylierungsabhängige Aktivierung des STAT5-Proteins wurde in gleichem Maße für **37** (BS228), **8** (AC220) und **9** (Crenolanib) unterdrückt.

STAT5 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Krebszellen oft konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Dies führt zum Beispiel zu einer schlechten Kontrolle in der Aktivierung der Transkription der Gene, welche von STAT5 beeinflusst werden. Der PI3K/AKT-Signalweg ist an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt, z. B. am Zellzyklus, und ist daher häufig ein in humanen Tumoren aberrant regulierter Signalweg [193].

1.1.6 Proliferationsassay zur Spezifitätskontrolle

1.1.6.1. Lervektor-exprimierende Ba/F3-Zellen

Als Kontrolle wurden Interleukin-3 (IL-3) stimulierte Ba/F3-Zellen mit **37** (BS228) behandelt, welche mit dem Leervektor MIY transduziert sind. Dabei wurden sowohl **8** (AC220) als auch **37** (BS228) in aufsteigenden Konzentrationen (5-100 nM) in Gegenwart von 10 ng/ml IL-3

inkubiert. IL-3 ist für das Überleben dieser nicht mit einem Onkogen transformierten Zellen essentiell.

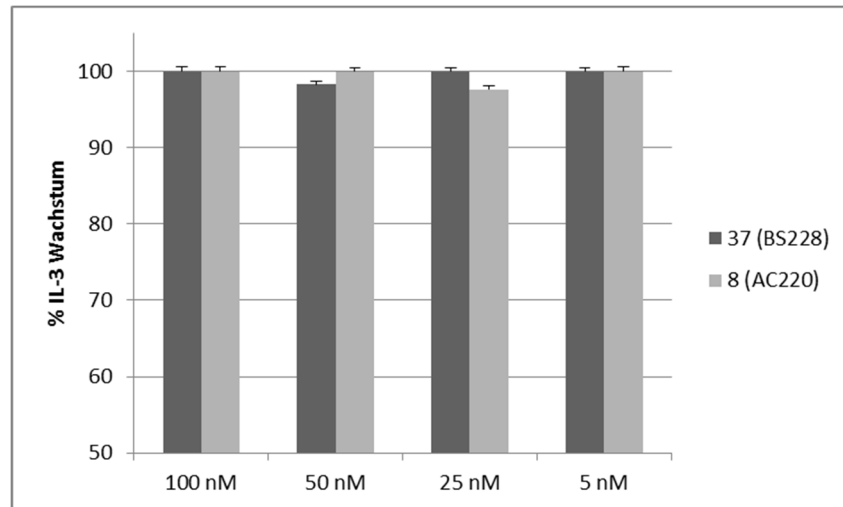


Abbildung 33. Darstellung des Proliferationsassay in Ba/F3-Zellen mit MIY. Die Zellen wurden 72 h mit den entsprechenden Konzentrationen von **37** (BS228) und **8** (AC220) behandelt und mit 10 ng/ml IL-3 stimuliert (N = 3). Ebenfalls wurde nach 72 h die Zahl der lebenden Zellen (Zellen pro ml) bestimmt und ins Verhältnis gesetzt, diesmal aber zu der Kontrolle mit ausschließlich IL-3.

Durch die Zugabe des Wachstumsfaktors IL-3 konnte nachgewiesen werden, dass weder **37** (BS228) noch **8** (AC220) eine toxische Wirkung in den behandelten Ba/F3-Zellen zeigt. Durch die Zugabe von IL-3 konnten die Zellen unbeeinflusst von **37** (BS228) und **8** (AC220) weiter proliferieren. Würden **37** (BS228) oder **8** (AC220) toxisch wirken, wäre die Proliferation trotz der Zugabe von Interleukin-3 gehemmt worden. Da es bis 100 nM zu keiner solchen Inhibierung der Proliferation gekommen ist, wirken sowohl **37** (BS228) als auch **8** (AC220) weder in der murinen Zelllinie Ba/F3 toxisch, noch hemmen sie den Interleukin-3 Signalweg.

1.1.6.2. BCR-Abl-exprimierende Ba/F3-Zellen

Als eine weitere Spezifitätskontrolle der Substanz **37** (BS228) diente der Proliferationsassay in BCR-Abl-Zellen (verantwortliches Fusionsgen bei der Erkrankung an chronischer myeloischer Leukämie (CML)). Dabei wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von **37** (BS228) und **8** (AC220) (5-100 nM) und mit dem BCR-Abl Inhibitor Imatinib behandelt. Imatinib diente als Positivkontrolle und wurde in den Konzentrationen von 100-800 nM eingesetzt. Nach 72 h wurde die Zahl der viablen Zellen bestimmt und ins Verhältnis zur Leerkontrolle gesetzt (Abbildung 34). Das für die Proliferation vermittelnde Onkogen BCR-Abl wurde dabei weder von **37** (BS228) noch von **8** (AC220) gehemmt. Imatinib hingegen hemmte die Proliferation in den BCR-Abl Zellen. **37** (BS228) scheint daher eine

gewisse Selektivität in Bezug auf seine inhibitorische Wirkung aufzuweisen, da es hier zu keiner Blastenkrise (übermäßige Proliferation unreifzelliger Blutzellen) wie z. B. bei CML (BCR-Abl) kommt.

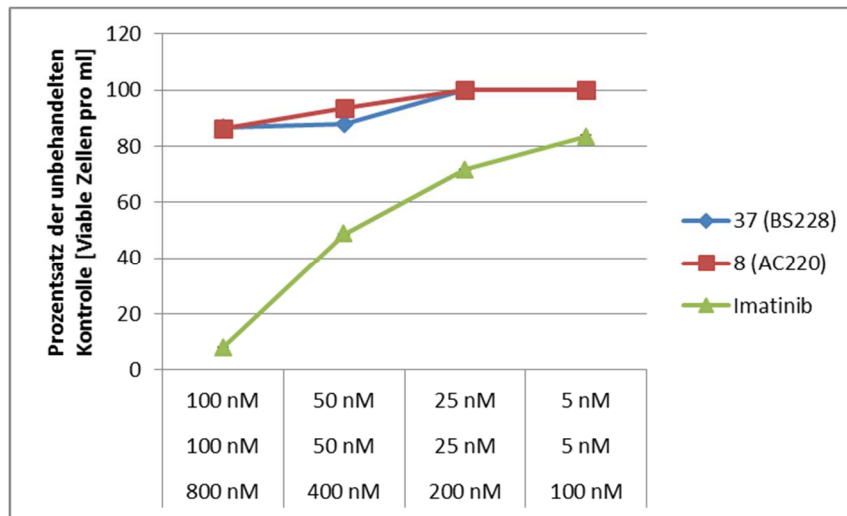


Abbildung 34. BCR-Abl exprimierende Ba/F3Zellen wurden 72 h mit den angegebenen Konzentrationen von **37** (BS228) bzw. **8** (AC220) und zusätzlich mit Imatinib (BCR-Abl Inhibitor) behandelt (N = 3).

1.1.7 Kinobead-Versuch

Nahezu ein Viertel aller Kinasen sind an der Onkogenese beteiligt. Es ist daher das Ziel, neue selektive Wirkstoffe gegen Onkogene zu entwickeln. Die Entwicklung neuer Antitumorwirkstoffe, die die hoch konservierte ATP-Bindungstasche besetzen, kann sowohl Multikinaseinhibitoren als auch selektive Hemmstoffe für eine bestimmte Kinase zum Ziel haben [194]. Die Ergebnisse können dazu beitragen, die Wirkungsweisen einer Verbindung aufzuklären sowie mögliche Nebenwirkungen vorherzusagen.

Mit Hilfe von sogenannten Kinobeads™ kann eine solche potentielle Verbindung gleichzeitig auf ihre Wirksamkeit an mehreren Kinasen (bis zu 250) getestet werden.

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden von der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Küster an der TUM in Freising durchgeführt.

Das Prinzip des Versuches basiert darauf, fünf unselektive Kinase-Inhibitoren, die an Sepharose Partikel (Beads) gekoppelt sind, reversibel in der ATP-Tasche der Kinasen zu binden. Man kann dadurch eine Anreicherung an Kinasen zunächst an den Kinobeads bzw. nach Abspaltung von diesen im untersuchten Lysat erreichen.

Die Beads werden gewaschen, und die gebundenen Kinasen können von den Beads eluiert werden. Nach Denaturierung der eluierten Proteine können diese anschließend im SDS-PAGE Gel fixiert werden. Die fixierten Proteine können dann mittels Trypsin „verdaut“, und das erhaltene Peptidgemisch über LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) analysiert werden (Abbildung 35). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Signalintensität proportional zur vorhandenen Menge von Kinase-Protein ist.

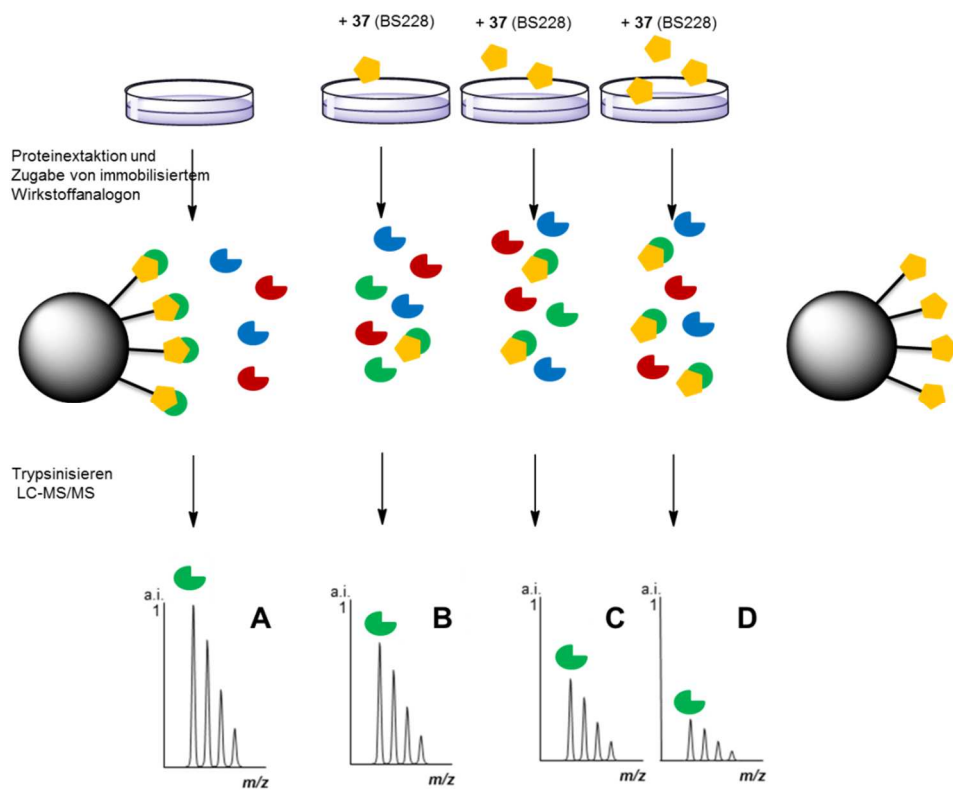


Abbildung 35. Versuchsprinzip eines Kinobead Assay in Anlehnung an Medard *et al.* [194].

Für die Konkurrenz mit dem Wirkstoff, hier **37** (BS228), war eine Vorinkubation notwendig. Dazu wurde die Substanz in verschiedenen Konzentrationen zum jeweils gleichen Mengenverhältnis Protein/Lysat gegeben, um eine Endkonzentrationen von 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 und 30000 nM zu erhalten. Durch die Vorinkubation hat **37** (BS228) die Möglichkeit, zuerst (in Konkurrenz zu den Beads) in die ATP-Tasche der Kinasen zu binden und so die Bindung an die Beads zu verhindern.

Je mehr Wirkstoff dann in der Probe enthalten ist, umso weniger der jeweiligen Kinase bindet an die Beads, sodass nach Auswaschen und Freisetzung von den Beads die Signalintensität für dieses Peptid/Protein sinkt (**B-D**).

Zuerst wurde ein Experiment (Tabelle 7) mit einem Zellmix aus vier verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dieser besteht aus einer 1:1:1:1 Mischung aus K562 (CML)-, Colo205 (humanes Kolon-Adenokarzinom)-, MV4-11 (AML)- und SKNBE2 (humanes Neuroblastom)-

Lysaten. Der Vorteil dieser Methode ist der, dass das Repertoire an Kinasen (249) und aktiven Kinasen wesentlich größer ist als bei einer einzelnen Zelllinie.

Kinase	ED ₅₀ [nM]	Kinase	ED ₅₀ [nM]
RET	292	DDR2	2310
SEC11A	1023	EPHA7	3386
FLT3	481	CDK16	4820
DDR1	1393	HNRNPD	5196
ZAK/MLTK	1180	SMC4	6057
CDK15	446	FSCN1	11876

Tabelle 7. ED₅₀-Werte aus dem Kinobeadversuch 1.

Aus Tabelle 7 kann man entnehmen, dass neben FLT3 lediglich RET und ZAK/MLTK als potentielle Targets (Kinasen) in Frage kommen. RET kann hierbei vernachlässigt werden, da diese Kinase hauptsächlich in der Embryonalentwicklung für die Differenzierung von Neuronen im autonomen Nervensystem verantwortlich ist und im erwachsenen Organismus keine Funktion mehr hat [195]. ZAK hingegen gehört zur Familie der MAP-Kinasen (mitogen-activated protein Kinase-Weg) und spielt dabei auch eine Rolle in der Regulierung des Zellzyklus [196]. Die experimentellen Ergebnisse für CDK15 und SEC11A konnten aufgrund von relativ schwachen MS Signalen nicht eindeutig verifiziert werden und sollten nicht zu streng bewertet werden. Die weiteren 237 in diesem Experiment untersuchten Kinasen wurden lediglich in sehr hohen Konzentrationen angesprochen, welche *in vivo* nicht erreicht werden können.

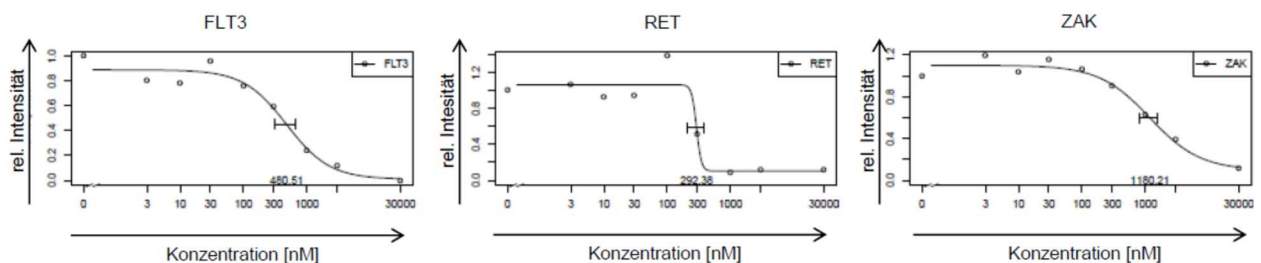


Abbildung 36. Darstellung der Wirkung an den „potentiellen“ Targets. Verhältnis der Konzentration von **37** (BS228) zur relativen Intensität. Zusätzliche Kinasen, die erst in hohen Wirkstoffkonzentrationen bzw. nicht inhibiert wurden, sind im Anhang H S. 180 dargestellt.

Das zweite Kinobead Experiment (Tabelle 8) wurde dann ausschließlich mit FLT3-ITD positiven Zelllysaten von MV4-11-Zellen (200 Kinasen) durchgeführt. Dies sollte zur Prüfung der Selektivität von **37** (BS228) bezüglich der einzelnen Kinasen dienen.

Kinase	CDK16	FLT3	MAP4K4	ZAK/MLTK	NQO2
ED ₅₀ [nM]	126	92	2075	394	704

Tabelle 8. ED₅₀-Werte aus dem Kinobead Versuch 2.

37 (BS228) hemmt die FLT3-Kinase und weist einen K_d Wert von 24 nM auf. Im Vergleich erreichten **8** (AC220) einen K_d Wert von 34 nM und **9** (Crenolanib) sogar einen K_d Wert von 8 nM. Jedoch ist **9** (Crenolanib) im Vergleich zu **8** (AC220) und **37** (BS228) unselektiv und spricht gleichzeitig über 30 Kinasen an.⁵

Erst bei höheren Dosen werden auch ZAK, CDK16 und NQO2 (eine Oxidoreduktase) inhibiert (Tabelle 8). NQO2 ist unter anderem sowohl an der Metabolisierung von Vitamin K beteiligt, als auch an der Stabilisierung des Apoptose-Regulators p53 [197]. CDK16 (*engl.* cyclin dependent kinase) gehört zur Familie der Serin/Theronin-Kinasen und spielt z. B. eine Rolle im Signaltransduktionsweg bei der Zelldifferenzierung oder in der Exozytose [198].

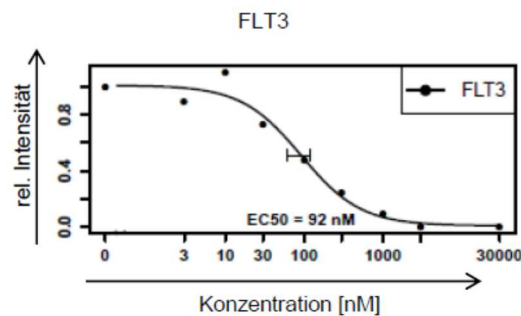


Abbildung 37. Darstellung des FLT3-Targets aus dem Kinobead Versuch 2. Relative Intensität im Verhältnis zur Konzentration von **37** (BS228).

Durch diese beiden Kinobead Versuche konnte die Selektivität und Spezifität von **37** (BS228) bestätigt werden. Aus den Tabellen 7 und 8 geht hervor, dass **37** (BS228) neben FLT3 lediglich CDK16, RET, ZAK und in höheren Dosen NQO2 als potentielle Targets anspricht. RET kann hier vernachlässigt werden, da die Kinase lediglich in der Embryonalentwicklung aktiv ist. Die übrigen Kinasen werden erst in hohen bis sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen angesprochen, welche *in vivo* ohnehin nicht erreicht werden können. Eine Übersicht über sämtliche humanen Kinasen ist in Abbildung 38 dargestellt.

⁵ Die K_d Werte von **8** (AC220) und **9** (Crenolanib) wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Küster zur Verfügung gestellt.

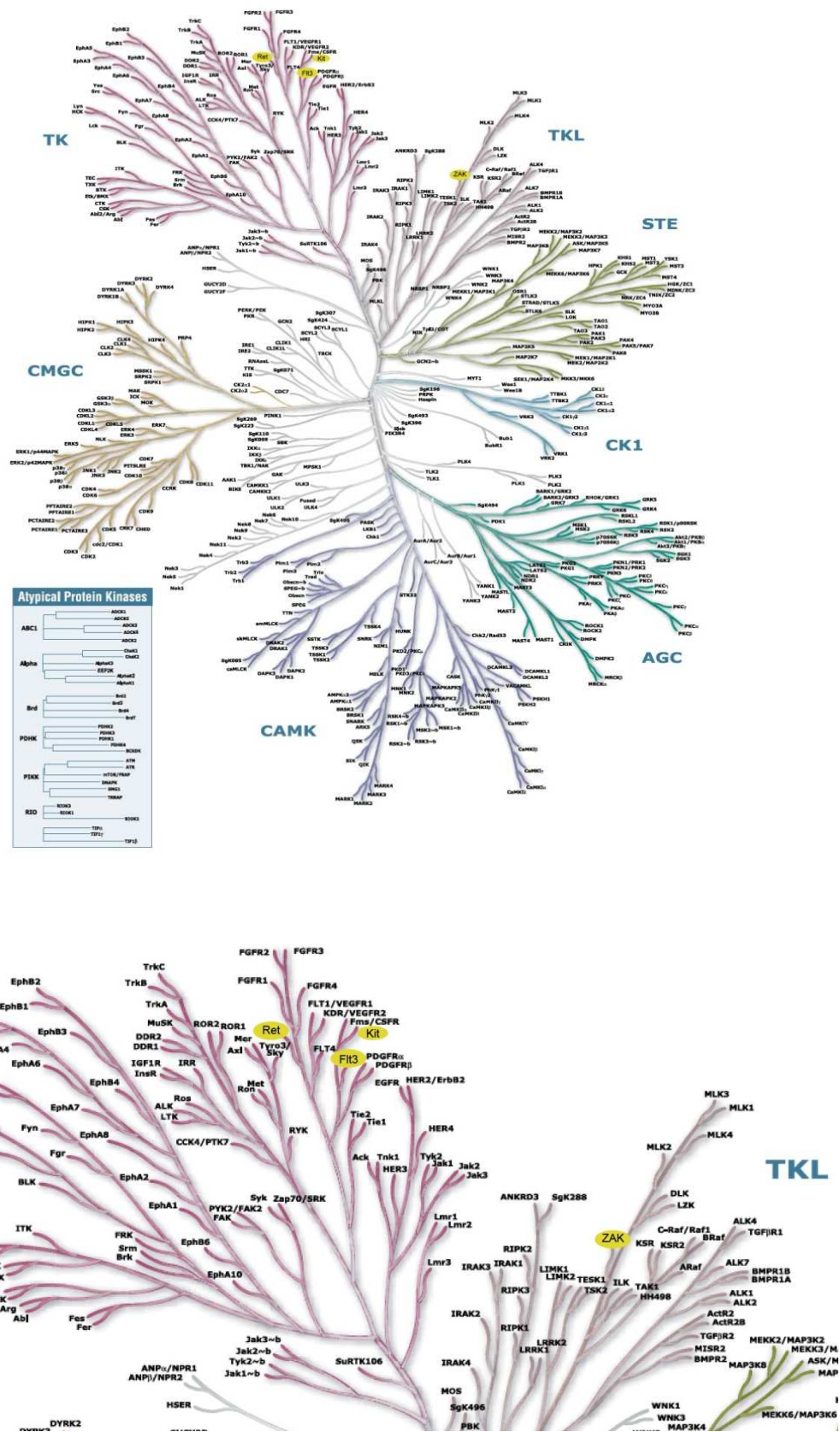


Abbildung 38. Kinom-Stammbaum (Abbildung von Cell Signaling Technology: www.cellsignal.com). Die gelb hinterlegten Kinasen zeigen die möglichen angesprochenen „Targets“.

1.1.8 Löslichkeitsuntersuchungen von 37 (BS228)

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Wirkstoffe sind leider in Wasser schwer löslich. Aufgrund dessen ist von einer schlechten Bioverfügbarkeit *in vivo* auszugehen. Captisol® (Abbildung 39), ein bekannter Lösungsvermittler, kann die Löslichkeit von Wirkstoffen verbessern und somit eine optimierte Formulierung ermöglichen. Captisol® ist ein β -Cyclodextrin Derivat mit polaren Sulfonatgruppen, die durch Spacer Gruppen von der hydrophoben Kavität getrennt sind [199].

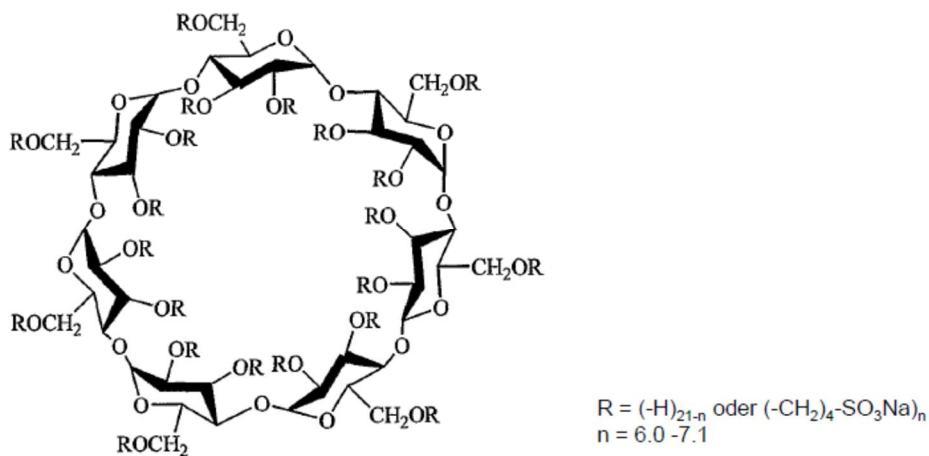


Abbildung 39. Chemische Struktur von Captisol® [199].

Um die Wasserlöslichkeit von **37** (BS228) zu steigern, wurde in der Folge eine mögliche Löslichkeitsverbesserung durch Captisol® untersucht.

Dazu wurde von der Stammlösung von **37** (BS228) (in 10%iger (v/v) Methanol/Wasser Lösung (5.363×10^{-7} mol/l)) ein UV-Absorptions-Spektrum (Abbildung 40) vermessen. Aus diesem konnte zunächst das Absorptionsmaximum bei 369 nm bestimmt werden. Bei dieser Wellenlänge wurde durch eine Verdünnungsreihe eine Eichgerade (jeweils Dreifachbestimmung) erstellt.

Um sicherzustellen, dass bei dieser Wellenlänge keine Verfälschung des Messergebnisses durch Solvatochromie-Effekte stattfindet, wurde ferner ein Spektrum des Wirkstoffs in wässriger Captisol® Lösung als Vergleich zur Messreihe in Methanol/Wasser bestimmt.

Captisol® selbst sowie die verwendeten Solventien zeigen bei der Messwellenlänge keine nennenswerte Absorption (Blindkontrolle).

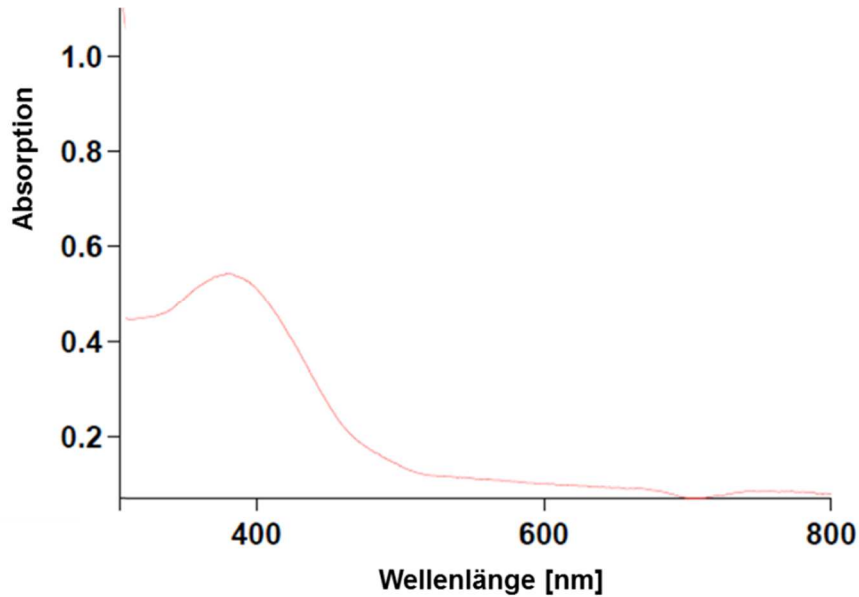


Abbildung 40. Absorptionsspektrum von **37** (BS228) in 10%iger (v/v) Methanol/Wasser Lösung ($5,363 \times 10^{-7}$ mol/l).

Trägt man die Captisol[®]-Konzentration gegen die Löslichkeit von **37** (BS228) auf, erhält man die in Abbildung 41 dargestellte (Eich)Gerade. Mithilfe von Captisol[®] ist eine deutliche Zunahme der Löslichkeit von **37** (BS228) zu beobachten. In reinem Wasser ist die Löslichkeit von **37** (BS228) $< 0,13$ mg/ml, während mit dem Lösungsvermittler Captisol[®] die Löslichkeit von **37** (BS228) in einer 40%igen Captisol[®] Lösung auf 25,76 mg/ml erhöht werden kann.

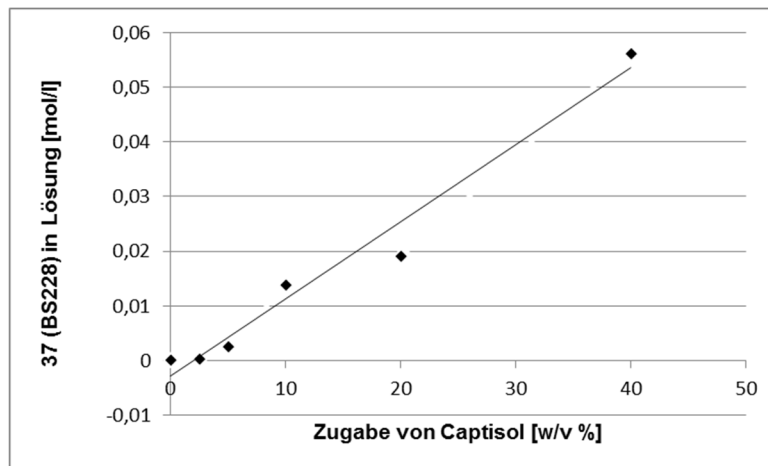


Abbildung 41. Darstellung des Löslichkeitsverhaltens von **37** (BS228) bei steigender Menge an Captisol[®].

1.2 Potentielle irreversible Inhibitoren

Trotz bemerkenswerter Fortschritte im Verständnis der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie (AML) sind Cytarabin und Anthrazykline nach wie vor die Grundpfeiler der Chemotherapie. Allerdings ist ihre Effektivität aufgrund der auftretenden Resistenzen limitiert, und die große Rückfallquote ist ein weiteres Indiz für den begrenzten Erfolg dieser Therapie. Um neue Strategien zu entwickeln, wurde der Fokus nun auf irreversible Kinaseinhibitoren gelegt. Diese sollen das Problem der sekundären Wirkstoff-Resistenz umgehen [200], indem sie irreversibel an die ATP-Tasche binden und somit die Funktion der Kinase an dieser Stelle blockieren [201]. Die damit einhergehenden nachgeschalteten Signale der Kinase werden somit herunterreguliert. Die in Kapitel A. 2.5. synthetisierten potentiellen irreversiblen Inhibitoren wurden in einem Proliferationsassay mit MV4-11-Zellen getestet. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

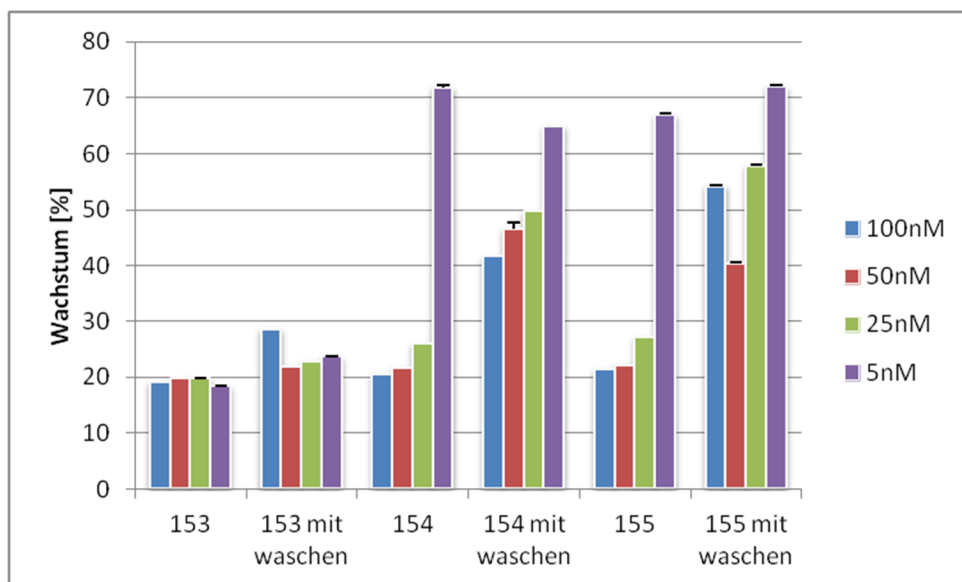


Abbildung 42. Ein Set an MV4-11-Zellen wurde mit den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen 72 h inkubiert. Ein zweites Set wurde nach 3 h mit PBS gewaschen und anschließend ebenfalls 72 h inkubiert. In den Proben wurden die Zellzahlen mittels Trypanblaufärbung bestimmt und mit der jeweiligen Kontrolle (100%-Wert) ins Verhältnis gesetzt (N = 3).

Im ersten Versuchsteil wurden bei den Proben keine Waschungen durchgeführt und die Zellen direkt mit den Hemmstoffen 72 h kultiviert. Im zweiten Versuchsteil hingegen wurden die MV4-11-Zellen mit den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen für 3 h behandelt, um eine mögliche Inhibition der Kinase zu ermöglichen. Danach wurden die Verbindungen dreimal mit PBS Puffer ausgewaschen und die Zellen 72 h mit frischem Medium weiter kultiviert.

Verb.	IC ₅₀ [nM]
153	< 5
154	10.50 ± 0.691
155	9.64 ± 0.694

Tabelle 9. MV4-11-Zellen wurden mit den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen 72 h inkubiert, die Zellzahl mittels Vi-Cell bestimmt und mit der Kontrolle (100%) verglichen. Die IC₅₀-Werte konnten anschließend mit Hilfe von GraphPad berechnet werden.

In dem Probenet, in dem keine Waschungen durchgeführt wurden, sieht man die erwartete Inhibition (Abbildung 42). Die dazu berechneten IC₅₀-Werte können aus Tabelle 9 entnommen werden. Lediglich **153** zeigte sehr gute inhibitorische Wirksamkeit gegenüber der FLT3-Rezeptorkinase. In den gewaschenen Zellen ist nur bei Verbindung **153** auch nach Entfernung des Inhibitors aus dem Medium durch Auswaschen eine verbleibende Hemmung messbar. Dies spricht für eine potentielle irreversible Wirkung der Verbindung **153**. Der korrekte IC₅₀ Wert konnte nicht exakt ermittelt werden.

1.3 Chimäre Inhibitoren (HDAC und FLT3)

Aktivierende Mutationen der Tyrosinkinase-FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) sind kausal mit der Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (AML) assoziiert. Als neue gezielte Behandlungsprinzipien für die AML werden derzeit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKi) gegen pathologisch überaktiviertes FLT3 und Inhibitoren für Histon-Deacetylasen (HDACi) erprobt. Die Kombination beider Wirkprinzipien, also Hemmung des fehlregulierten Enzyms und Modulation der von HDACs bestimmten Chromatinstruktur und Transkription, erscheint ebenfalls vielversprechend zu sein (vgl. Kapitel B.1.6.3). Die in Kapitel Chemischer Teil II synthetisierten Verbindungen stellen solche Hybride mit FLT3i und HDACi Aktivität dar und wurden mit den oben genannten Methoden auf ihre Wirksamkeit getestet.

1.3.1 Apoptoseinduktion der chimären HDAC/FLT3-Inhibitoren

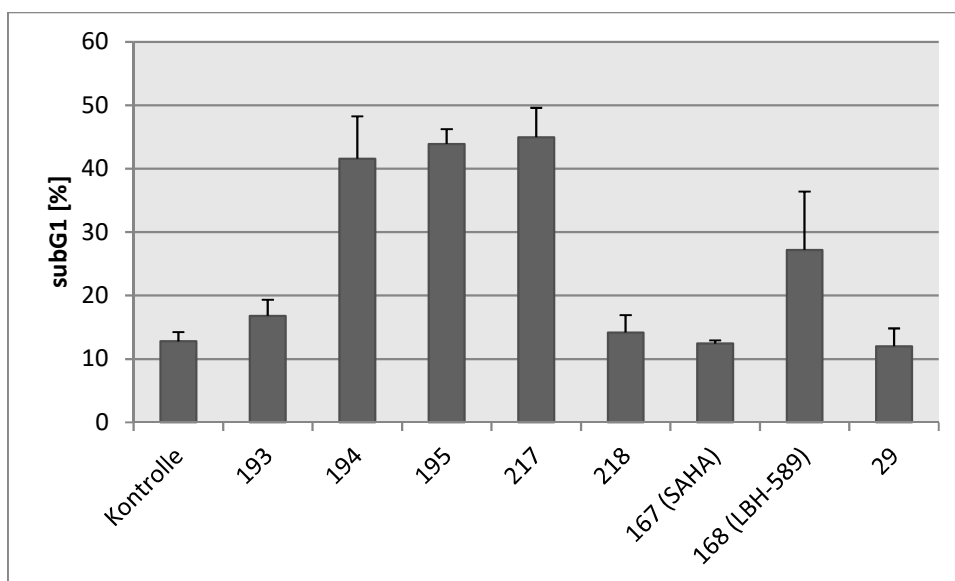


Abbildung 43. MV4-11-Zellen wurden 48 h mit 10 nM Wirkstoff inkubiert und danach mit Durchflusszytometrie analysiert. Die Apoptoserate wurde als Prozentwert der Kontrolle berechnet (N = 2).

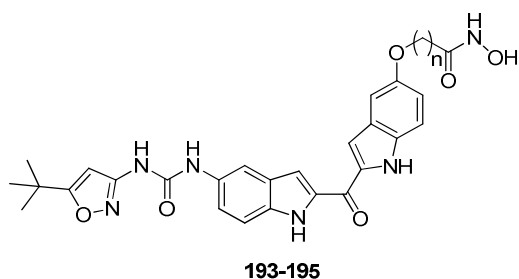
Die chimären Verbindungen wurden mittels Durchflusszytometrie auf Induktion der Apoptose, gemessen als subG1 Population in Zellzyklusanalysen, untersucht. Verglichen wurden die Substanzen mit den HDACi's **167** (SAHA) und **168** (LBH-589), HDACi's der Hydroxamat-Familie und der Referenzverbindung **29** (Abbildung 43).

194 und **195** zeigen eine potentere Wirkung in der Auslösung der Apoptose mit ca. 40% von FLT3-ITD exprimierenden humanen AML-Zellen, als die in der Verbindung kombinierten „Parentalverbindungen“ (**167** (SAHA) zu **193**, **194** und **195**). **167** (SAHA) zeigt nach 48 h

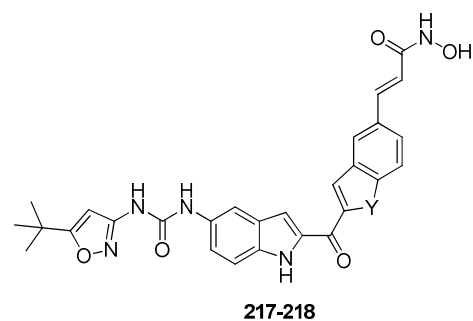
lediglich eine Apoptoserate von ca. 10% (Abbildung 43) und **29** 12%. Auch die Verbindung **213** zeigt eine Apoptoseinduktion von ca. 43%, während die entsprechenden Parentalverbindungen **168** (LBH-589) eine Apoptoserate von ca. 27% (**168**) und 12% (**29**) aufweisen. **193** und **218** dagegen zeigen mit ca. 12-15% kaum apoptotische Eigenschaften. Das Prinzip einer synergistischen Wirkung von HDACi und FLT3i scheint jedoch in den chimären Verbindungen **194**, **195** und **217** verwirklicht worden zu sein. Die Verbindungen **196** und **225** wurden in diesem Assay nicht untersucht.

1.3.2 Einfluss der chimären HDAC/FLT3-Inhibitoren auf die Proliferation von AML-Zellen

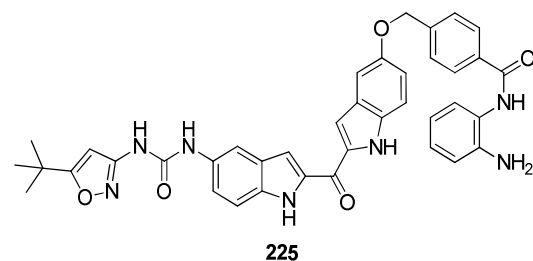
Mit den synthetisierten Hybrid-Molekülen wurde ebenfalls ein Proliferationsassay in der humanen AML-Zelllinie (MV4-11) durchgeführt. In Tabelle 10 sind die daraus resultierenden IC_{50} -Werte (mit der Software Prism Graphpad berechnet) aufgelistet.



Verbindung	n	IC_{50} [nM]
193	4	2.39 ± 0.549
194	6	0.18 ± 0.504
195	5	2.08 ± 0.381



Verbindung	Y	IC_{50} [nM]
217	O	1.47 ± 0.568
218	NH	0.75 ± 0.520
225	-	50.03 ± 0.871



Referenzverb.		IC_{50} [nM]
29	-	1.71 ± 0.412
167 (SAHA)	-	> 100
168 (LBH-589)	-	4.78 ± 0.236

Tabelle 10. Inhibition des FLT3-Tyrosinkinase Rezeptors durch chimäre Verbindungen im MV4-11 Proliferationsassay (N = 3). Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mittels Prism Graphpad.

Die Verbindungen **193**, **194** und **195** besitzen alle den gleichen Grundkörper und unterscheiden sich lediglich in der Länge ihres Spacers (Alkylkette). Verbindung **194** besitzt

die gleiche Kettenlänge wie die Parentalverbindung **167** (SAHA), **195** weist eine und **193** zwei CH₂-Einheiten weniger auf. Vergleicht man diese drei Verbindungen untereinander, zeigt **194** mit einem IC₅₀-Wert von 0.18 nM die stärkste inhibitorische Wirkung bezüglich des FLT3-Rezeptors, während **193**, die Verbindung mit der kürzesten Kette, die schwächste inhibitorische Wirkung aufweist. Basierend auf diesen Ergebnissen, scheint die Länge der Seitenkette von **167** (SAHA) einen erheblichen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität zu besitzen. Jedoch zeigen alle drei Verbindungen im Vergleich zu **167** (SAHA) einen deutlich größeren inhibitorischen Effekt, während im Vergleich zu **29** lediglich **194** eine stärkere inhibitorische Wirksamkeit aufweist.

Die Verbindungen **217** und **218** weisen beide das Strukturelement von **168** (LBH-589) auf. Zusätzlich wurde bei **217** eines der beiden Indole des Bisindol-Grundgerüsts gegen Benzofuran substituiert. Das bewirkte bei den TKi (Abschnitt C.1.1.2.) eine erhebliche Steigerung der inhibitorischen Wirkung. Dies führte bei **217** jedoch zu keiner Wirkungssteigerung. Im Gegenteil: die chimäre Verbindung **218** zeigt bezüglich der inhibitorischen Wirkung sogar einen deutlich niedrigeren IC₅₀-Wert. Im Vergleich zu ihrer Parentalverbindung **168** (LBH-589) zeigen jedoch beide einen höheren inhibitorischen Effekt, und im Vergleich zu **29** weisen sie ebenfalls eine gleiche bis stärkere inhibitorische Wirksamkeit auf.

225 wurde mit dem Strukturmerkmal von **169** (MS-275) modifiziert und zeigt einen IC₅₀-Wert von 50.03 nM. Dieser inhibitorische Effekt ist im Vergleich mit anderen chimären Verbindungen (vgl. **194** und **218**) deutlich schwächer, sodass die Verbindung **225** hierin nicht weiter verfolgt wurde.

1.3.3 Westernblot und Durchflußzytometrische Untersuchungen

Im Folgenden wurde sowohl eine chimäre Verbindung der „Klasse“ der Hydroxamsäuren mit einem Anteil von **167** (SAHA), als auch einem Anteil von **168** (LBH-589) im Westernblot näher analysiert. Bei den mit einem Strukturmerkmal von SAHA modifizierten Verbindungen wurde die Verbindung **194** weiter analysiert, während von den LBH-Derivaten die Verbindung **217**, weiter untersucht wurde.

1.3.3.1 Analyse der hemmenden Wirkung von Verbindung **194** über Westernblot in MV4-11 und Apoptoseinduktion

Die Verbindung **194** zeigt in Abbildung 44 eine deutliche Hemmung der Aktivität des FLT3 Rezeptors. Die Reduktion der Phosphorylierung (pFLT3) setzt bereits bei einer Konzentration von 1 nM ein. In Abbildung 45 zeigt die Hybridverbindung **194** hingegen verstärkte Acetyl-Histonsignale (AcH3) bei einer Konzentration ab 3 μ M. Eine Hemmung dieser Histonsignale spricht für eine HDAC Inhibition. Als Kontrolle wurde der HDAC Inhibitor **166** (TSA) mit einer Konzentration von 0.1 μ M aufgetragen.

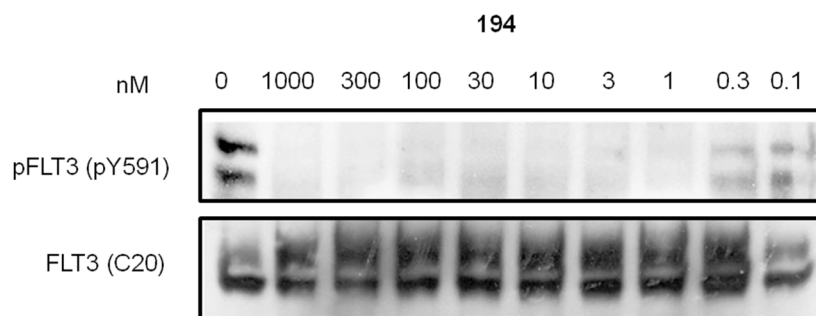


Abbildung 44. Hemmung der FLT3-Tyrosinkinase durch **194** in MV4-11-Zellen. Dabei wurden die Zellen 3 h mit den angegebenen Konzentrationen von **194** behandelt. Die Autophosphorylierung des Rezeptors wurde durch Immunoblot mit einem spezifischen pFLT3 Antikörper analysiert, als Ladekontrolle diente FLT3-C20. Der Westernblot wurde von Mitarbeitern am CBI der Friedrich-Schiller Universität in Jena durchgeführt.

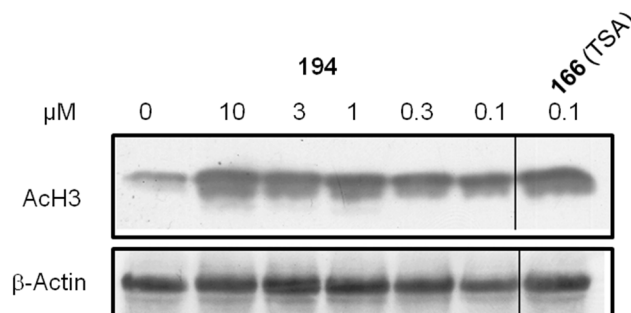


Abbildung 45. Hemmung der Histondeacetylasen durch **194** in MV4-11-Zellen. Die AML-Zellen, die endogenes FLT3-ITD exprimieren, wurden 6 h mit den angegebenen Konzentrationen von **194** bzw. mit 0.1 μ M **166** (TSA) als Positivkontrolle behandelt. Zellextrakte wurden dann durch Immunoblotting mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 sowie β -Aktin (Ladekontrolle) analysiert. Der Westernblot wurde von Mitarbeitern am CBI der Friedrich-Schiller Universität in Jena durchgeführt.

Abbildung 44 und 45 zeigen deutlich, dass die Hybridverbindung **194** sowohl die Autophosphorylierung von FLT3-ITD in geringen subnanomolaren Konzentrationen hemmt, als auch die Hyperacetylierung des Histons H3 auslöst. Diese experimentellen Ergebnisse dienen als Beweis der dualen Aktivität der neu generierten Hybridmoleküle.

Die Hybridverbindung **194** wurde außerdem einer durchflusszytometrischen Analyse im Vergleich zu den Parentalverbindungen **167** (SAHA) und **29** unterzogen (Abbildung 46). Es konnte gezeigt werden, dass **194** im Vergleich zu seinen beiden Einzelkomponenten **167** (SAHA) und **29** eine potentere Wirkung bei der Induktion der Apoptose in FLT3-ITD exprimierenden humanen Zellen aufweist (Abbildung 46). Das ist ein weiterer Anhaltspunkt für die synergistische Wirkung von FLT3 und HDAC in **194**.

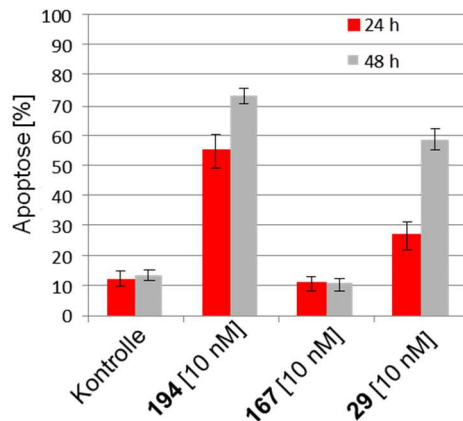


Abbildung 46. Apoptose-Induktion in FLT3-ITD exprimierenden Zellen durch die chimäre FLT3i-HDACi Verbindung **194**. MV4-11-Zellen wurden in den angegebenen Konzentrationen mit **194** oder den Parentalverbindungen **167** (SAHA; einem reinen HDACi) oder **29** (einem reinen FLT3i) für 24 h (rot) oder 48 h (grau) behandelt. Anschließend wurde die Fraktion apoptotischer Zellen (SubG₁-Fraktion) bestimmt. Die Apoptose-Induktion wurde von Mitarbeitern am CBI der Friedrich-Schiller Universität in Jena durchgeführt.

1.3.3.2 Analyse der hemmenden Wirkung von Verbindung **217** über Westernblot in MV4-11

Abbildung 47 zeigt die Hemmung der Autophosphorylierung von FLT3-ITD in humanen intakten MV4-11-Zellen durch die Hybridverbindung **217**. **217** hemmt bis 3 nM nahezu vollständig die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors. DMSO dient als Positivkontrolle.

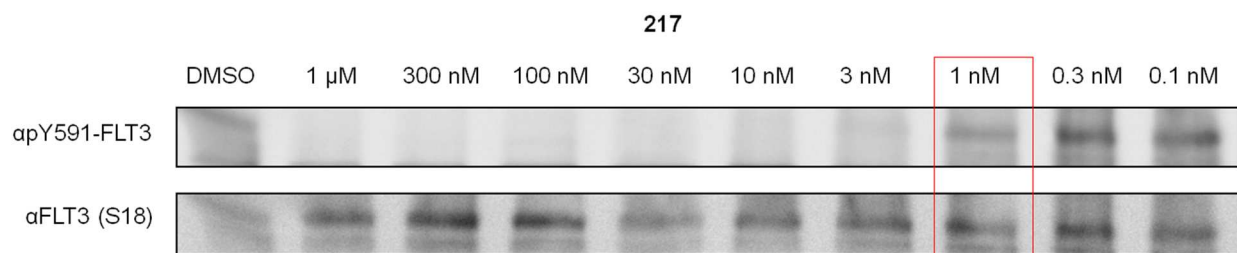


Abbildung 47. Die MV4-11-Zellen wurden 2 h mit **217** behandelt. Die Lysate wurden dann durch Immunoblotting mit Antikörpern gegen pFLT3 und FLT3-Fik2 analysiert.

Die Hybridverbindung **217** zeigt in Abbildung 48 die Hyperacetylierung des Histons H3 bei einer Konzentration von 100 nM. Das spricht für eine HDAC Inhibition. Als Kontrolle diente der HDACi **166** (TSA).

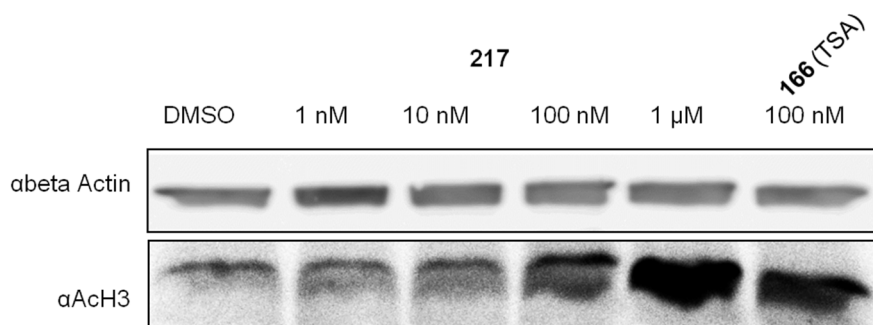


Abbildung 48. Die MV4-11-Zellen wurden 6 h mit der Konzentrationsreihe von **217** und 100 nM **166** (TSA) als Positivkontrolle behandelt. Die gewonnenen Zellextrakte wurden dann durch Immunoblotting mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 sowie β -Aktin (Ladekontrolle) analysiert.

Die beiden Westernblots in Abbildungen 47 und 48 zeigen die gewünschte duale Aktivität der chimären Verbindung **217**. Die Hemmung der Histondeacetylase ist jedoch schwächer als die Hemmung der Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei der Hybridverbindung **194** beobachtet (Abbildung 45).

1.3.4 Proliferationsassay in FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen

Die in Kapitel Chemischer Teil II synthetisierten chimären Verbindungen **217**, **218**, **194** und **195**, die sowohl sehr wirksame FLT3-Inhibitoren sind, als auch Histondeacetylase Inhibitoraktivität aufweisen, wurden außerdem in den durch **8** (AC220) verursachten resistenten Mutanten von FLT3 getestet (Tabelle 11). Dazu wurden wie in Abschnitt C.1.1.2 murine Ba/F3-Zellen, welche mit FLT3, FLT3 ITD und TKD (D835Y) und Mutanten, die in der ATP-Bindungsstelle (N676K) mutiert wurden, verwendet. Die berechneten IC_{50} -Werte können für die chimären Verbindungen aus Tabelle 11 und für die Parentalverbindungen aus Tabelle 12 entnommen werden.

Ba/F3-Zellen	217 IC ₅₀ [nM]	218 IC ₅₀ [nM]	194 IC ₅₀ [nM]	195 IC ₅₀ [nM]
D385Y	> 100	18.82 ± 0.297	10.91 ± 0.706	> 100
D835Y-N676K	> 100	> 100	> 100	> 100
ITD	26.13 ± 0.962	21.83 ± 0.980	15.33 ± 0.817	11.19 ± 0.923
ITD-D835Y	> 100	> 100	> 100	> 100
ITD-N676K	44.17 ± 0.979	48.27 ± 0.857	49.98 ± 0.950	36.75 ± 0.935
WT	5.10 ± 0.704	5.87 ± 0.723	5.36 ± 0.768	1.44 ± 0.558

Tabelle 11. Übersicht der IC₅₀-Werte von **217**, **218**, **194** und **195** in Ba/F3-Zellen. Die Zellen wurden 72 h mit einer Konzentrationsreihe der entsprechenden Verbindung inkubiert und die Zellzahlen mittels Trypanblaufärbung bestimmt (N = 3). Die Werte wurden zur Leerkontrolle prozentual ins Verhältnis gesetzt. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels der Software Prism Graphpad.

Ba/F3-Zellen	168 (LBH-589) IC ₅₀ [nM]	167 (SAHA) IC ₅₀ [nM]	29 IC ₅₀ [nM]
D385Y	3.52 ± 0.874	> 100	28.10 ± 0.916
D835Y-N676K	3.64 ± 0.896	> 100	105.6 ± 0.763
ITD	6.13 ± 0.915	> 100	< 5
ITD-D835Y	3.92 ± 0.854	> 100	> 100
ITD-N676K	4.80 ± 0.967	> 100	11.29 ± 0.958
WT	4.95 ± 0.769	> 100	< 5

Tabelle 12. Übersicht der IC₅₀-Werte der Referenzverbindungen **167**, **168** und **29** in Ba/F3-Zellen nach 72 h (N = 3).

Vergleicht man die Werte in Tabelle 11 mit den Werten der Referenzverbindungen in Tabelle 12, so ist ersichtlich, dass die Verbindungen **217** und **218** gegenüber **168** (LBH-589) bzw. **29** in den Zelllinien mit den durch **8** (AC220) ausgelösten Resistenzen einen geringeren inhibitorischen Effekt aufweisen. Die Verbindungen **194** und **195** hingegen zeigen gegenüber **167** (SAHA) eine in den ITD, ITD-N676K und WT-Zellen stärkere inhibitorische Wirkung. In den ITD, ITD-D835Y und in der ITD-TKD-Mutation (D835Y N676K) hingegen zeigen sie kaum einen inhibitorischen Effekt, wie auch **167** (SAHA) selbst. Gegenüber **29** weisen weder **194** noch **195** einen gleichen bzw. ähnlichen inhibitorischen Effekt auf.

D. Zusammenfassung

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine schwerwiegende Erkrankung, deren Therapie mit den gegenwärtig verfügbaren etablierten Verfahren nur bei einem Teil der Patienten erfolgreich ist [23]. Ansatzpunkte für neue Therapien bieten molekulare Aberrationen in AML Zellen. Mutationen im Gen für FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3, eine Rezeptortyrosinkinase der Klasse III) gehören zu den häufigsten bisher identifizierten genetischen Läsionen. Missense-Mutationen, welche die FLT3-Kinasedomäne verändern (TKD, 5-8% der Patienten) und interne Tandemduplikationen von Aminosäuresequenzen in der Juxtamembran- oder Kinasedomäne (ITD, 25-30% der Patienten) führen zu konstitutiv aktiven FLT3-Versionen [25]. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass aktivierende FLT3-Mutationen, insbesondere vom ITD-Typ, kausal an der Leukämogenese beteiligt sind und zur Proliferation und Apoptose-Resistenz leukämischer Blasten beitragen. Hemmstoffe der Tyrosinkinase-Aktivität von FLT3 können deshalb aussichtsreiche neue Wirkstoffe für die Behandlung der AML sein [24].

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine neue Generation selektiver FLT3-Inhibitoren zu synthetisieren, die zusätzlich auch in den Therapie-assoziierten FLT3-ITD Mutationen ihre Wirksamkeit nicht verlieren sollten.

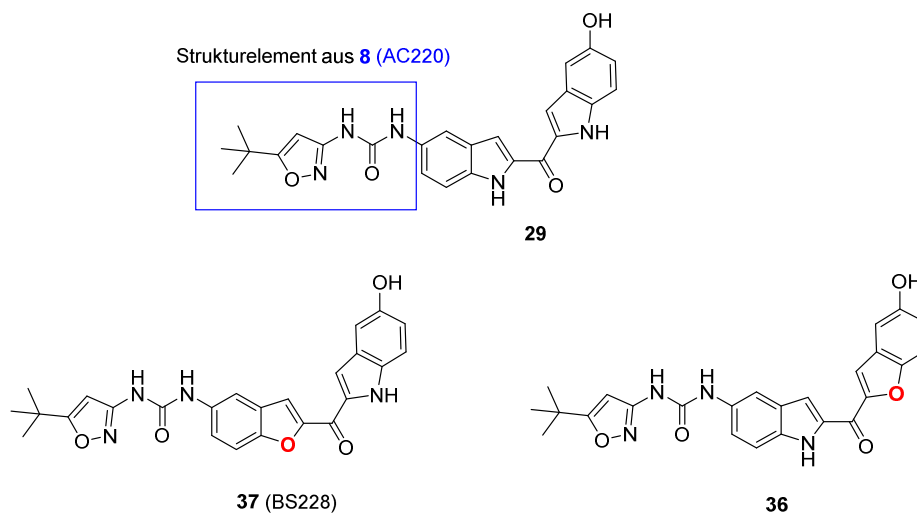


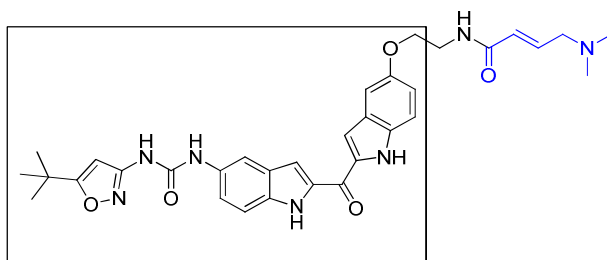
Abbildung 49. Übersicht neuer selektiver FLT3-Inhibitoren.

Die Leitstruktur dieser neuen Serie von FLT3-Inhibitoren konnte, wie in Abbildung 13 gezeigt, aus Verbindung **24** und dem *tert*-Butylisoxazolylharnstoff Strukturelement aus **8** (AC220) (Abbildung 11, S. 19) generiert werden. Durch Modifikationen dieser definierten Leitstruktur **29** wurde eine Serie neuer Verbindungen dargestellt und in ihrer Wirkung bezüglich der FLT3-Kinase untersucht.

Dazu wurden die FLT3-Inhibitoren in einem Proliferationsassay in einer humanen AML-Zelllinie (MV4-11) gescreent. **37** (BS228) zeigte neben **29** und **36** die stärkste inhibitorische Wirkung (subnanomolarer Bereich) bezüglich des FLT3-Rezeptors (Tabelle 4). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese drei Verbindungen auch in den Therapie-assoziierten FLT3-ITD Mutationen getestet. Diese sind sogenannte sekundäre Resistenzen und können durch die Behandlung von z. B. **8** (AC220) entstehen. Da dieser FLT3i ein vielversprechender Inhibitor in der Behandlung von AML ist, sollte eine neue Generation von FLT3i auch in diesen Resistenzen weiterhin wirksam sein. Die Versuche wurden mit murinen Ba/F3-Zellen durchgeführt, welche neben FLT3-WT, FLT3-ITD, FLT3-D835Y (häufigste TKD-Mutante) zusätzlich zu einer FLT3-ITD auch eine der beiden FLT3-TKD-Mutationen D835Y und N676K exprimieren. **37** (BS228) zeigte hier durchgängig gute bis sehr gute inhibitorische Wirkung (Tabelle 5 und 6). Auch im Vergleich zu **9** (Crenolanib), dem derzeit potentesten Inhibitor bei solchen Resistenzausbildungen, zeigte **37** (BS228) gleiche bis zum Teil signifikant bessere Wirkung. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde **37** (BS228) bezüglich seiner Selektivität und Spezifität getestet. Es wurde dazu unter anderem die Toxizität in Ba/F3-Zellen (Abbildung 33) und die Spezifität in BCR-Abl Zellen (eine CML-Zelllinie) (Abbildung 34) oder in KIT-Zellen (Abbildung 31) getestet. In allen Versuchen erwies sich **37** (BS228) als eine herausragende Verbindung. Zusätzlich wurde **37** (BS228) auch im Kinobead Versuch (AK Prof. Küster, Technische Universität München) analysiert. Bei diesem Experiment wurde die Verbindung gegen ca. 250 Kinasen gescreent. Neben FLT3 gab es lediglich drei andere potentielle Targets (RET, ZAK, NQO2) (Tabelle 7 und 8), wobei RET nur in der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt und NOQ2 erst in höheren Konzentrationen inhibiert wird. **37** (BS228) scheint somit ein selektiver und potenter neuer FLT3-Inhibitor zu sein. Da jedoch die Löslichkeit der bisher bekannten Bisindole ein großes Problem darstellt, wurde mit **37** (BS228) hinsichtlich dieses Problems ein experimenteller Löslichkeitsversuch durchgeführt (Abbildung 41). Mithilfe des Lösungsvermittlers Captisol® konnte die Löslichkeit von < 0.13 mg/ml deutlich auf 25.76 mg/ml (40% Captisol®-Lösung) gesteigert werden. Eine Formulierung dieses Wirkstoffes sollte somit möglich sein und kann im Xenograftmodell unschädlich verabreicht werden. Die Versuche im Mausmodell mit einer Kooperation am Uniklinikum in Mainz laufen bereits, jedoch sind zum Zeitpunkt dieser Veröffentlichung noch keine Ergebnisse bekannt.

Eine weitere Zielstellung war es, potentielle irreversible Inhibitoren für den FLT3-Rezeptor zu entwerfen und zu synthetisieren. Diese sollten durch gezielte Modifikationen bereits zuvor entwickelter FLT3-Inhibitoren durch die Einführung von Michael-Akzeptor-Gruppen hergestellt werden. Aufgrund der Einführung einer elektrophilen Gruppe sollten solche Inhibitoren einen doppelten Bindungsmechanismus ausüben, indem sie zunächst reversibel

in die ATP-Bindungstaschen binden und zusätzlich durch das Michael-System im peripheren Teil des Inhibitors eine kovalente Bindung mit einem Cysteinrest ausbilden. Aufgrund einer publizierten Röntgenkristallstruktur von **8** (AC220) (vgl. S. 41, 42 Abbildungen 15 und 16) in der FLT3-Kinase, wurde erkannt, dass Cys-694 und Cys-695 sich in räumlicher Nähe zum gebundenen Inhibitormolekül befinden und somit gegebenenfalls eine kovalente Bindung ausbilden könnten (strukturelle Abschätzungen der Moleküldimensionen mithilfe der Röntgenkristallstruktur). Durch die kovalente Anbindung sollte das katalytische Zentrum der Kinase dauerhaft blockiert werden und die damit einhergehende Signalkaskade „downreguliert“ werden.



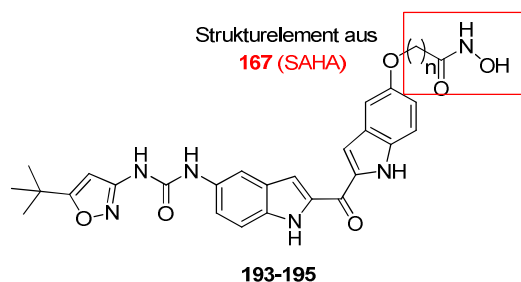
153

Abbildung 50. Schematische Darstellung des potentiellen irreversiblen Inhibitors **153**.

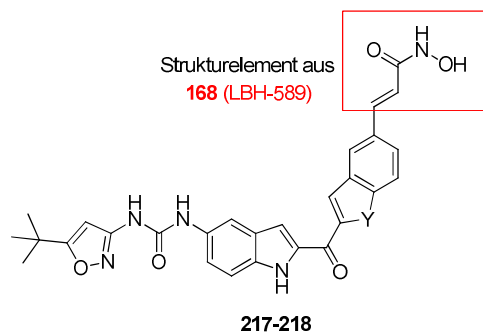
Die drei potentiellen irreversiblen Inhibitoren **153**, **154** und **155** wurden ausgehend von **29** mit verschiedenen Michael-Systemen modifiziert und in einer humanen AML-Zelllinie getestet. Im Proliferationsassay waren alle drei Verbindungen **153-155** starke Inhibitoren. In einem weiteren Versuch zur Irreversibilität zeigte jedoch nur **153** eine weiterhin gute inhibitorische Wirkung (Auswaschen von nicht-kovalent gebundenem Inhibitor).

Die Kombination von FLT3-Inhibitoren mit anderen Wirkprinzipien wird gegenwärtig als eine besonders erfolgversprechende Weiterführung des Konzepts der Nutzung aktivierter FLT3-Versionen als therapeutisch relevante Zielstrukturen angesehen. Eine potentiell aussichtsreiche Kombinationsmöglichkeit erlauben Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) [165]. HDACs sind epigenetische Regulatoren, die in Krebszellen häufig fehlreguliert sind. Dementsprechend hemmen HDACi das Wachstum von Tumorzellen aus verschiedenen Kompartimenten und sind weit weniger spezifisch als Inhibitoren für onkogenes FLT3.

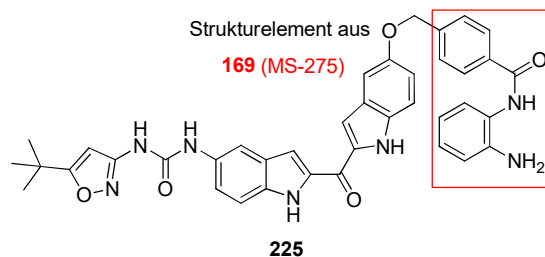
Ziel dieser Arbeit war es daher, Inhibitoren, die sowohl eine FLT3i Aktivität als auch eine HDACi Aktivität aufweisen, zu synthetisieren. Solche chimären Verbindungen wurden ausgehend von dem FLT3-Inhibitor **29** mit Strukturelementen verschiedener HDAC-Inhibitoren, wie z. B. **167** (SAHA), **168** (LBH-589) und **169** (MS-275) modifiziert. Die neu entwickelten Strukturen und ihre entsprechenden pharmakologischen Daten sind in Tabelle 13 aufgeführt.



Verbindung	n	IC ₅₀ [nM]
193	4	2.39 ± 0.549
194	6	0.18 ± 0.504
195	5	2.08 ± 0.381



Verbindung	Y	IC ₅₀ [nM]
217	O	1.47 ± 0.568
218	NH	0.75 ± 0.520
225	-	50.03 ± 0.871



Referenzverb.		IC ₅₀ [nM]
29	-	1.71 ± 0.412
167 (SAHA)	-	> 100
168 (LBH-589)	-	4.78 ± 0.236

Tabelle 13. Inhibition des FLT3-Tyrosinkinase Rezeptors durch chimäre Verbindungen im MV4-11 Proliferationsassay.

Die neu generierten Hybridmoleküle wurden in der humanen AML-Zelllinie MV4-11 getestet, welche endogenes FLT3-ITD exprimiert, wodurch sie von den Signalen des mutierten FLT3-Rezeptors abhängig ist. Zusätzlich kann dieser aktive FLT3-ITD Rezeptor durch HDACi bevorzugt der Proteolyse zugeführt werden [178, 202]. **193**, **194** und **195** wurden mit verschiedenen Kettenlängen der Parentalverbindung **169** (SAHA) modifiziert. **194** weist dabei die gleiche Kettenlänge auf, während **195** um eine CH₂-Einheit und **193** um zwei CH₂-Einheiten verkürzt wurde. Diese Verkürzungen scheinen im unmittelbaren Zusammenhang mit der inhibitorischen Wirksamkeit zu stehen, denn der IC₅₀-Wert nimmt mit der Reduzierung der Kettenlänge zu. **194** zeigt somit den größten inhibitorischen Effekt gegenüber der FLT3-Kinase. Im Vergleich der beiden Parentalverbindungen **167** (SAHA) und **29** zeigt auch **194** den größten Effekt. Mit den Strukturelementen von **168** (LBH-589) wurden ebenfalls zwei Verbindungen synthetisiert. Der Unterschied zwischen **217** und **218** liegt lediglich in einer Modifikation am Bisindol-Grundkörper. Während **218** eben diesen Grundkörper aufweist, wurde bei **217** eine Indol-Einheit gegen ein Benzofuran ausgetauscht,

da dieses bei den FLT3i zu einer Erhöhung der Wirksamkeit führte (Tabelle 10). Bei **217** konnte jedoch der Effekt der Erhöhung der Wirksamkeit nicht nachgewiesen werden. Beide Verbindungen zeigen IC₅₀-Werte im subnanomolaren Bereich und sind auch wirksamer als ihre Parentalverbindung **168** (LBH-589). Im Vergleich zu **29** zeigte nur **218** einen höheren inhibitorischen Effekt, während **217** etwa dieselbe inhibitorische Aktivität aufweist. **225** wurde mit dem Strukturelement von **169** (MS-275) modifiziert und wies lediglich einen IC₅₀-Wert von ca. 50 nM auf, sodass diese Verbindung nicht weiter verfolgt wurde. Neben dem Proliferationsassay wurden die chimären Verbindungen auch auf ihre Induktion der Apoptose analysiert. Während **195**, **194** und **217** eine Apoptoserate von ca. 40% in der subG₁-Population aufwiesen, zeigten **193** und **218** lediglich eine Apoptoserate von ca. 15% (Abbildung 43). Im Vergleich zu den Referenzverbindungen **168** (LBH-589) (27%), **167** (SAHA) (12%) und **29** (12%) scheinen die Verbindungen **194**, **195** und **217** einen synergistischen Effekt mit Bezug auf die Apoptoserate auszuüben. In den Immunoblotanalysen konnten ebenfalls bei den Verbindungen **194** und **217** sowohl eine „Downregulation“ in der Autophosphorylierung der FLT3-ITD, als auch generell die Hemmung der Histondeacetylaseaktivität anhand des acetylierten Histon H3 nachgewiesen werden. Jedoch ist die Histondeacetylaseinhibition etwa eine Größenordnung schwächer als die Hemmung der Autophosphorylierung. Es scheint also, dass die FLT3i Aktivität stärker als die HDACi-Aktivität ausgeprägt ist. Zusätzlich wurden die Verbindungen **194**, **195**, **217** und **218** noch in den AC220-resistenten Ba/F3-Zelllinien getestet. Hier zeigten jedoch die Parentalverbindungen **168** (LBH-589) und **29** eine deutlich größere inhibitorische Wirkung als die Hybridverbindungen. Lediglich gegenüber **167** (SAHA) konnte ein zum Teil größerer inhibitorischer Effekt erreicht werden.

Die neu synthetisierten Verbindungen zeigen zwar zum Teil bessere inhibitorische Wirkung als ihre Parentalverbindungen, jedoch scheint die FLT3i-Aktivität gegenüber der HDACi-Aktivität stärker ausgeprägt zu sein.

E. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben

Chemikalien

Die für den chemischen Teil dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösemittel wurden von folgenden Herstellern bezogen: ABCR (Karlsruhe, Deutschland), Acros Organics (Geel, Belgien), AK Scientific (Union City, USA), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Hamburg, Deutschland), Matrix Scientific (Columbia, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie (München, Deutschland), TCI Europe (Zwijndrecht, Belgien), VWR (Radnor, USA). Die erworbenen Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Deuterierte Lösemittel zur NMR-Spektroskopie wurden von Acros Organics (Geel, Belgien) oder Deutero GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

NMR Spektroskopie

Kernspinresonanzspektren (^1H - und ^{13}C -Spektren-NMR) wurden mit einem Bruker Avance 300 (^1H : 300 MHz) oder Avance 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 101 MHz) NMR-Spektrometer der Firma Bruker BioSpin (Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist in Einheiten der δ -Skala angegeben und bezieht sich auf $\delta_{\text{TMS}} = 0$ ppm. Bei den ^1H -NMR-Spektren diente als interner Standard das Resonanzsignal der Restprotonen der verwendeten Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO- d_6 , 2.50 ppm), Aceton (Aceton- d_6 , 2.05 ppm) oder Chloroform (CDCl_3 , 7.26 ppm). Die Multiplizität im ^1H -NMR – Spektrum wird durch folgende Abkürzungen angegeben: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett) und Kombinationen daraus. Die Kopplungskonstante J wird in Hertz (Hz) angegeben. Für die Kalibrierung von ^{13}C -NMR Spektren dient das ^{13}C -Resonanzsignal des Lösungsmittels DMSO- d_6 (39.52 ppm). Die Bestimmung der Multiplizität von Kohlenstoff-Atomen erfolgte durch Messung von DEPT 90- und DEPT 135 (*engl.* distortionless enhancement by polarization transfer). Diese wurden basierend auf den Signalen aus den jeweiligen ^{13}C -NMR Spektren kalibriert und für die Charakterisierung von CH-Inkrementen verwendet: Signale von primären (CH_3) und tertiären (CH) C-Atomen werden mit „+“, die von sekundären (CH_2) mit „-“ und von quartären mit „Cq.“ gekennzeichnet. Zur Unterstützung bei der Strukturaufklärung wurden zusätzlich 2D-NMR-spektroskopische Untersuchungen in Form von COSY (correlation spectroscopy), NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum correlation) und HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) Messungen durchgeführt. Sämtliche

NMR Spektren wurden mit den Programmen MestReNova 8.1.0 und Bruker TopSpin 3.0 ausgewertet.

Massenspektroskopie:

Massenspektren wurden in der Zentralen Analytik, der Universität Regensburg, an folgenden Geräten aufgenommen:

- EI-MS: Finnigan MAT SSQ710 A, Finnigan MAT 95
- ESI-MS: ThermoQuest Finnigan TSQ 7000 und Agilent Technologies 6540 UHD Accurate-Mass Q-Top LC/MS, kombiniert mit der HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity

IR Spektroskopie:

Infrarotspektren wurden mit einem Bruker Tensor 27 Spektrometer aufgenommen. Die Wellenzahl wird dabei in der Einheit cm^{-1} angegeben. Die Substanzen wurden dabei als Kaliumbromid Pressling (KBr) oder direkt mit dem ATR-Aufsatz vermessen.

UV Spektroskopie:

UV/Vis-Spektren wurden am Lehrstuhl Prof. Dr. B. König unter Benutzung eines Varian Cary BIO 50 UV/Vis/NIR-Spektrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) oder mit einem Tecan-i-control Infinite 200Pro aufgenommen (Tecan, Männedorf, Schweiz).

Elementaranalyse:

Elementaranalysen (CHN) wurden durch die Zentrale Analytik der Universität Regensburg mit dem Gerät Heraeus Elementar Vario EL III bzw. Heraeus CHN Rapid (Heraeus Holding GmbH, Hanau) erstellt. Alle Daten werden in Prozent angegeben und liegen innerhalb $\pm 0.4\%$ der theoretischen Werte.

Schmelzpunkte:

Schmelzpunkte wurden an einem Büchi Melting Point B-545 (Büchi GmbH, Essen, Deutschland) mit offener Kapillare oder einem MPA 100 von Stanford Research Systems (Stanford, CA, USA) vermessen. Die Werte wurden nicht korrigiert.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Analytische und präparative HPLC wurden mit HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. B. König unter der Leitung von Herrn Dr. Rudolf Vasold durchgeführt.

Bezeichnungen der Verbindungen in dieser Arbeit wurden unter Verwendung der Software ChemDraw 12.0 generiert und orientieren sich an der IUPAC Nomenklatur.

Literaturbekannte Verbindungen:

Bei literaturbekannten Verbindungen wird die Literaturstelle hinter der chemischen Bezeichnung genannt. Außerdem sind diese Verbindungen mit einem Stern (*) in der Formelansicht (Kapitel G) gekennzeichnet.

2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AV)

Arbeitsvorschrift 1: Phenylsulfonylierung am Indol-Stickstoff [91]

Das entsprechende Indolderivat wurde in THF gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 1.1 equiv. NaH (60% in Mineralöl) ließ man die Reaktionslösung 30 min rühren, bevor 1.1 equiv. Phenylsulfonylchlorid zugetropft wurden. Nach Rühren über Nacht wurde der Reaktionsansatz auf H₂O (dest.) gegossen und mit EtOAc dreimal extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

Arbeitsvorschrift 2: Einführung der Carbonsäure und Darstellung entsprechender Säurechloride [91]

Arbeitsvorschrift 2A: Die entsprechende Ausgangsverbindung wurde in THF gelöst und unter Argon auf -78 °C gekühlt. Nach Zutropfen von 1.1 equiv. *n*-BuLi ließ man die Lösung 2 h bei -78 °C rühren. Anschließend wurde Trockeneis im Überschuss zur Reaktionslösung gegeben und diese weitere 2 h gerührt, bevor anschließend langsam auf RT erwärmt wurde. Das Lösungsmittel wurde vorsichtig am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Feststoff in H₂O gelöst. Nach Extraktion mit EtOAc wurde die wässrige Phase vorsichtig mit konz. HCl angesäuert und die ausgefallene Indolcarbonsäure abgesaugt.

Arbeitsvorschrift 2B: Lithiierung und Darstellung der Carbonsäure mittels LDA: Diisopropylamin wurde mit *n*-BuLi in THF bei -78 °C zu LDA umgesetzt (final 1.2 eq. bezogen auf Ausgangsverbindung). Die entsprechende Ausgangsverbindung wurde in der nötigen Menge THF gelöst und langsam zur abgekühlten Lösung von LDA getropft. Nach 1 h rühren bei -78 °C wurde die Reaktionsmischung langsam auf RT erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der erhaltene Feststoff in DCM gelöst und mit 2 M (aq.) HCl (DCM:HCl 3:1, v:v) für 1 h refluxiert. Abschließend wurde die organische Phase mit 2 M (aq.) HCl extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde *in vacuo* getrocknet.

Die entsprechenden Carbonsäuren wurden anschließend in Thionylchlorid gelöst und 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des überschüssigen Thionylchlorids durch Destillation erhielt man die gewünschten Säurechloride, die ohne weitere Reinigung für die entsprechenden Kopplungen eingesetzt wurden.

Arbeitsvorschrift 3: Reduktion

Die entsprechende Nitroverbindung wurde in THF/MeOH/6 M (aq.) HCl 2:1:1.5 (v/v/v) gelöst. Nach Zugabe von 14 equiv. Zinkstaub und einer katalytischen Menge $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ wurde die Reaktionsmischung zum Rückfluss erhitzt. Nach Reaktionsende wurde der Zinkstaub von der Reaktionsmischung abfiltriert. Die Lösung wurde mittels konz. wässr. NH_3 auf $\text{pH} = 10$ alkalisiert und dreimal mit DCM extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt (Vorschrift modifiziert nach Russell *et al.* [103]).

Arbeitsvorschrift 4: Einführung der Boc-Schutzgruppe

Die entsprechende Aminoverbindung wurde in THF gelöst und im Eisbad auf $0 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Nach Zugabe von 1.5 equiv. NaH (60% Paraffin) wurde die Reaktionsmischung 30 min gerührt, um anschließend 1.1 equiv. Boc_2O zuzuführen und für mind. 12 h weiter zu rühren. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.2 equiv. Diethylamin gequencht und der Ansatz auf dest. H_2O gegossen. Das Rohprodukt wurde mehrmals mit EtOAc extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt *in vacuo* getrocknet (Vorschrift modifiziert nach Mahboobi *et al.* [91]).

Arbeitsvorschrift 5: Kopplungsreaktion [90]

Arbeitsvorschrift 5A: Die entsprechende Verbindung wurde in THF gelöst und unter Argon auf $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Nach Zugabe von 2.2 equiv. *t*-BuLi ließ man die Reaktionslösung für 4 h rühren und hielt die Temperatur dabei bei max. $-35 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach erneutem Abkühlen auf $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde das ebenfalls auf $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlte 2-Indolsäurechlorid (in wenig THF gelöst) zur Reaktionslösung gegossen. Nach ca. 1 h Reaktionszeit konnte der Ansatz auf ges. NH_4Cl Lösung gegossen werden und mit EtOAc dreimal extrahiert werden. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt. Die Kopplungsprodukte wurden in der Regel ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Arbeitsvorschrift 5B: 2-Hydroxy-5-nitrobenzaldehyd (**108**) wurde mit 1.0 equiv. K_2CO_3 und 1.0 equiv. des entsprechenden Aryl-Bromids in 2-Butanon gelöst und für 4 h zum Reflux erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde K_2CO_3 abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt [105].

Arbeitsvorschrift 6: Entfernung der Phenylsulfonylschutzgruppe [91]

Arbeitsvorschrift 6A: Das rohe Bisindol wurde in THF/MeOH/10%-iger (aq.) NaOH 1:1:1 (v/v/v) gelöst und 2 h refluxiert. Die Lösung wurde anschließend bis zur Kristallisation des

Produktes eingeeengt und abgesaugt. Kristallisierte das Produkt nicht spontan aus, wurde die Lösung mit EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt.

Arbeitsvorschrift 6B: Das aus der Kopplungsreaktion erhaltene Bisindol wurde in THF gelöst, mit 2.5 equiv. TBAF versetzt und über Nacht refluxiert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz auf ges. NH₄Cl-Lösung gegossen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Arbeitsvorschrift 7: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Das entsprechende Bisindol wurde in möglichst wenig TFA gelöst und bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wurde die Lösung auf Wasser gegossen und mit konz. NH₃ alkalisiert (pH = 10). Das ausgefallene Rohprodukt konnte abgesaugt werden und mit dem jeweiligen spezifischen Lösemittel umkristallisiert werden.

Arbeitsvorschrift 8: Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe und Reduktion der Aminogruppe

Das entsprechende Bisindol wurde in THF:MeOH 2:1 (v/v) gelöst. Nach Zugabe von 4.0 equiv. Ammoniumformiat und 10% Pd auf Aktivkohle wurde die Reaktionslösung refluxiert. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz über Celite filtriert und auf H₂O (dest.) gegossen. Die organischen Lösemittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt aus H₂O (dest.) kristallisiert [90]. Bei entsprechenden Nitroverbindungen konnten diese unter den genannten Bedingungen zeitgleich reduziert werden.

Arbeitsvorschrift 9: Modifikation der Aminogruppe

Darstellung von 5-(*tert*-Butyl)-3-isocyanatoisoxazol (**BIZ-NCO**, **140**): 0.1 g (0.71 mmol) 5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-amin wurden in abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 20 equiv. (Phosgen 20% in Toluol) und 8.5 equiv. Pyridin ließ man die Reaktionslösung über Nacht bei RT rühren. Am folgenden Tag wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in soviel THF aufgenommen, dass man eine 0.1 M Lösung erhielt [95, 111].

Arbeitsvorschrift 9A: Das entsprechende Edukt wurde in THF gelöst und mit 0.008 equiv. Pyridin versetzt. Nach Zugabe einer 0.1 M Lösung des 5-(*tert*-Butyl)-3-isocyanatoisoxazol (**BIZ-NCO**) wurde die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz auf ges. NaHCO₃ Lösung gegossen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt [95].

Darstellung von 3-Isocyanato-5-methylisoxazol (**150**), 5-(*tert*-Butyl)-3-isocyanatoisothiazol (**148**) oder 2-(*tert*-Butyl)-5-isocyanato-1,3,4-thiadiazol (**152**): 0.1 g der entsprechenden Amin-

Komponente wurde in 20 ml abs. THF gelöst. Nach Zugabe von 1.1 equiv. Diphosgen ließ man die Reaktionslösung über Nacht bei RT rühren. Am folgenden Tag wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt, und man erhielt einen weißen Rückstand [113].

Arbeitsvorschrift 9B: Das zu derivatisierende Edukt wurde in der nötigen Menge THF gelöst und mit dem entsprechenden **148 (BIT-NCO)**, **150 (MIZ-NCO)** oder **152 (BTD-NCO)** in THF versetzt. Die Reaktionslösung ließ man über Nacht bei RT rühren. Am folgenden Tag wurde die Reaktionslösung bis zum Reaktionsende auf 50 °C erwärmt (Reaktionskontrolle mittels DC). Anschließend wurde der Ansatz auf ges. NH₄Cl-Lösung gegossen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt [113].

Arbeitsvorschrift 10: Alkylierung

Die entsprechende Verbindung wurde in DMF unter Schutzgas gelöst und 1.1 equiv. NaH (60% in Paraffin) zur Reaktionslösung gegeben. Nach 15 min Rühren bei RT wurde das entsprechende Alkylans (1.2 equiv.) zugegeben und die Reaktionslösung für 3 d bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf dest. H₂O gegossen und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Modifiziert nach Mahboobi *et al.* [91]).

Arbeitsvorschrift 11: Esterspaltung

Arbeitsvorschrift 11A: Die entsprechende Verbindung wurde in THF:MeOH:H₂O 2:1:1 (v/v/v) gelöst und mit 1.2 equiv. LiOH versetzt. Nach Reaktionsende (DC-Kontrolle) wurden die organischen Phasen am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt kristallisierte in der wässrigen Phase aus und wurde abgesaugt (Modifiziert nach Beckers *et al.* [188]).

Arbeitsvorschrift 11B: Die entsprechende *tert*-Butyl acrylat Verbindung wurde in DCM:TFA 2:1 (v/v) gelöst und bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wurde die Reaktionslösung auf dest. H₂O gegossen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt.

Arbeitsvorschrift 12: Amidierung mit NH₂OTHP

Die entsprechende Carbonsäure wurde in THF:DMF (2:1) gelöst und nach Zugabe von Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) (1 equiv.), Triethylamin (3 equiv.) und *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (**188**) (4 equiv.) bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) wurde der Ansatz auf dest. H₂O gegossen. Kristallisierte die Zielverbindung spontan aus, wurde abgesaugt und das

Rohprodukt *in vacuo* getrocknet. Alternativ wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt (Vorschrift modifiziert nach Mahboobi *et al.* [105]).

Arbeitsvorschrift 13: Freisetzung der Hydroxamsäure

Das entsprechende Edukt wurde in Methanol gelöst - gegebenenfalls unter leichtem Erwärmen. Dann wurde vorsichtig 0.6 M wässrige HCl zugetropft, bis eine leichte Trübung durch ausfallendes Produkt entstand. Im Anschluss wurde bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde die Kristallisation der Hydroxamsäure durch weitere Zugabe von 0.6 M (aq.) HCl vervollständigt. Das kristalline Produkt wurde abgesaugt und *in vacuo* getrocknet [105].

3. Synthesevorschriften

29

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)harnstoff

Kopplung von **128** mit **140** nach AV 9A.

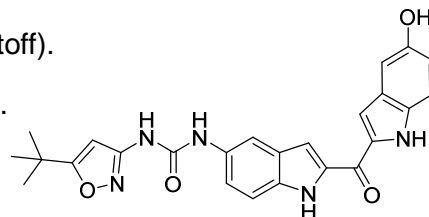
Ausbeute: 0.42 mmol aus 1.72 mmol → 24% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:DCM 10:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 268.7 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3367, 2968, 1627.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.86 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Indol-NH), 11.69 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Indol-NH), 9.46 (s, 1H, NH), 9.00 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, OH), 7.91 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.52 – 7.38 (m, 3H, ArH), 7.40 – 7.23 (m, 2H, ArH), 7.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.86 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 180.0 (C_q, C=O, Bisindol), 158.6 (C_q), 176.4 (C_q), 158.6 (C_q), 151.8 (C_q), 151.5 (C_q), 135.2 (C_q), 134.8 (C_q), 134.3 (C_q), 132.2 (C_q), 128.0 (C_q), 127.4 (C_q), 119.3 (+, CH), 117.1 (+, CH), 113.2 (+, CH), 112.8 (+, CH), 111.2 (+, CH), 109.0 (+, CH), 108.6 (+, CH), 104.9 (+, CH), 92.5 (+, CH, Isoxazol), 32.5 (C_q), 28.4 (+, (CH₃)₃).



ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 458.0 (100) [MH⁺] (MW = 457.18 g/mol).

Anal. (C₂₅H₂₃N₅O₄): Ber. C 65.63, H 5.07, N 15.31, Gef. C 65.36, H 4.88, N 15.40.

30

1-(2-(5-Hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)-3-(5-methylisoxazol-3-yl)harnstoff

Kopplung von **128** mit **150** nach AV 9B.

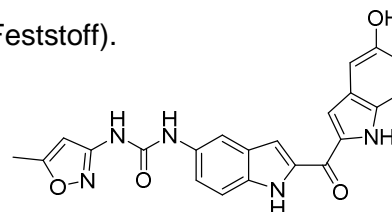
Ausbeute: 1.60 mmol aus 3.50 mmol → 46% (ockerfarbener Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc.

Schmelzpunkt: 280.6 – 281.5 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3343, 1723, 1526.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.85 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, Indol-NH), 11.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, Indol-NH), 9.40 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, OH), 8.76 (s, 1H, NH), 7.91 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, ArH), 7.35 – 7.24 (m, 2H, ArH), 7.01 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.93 – 6.81 (m, 1H, ArH), 6.55 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, Isoxazol-CH), 2.37 (d, *J* = 0.6 Hz, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176.4 (C_q, C=O, Bisindol), 169.1 (C_q), 158.9 (C_q), 151.6 (C_q), 151.5 (C_q), 135.2 (C_q), 134.8 (C_q), 131.9 (C_q), 128.0 (C_q), 127.4 (C_q), 119.5 (+, CH), 117.1 (+, CH), 113.2 (+, CH), 112.8 (+, CH), 111.5 (+, CH), 109.0 (+, CH), 108.6 (+, CH), 104.8 (+, CH), 95.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 12.1 (+, CH₃).



ESI-MS (120 eV) m/z (%): 416.1 (100) $[MH^+]$ (MW = 415.15 g/mol).

Anal. ($C_{22}H_{17}N_5O_4 \cdot \frac{1}{2}EtOAc$): Ber. C 62.45, H 4.35, N 15.50. Gef. C 62.05, H 4.55, N 16.01⁶.

31

1-(5-*tert*-Butylisothiazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)harnstoff

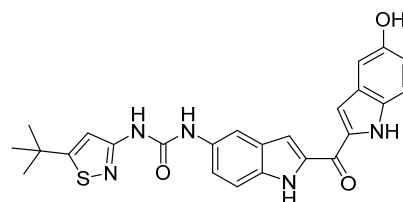
Kopplung von **128** mit **148** nach AV 9B.

Ausbeute: 0.25 mmol aus 1.92 mmol → 13% (oranger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:DCM 1:1 (v/v).

Umkristallisation: EtOAc.

Schmelzpunkt: 295.6 °C.



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3364, 2959, 1678.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.86 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Indol-NH), 11.69 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Indol-NH), 9.72 (s, 1H, NH), 9.37 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, OH), 7.95 (d, J = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, J = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.42 (dd, J = 7.9, 5.3 Hz, 2H, ArH), 7.34 – 7.24 (m, 3H, ArH), 7.01 (d, J = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.91 – 6.81 (m, 1H, ArH), 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 181.5 (C_q), 177.3 (C_q), 159.8 (C_q), 152.6 (C_q), 152.4 (C_q), 136.2 (C_q), 135.7 (C_q), 135.3 (C_q), 133.7 (C_q), 132.8 (C_q), 128.9 (C_q), 128.3 (C_q), 120.5 (+, CH), 118.0 (+, CH), 114.8 (+, CH), 113.8 (+, CH), 112.6 (+, CH), 111.7 (+, CH), 109.9 (+, CH), 109.5 (+, CH), 105.8 (+, CH), 32.5 (+, (CH₃)₃).

ESI-MS (70 eV) m/z (%): 474.0 (100) $[MH^+]$ (MW = 473.15 g/mol).

Anal. ($C_{25}H_{23}N_5O_3Sx \cdot \frac{1}{4}EtOAc$): Ber. C 63.01, H 5.08, N 14.13, S 6.47. Gef. C 62.66, H 5.16, N 14.65, S 6.58.⁷

32

1-(5-*tert*-Butyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)harnstoff

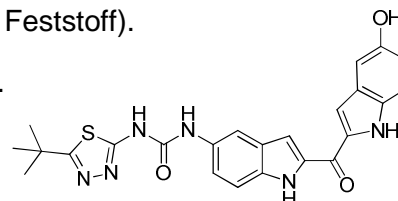
Kopplung von **128** mit **152** nach AV 9B.

Ausbeute: 0.15 mmol aus 1.90 mmol → 8% (ockerfarbener Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:DCM 10:1 (v/v).

Umkristallisation: EtOAc.

Schmelzpunkt: 235.0 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3299, 2961, 1699, 1527.

⁶ Der gefundene Elementaranalysenwert für N weicht um 0.51% von der Theorie ab.

⁷ Der gefundene Elementaranalysenwert für N weicht um 0.52% von der Theorie ab.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.90 (s, 1H, Indol-NH), 11.69 (s, 1H, Indol-NH), 10.21 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, OH), 7.95 (s, 1H, ArH), 7.62–7.27 (m, 5H, ArH), 7.01 (d, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.86 (d, 1 H, ArH), 1.46 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 176.8 (C_q , C=O, Bisindol), 152.0 (C_q), 135.8 (C_q), 135.2 (C_q), 135.0 (C_q), 133.2 (C_q), 128.5 (C_q), 127.8 (C_q), 119.2 (+, CH), 116.9 (+, CH), 113.0 (+, CH), 112.6 (+, CH), 108.8 (+, CH), 108.4 (+, CH), 104.6 (+, CH), 35.9 (C_q), 30.9 (+, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (70 eV) m/z (%): 475.0 (100) [MH^+] (MW = 474.15 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$): Ber. C 60.75, H 4.67, N 17.71, S 6.76. Gef. C 60.57, H 4.81, N 17.31, S 6.71.

33

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)harnstoff

Entschützung von **142** nach AV 8.

Ausbeute: 0.62 mmol aus 0.64 mmol \rightarrow 97% (beiger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 20:1 (v/v).

Umkristallisation: DCM.

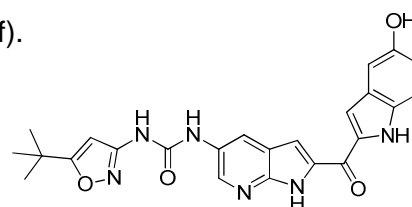
Schmelzpunkt: 249.2 – 252.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3419, 3301, 1634, 1652, 1606.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 13.98 (s, 1H, Indol-NH), 12.40 (s, 1H, Indol-NH), 11.71 (s, 1H, NH), 10.23 (s, 1H, NH), 9.01 (s, 1H, OH), 8.49 (s, 1H, ArH), 8.31 (d, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.40 (d, J = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.32 (d, J = 5.4 Hz, 1H, ArH), 7.00 (t, J = 2.6 Hz, 1H, ArH), 6.87 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H, ArH), 1.08 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 461(100) [MH^+] (MW = 458.17 g/mol).

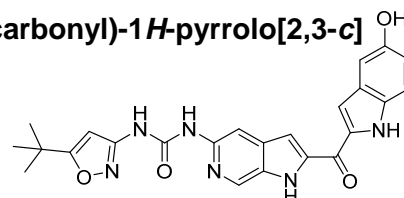
Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{xH}_2\text{O}+\text{MeOH}$): Ber. C 59.05, H 5.55, N 16.53. Gef. C 59.46, H 5.42, N 16.20.



34

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-5-yl)harnstoff

Kopplung von **129** mit **140** nach AV 9A.



Die Verbindung konnte nicht vollständig gereinigt werden und wurde daher nicht für zelluläre Versuche verwendet.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 12.29 (s, 1H, Indol-NH), 11.79 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, ArH), 8.63 (s, 1H, ArH), 7.35 (s, 1H, ArH), 7.32 (s, 1H, ArH), 7.03 (s, 1H, ArH), 6.91 (d, J =

2.3 Hz, 1H, ArH), 6.88 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, ArH), 6.56 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 459.2 (100) [MH⁺] (MW = 458.17 g/mol).

HR-MS (120 eV) m/z . Ber. 459.1775. Gef. 459.178 (C₂₄H₂₃N₆O₄) [MH⁺].

35

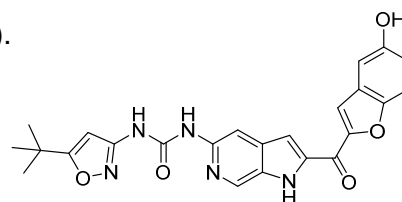
1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxybenzofuran-2-carbonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-5-yl)harnstoff

Kopplung von **127** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.11 mmol aus 0.34 mmol → 32% (beiger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 10:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 97.0 – 99.8 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 2969, 1635.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.35 (s, 1H, Indol-NH), 9.57 (s, 1H, NH), 9.31 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, OH), 8.06 (s, 1H, ArH), 7.99 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H, ArH), 7.74 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.15 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 7.07 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, ArH), 6.56 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.32 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 460.2 (100) [MH⁺] (MW = 459.15 g/mol).

HR-MS (120 eV) m/z . Ber. 459.1537. Gef. 459.1579 (C₂₄H₂₁N₅O₅) [MH⁺].

36

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxybenzofuran-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)harnstoff

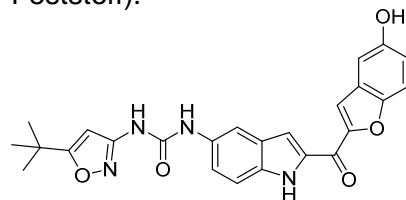
Kopplung von **130** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.22 mmol aus 2.29 mmol → 10% (2 Stufen, gelber Feststoff).

Säulenchromatographie: EtOAc:DCM 2:1 (v/v).

Umkristallisation: EtOAc.

Schmelzpunkt: 285.1 – 285.6 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3297, 2970, 1630.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.98 (s, 1H, Indol-NH), 9.54 (s, 1H, NH), 9.47 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, OH), 7.95 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, ArH), 7.88 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H, ArH), 7.74 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.32 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.13 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 7.04 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.30 (d, $J = 4.5$ Hz, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ =

180.7 (C_q), 173.8 (C_q), 159.2 (C_q), 154.7 (C_q), 153.2 (C_q), 152.2 (C_q), 150.2 (C_q), 135.4 (C_q), 134.8 (C_q), 132.7 (C_q), 128.3 (C_q), 127.9 (C_q), 120.8 (+, CH), 118.5 (+, CH), 114.8 (+, CH), 113.5 (+, CH), 113.2 (+, CH), 112.1 (+, CH), 111.3 (+, CH), 107.0 (+, CH), 92.9 (+, CH, Isoxazol-CH), 28.8 (+, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 459.2 (100) [MH⁺] (MW = 458.16 g/mol).

Anal. (C₂₅H₂₂N₄O₅·0.16 EtOAc): Ber. C 65.17, H 4.97, N 11.86. Gef. C 65.02, H 5.00, N 11.81.

37 (BS 228)

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)harnstoff

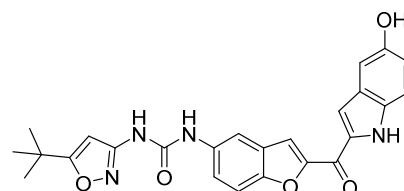
Kopplung von **134** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.17 mmol aus 0.34 mmol → 50% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:MeOH 20:1 (v/v).

Umkristallisation: EtOAc.

Schmelzpunkt: 171.2 – 173.7 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 1636, 1577.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.81 (s, 1H, Indol-NH), 9.57 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, NH), 8.98 (s, 1H, OH), 8.07 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.96 (s, 1H, ArH), 7.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.64 (s, 1H, ArH), 7.50 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.03 (s, 1H, ArH), 6.90 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.53 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 180.6 (C_q), 180.2 (C_q), 173.1 (C_q), 158.4 (C_q), 157.9 (C_q), 153.0 (C_q), 151.6 (C_q), 135.3 (C_q), 133.9 (C_q), 133.2 (C_q), 128.0 (C_q), 127.2 (C_q), 120.7 (+, CH), 118.1 (+, CH), 114.3 (+, CH), 113.4 (+, CH), 112.5 (+, CH), 112.0 (+, CH), 110.3 (+, CH), 105.0 (+, CH), 92.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 28.4 (+, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 459.2 (100) [MH⁺] (MW = 458.16 g/mol).

Anal. (C₂₅H₂₂N₄O₅·0.33 EtOAc): Ber. C 64.83, H 5.10, N 11.48. Gef. C 64.67, H 5.13, N 11.21.

38

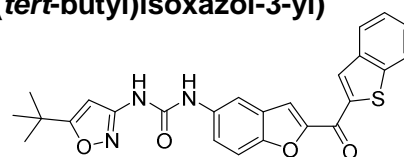
1-(2-(Benzo[*b*]thiophen-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)-3-(5-(*tert*-butyl)isoxazol-3-yl)harnstoff

Kopplung von **133** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.72 mmol aus 1.70 mmol → 42% (weißer Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 9:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 210.8 – 213.9 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 1620, 1550.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.58 (s, 1H, NH), 9.01 (s, 1H, NH), 8.79 (s, 1H, ArH), 8.12 (d, *J* = 18.4 Hz, 4H, ArH), 7.79 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, ArH), 6.53 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 180.2 (C_q), 175.5 (C_q), 170.3 (C_q), 158.4 (C_q), 151.8 (C_q), 151.6 (C_q), 151.5 (C_q), 141.5 (C_q), 141.3 (C_q), 139.3 (C_q), 135.5 (C_q), 132.3 (+, CH), 128.0 (+, CH), 127.1 (+, CH), 126.8 (+, CH), 125.4 (+, CH), 123.0 (+, CH), 121.3 (+, CH), 115.8 (+, CH), 112.6 (+, CH), 112.1 (+, CH), 92.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 32.5 (C_q), 28.3 (+, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 460.1 (100) [MH⁺] (MW = 459.13 g/mol).

Anal. (C₂₅H₂₁N₃O₄Sx⁴/₂₅EtOAc): Ber. C 65.01, H 4.75, N 8.86, S 6.76. Gef. C 64.75, H 4.51, N 9.03, S 6.67.

39

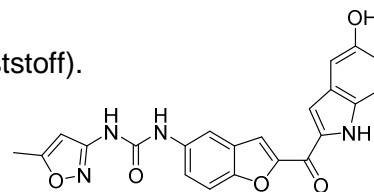
1-(2-(5-Hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)-3-(5-methylisoxazol-3-yl)harnstoff

Kopplung von **134** mit **150** nach AV 9B.

Ausbeute: 0.67 mmol aus 1.37 mmol → 49% (ockerfarbener Feststoff).

Schmelzpunkt: 267.0 – 267.6 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3453, 1613, 1518.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.81 (s, 1H, Indol-NH), 9.52 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H, OH), 8.07 (s, 1H, ArH), 7.97 (s, 1H, ArH), 7.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.64 (s, 1H, ArH), 7.49 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.03 (s, 1H, ArH), 6.90 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, ArH), 6.57 (s, 1H, Isoxazol-CH), 2.38 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.1 (C_q), 169.2 (C_q), 158.7 (C_q), 153.0 (C_q), 151.7 (C_q), 151.6 (C_q), 151.3 (C_q), 135.4 (C_q), 133.9 (C_q), 133.2 (C_q), 128.1 (C_q), 127.3 (C_q), 120.7 (+, CH), 118.1 (+, CH), 114.3 (+, CH), 113.4 (+, CH), 112.5 (+, CH), 112.0 (+, CH), 110.3 (+, CH), 105.0 (+, CH), 95.6 (+, CH, Isoxazol-CH), 12.2 (+, CH₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 417.1 (100) [MH⁺] (MW = 416.11 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 417.1194. Gef. 417.1193 (C₂₂H₁₇N₄O₅) [MH⁺]

40

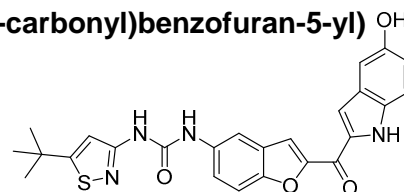
1-(5-(*tert*-Butyl)isothiazol-3-yl)-3-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)harnstoff

Kopplung von **134** mit **148** nach AV 9B.

Ausbeute: 0.13 mmol aus 1.37 mmol → 9 % (oranger Feststoff).

Schmelzpunkt: 197.9 – 201.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3276, 2966, 1699, 1597, 1520.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6): δ = 10.90 (s, 1H, Indol-NH), 10.32 (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, OH), 8.05 (s, 1H, ArH), 7.86 (s, 1H, ArH), 7.74 (dd, J = 12.4, 5.2 Hz, 2H, ArH), 7.69 – 7.63 (m, 1H, ArH), 7.48 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, J = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.12 (s, 1H, ArH), 7.02 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 1.44 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.9 (C_q), 152.5 (C_q), 148.5 (C_q), 145.5 (C_q), 130.1 (C_q), 127.7 (C_q), 126.6 (+, CH), 118.4 (+, CH), 117.1 (+, CH), 112.1 (+, CH), 110.7 (+, CH), 104.2 (+, CH), 39.8 (+, CH).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 475.1 (100) $[\text{MH}^+]$ (MW = 474.14 g/mol).

HR-MS (120 eV) m/z . Ber. 475.1435. Gef. 475.1437 ($\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$) $[\text{MH}^+]$.

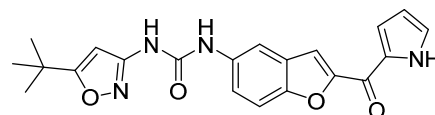
41

1-(2-(1*H*-Pyrrol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)-3-(5-(*tert*-butyl)isoxazol-3-yl)harnstoff

Kopplung von **135** mit **140** nach AV 9A.

Schmelzpunkt: 226.5 – 227.3 °C.

Ausbeute: 0.69 mmol aus 2.21 mmol \rightarrow 31% (beiger Feststoff).



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3454, 1612, 1554.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.21 (s, 1H, Pyrrol-NH), 9.56 (s, 1H, NH), 8.96 (s, 1H, NH), 8.04 (d, J = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.81 (s, 1H, ArH), 7.71 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.51 – 7.41 (m, 2H, ArH), 7.28 (s, 1H, ArH), 6.53 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.42 – 6.30 (m, 1H, ArH), 1.30 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 180.2 (C_q), 170.7 (C_q), 158.4 (C_q), 153.2 (C_q), 151.1 (C_q), 135.1 (C_q), 129.9 (C_q), 127.2 (C_q), 127.1 (+, CH), 120.3 (+, CH), 118.9 (+, CH), 113.1 (+, CH), 112.3 (+, CH), 111.9 (+, CH), 110.8 (+, CH), 92.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 32.5 (C_q), 28.3 (+, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 393.2 (100) $[\text{MH}^+]$ (MW = 392.15 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$): Ber. C 64.28, H 5.14, N 14.28. Gef. C 64.13, H 5.36, N 14.17.

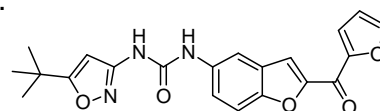
42

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(furan-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)harnstoff

Kopplung von **136** mit **140** nach AV 9A in DMF anstelle von THF.

Ausbeute: 0.69 mmol aus 2.20 mmol \rightarrow 31% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 194.7 – 196.3 °C.



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3474, 1625, 1551.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.56 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, NH), 8.19 (d, J = 1.0 Hz, 1H, ArH), 8.08 (d, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 8.04 (d, J = 0.7 Hz, 1H, ArH), 7.83 (d, J = 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.51 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.88 (dd, J = 3.6, 1.7

Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 180.2 (C_q), 168.7 (C_q), 158.4 (C_q), 151.6 (C_q), 151.4 (C_q), 151.4 (C_q), 148.8 (+, CH), 135.4 (C_q), 127.2 (C_q), 121.2 (+, CH), 120.9 (+, CH), 115.4 (+, CH), 113.0 (+, CH), 112.5 (+, CH), 112.2 (+, CH), 92.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 32.5 (C_q), 28.4 (+, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 394.1 (100) [MH⁺] (MW = 393.13 g/mol).

Anal. (C₂₁H₁₉N₃O₅·0.1DMF): Ber. C 63.84, H 4.96 N 10.84. Gef. C 63.61, H 5.07, N 11.15.

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 394.1402. Gef. 394.1397 (C₂₁H₂₀N₃O₅) [MH⁺].

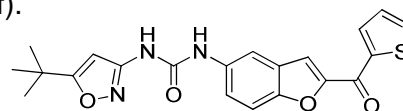
43

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(2-(thiophen-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)

Kopplung von **137** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.94 mmol aus 1.64 mmol → 57% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 229 - 230 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 1623, 1469.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.57 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, NH), 8.36 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H, ArH), 8.19 (dd, *J* = 4.9, 1.0 Hz, 1H, ArH), 8.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.98 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.75 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.39 (dd, *J* = 4.9, 3.9 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.30 (d, *J* = 4.0 Hz, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 180.2 (C_q), 174.1 (C_q), 158.4 (C_q), 152.0 (C_q), 151.6 (C_q), 151.4 (C_q), 141.7 (C_q), 136.1 (+, CH), 135.4 (+, CH), 134.8 (+, CH), 129.1 (+, CH), 127.1 (+, CH), 121.1 (+, CH), 115.2 (+, CH), 112.6 (+, CH), 112.1 (+, CH), 92.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 32.5 (C_q), 28.3 (+, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 410.1 (100) [MH⁺] (MW = 409.11 g/mol).

Anal. (C₂₁H₁₉N₃O₄S): Ber. C 61.60, H 4.68, N 10.26, S 7.83. Gef. C 61.60, H 4.65, N 10.22, S 7.64.

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 410.1169. Gef. 410.1172 (C₂₁H₂₀N₃O₄S) [MH⁺].

44

1-(2-Benzoyl-1*H*-indol-5-yl)-3-(5-(*tert*-butyl)isoxazol-3-yl)harnstoff

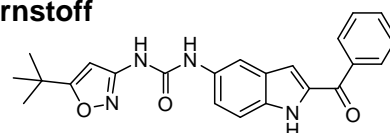
Kopplung von **102** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.30 mmol aus 0.42 mmol → 71% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 2:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 215.1 - 216.7 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3312, 1690, 1553.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.93 (d, J = 1.3 Hz, 1H, Indol-NH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.74 (s, 1H, NH), 7.93 (dd, J = 5.2, 3.3 Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, J = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.72 – 7.65 (m, 1H, ArH), 7.64 – 7.54 (m, 2H, ArH), 7.45 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.32 (dd, J = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.08 (d, J = 1.6 Hz, 1H, ArH), 6.50 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.29 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 186.4 (C_q), 180.1 (C_q), 158.5 (C_q), 151.6 (C_q), 138.0 (C_q), 134.81 (C_q), 134.79 (C_q), 132.3 (+, CH), 132.0 (+, CH), 129.8 (+, CH), 128.9 (+, CH), 128.6 (+, CH), 127.1 (+, CH), 120.1 (+, CH), 111.8 (+, CH), 111.7 (+, CH), 92.4 (+, CH, Isoxazol-CH), 32.4 (C_q), 28.4 (+, $(\text{CH}_3)_3$).

EI-MS (70 eV) m/z (%): 403.0 (100) [MH^+] (MW = 402.17 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$): Ber. C 68.64, H 5.51, N 13.92. Gef. C 68.36, H 5.55, N 14.03.

45

1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(4-(5-methoxy-1*H*-indol-2-carbonyl)phenyl)harnstoff

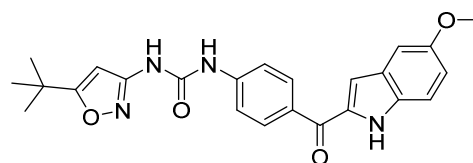
Kopplung von **132** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.18 mmol aus 0.37 mmol \rightarrow 49% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 2:1 (v/v).

Umkristallisation: DCM/EtOAc/Heptan.

Schmelzpunkt: 237.1 - 237.7 °C.



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 2966, 1766, 1603, 1533.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.80 (s, 1H, Indol-NH), 9.67 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH), 7.94 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.66 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.39 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.16 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.06 (s, 1H, ArH), 6.97 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.55 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.77 (s, 3H, O- CH_3), 1.31 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

EI-MS (70 eV) m/z (%): 433.1 (100) [MH^+] (MW = 432.18 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$): Ber. C 66.65, H 5.59, N 12.96. Gef. C 66.36, H 5.55, N 13.00.

46

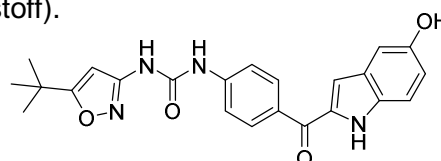
1-(5-(*tert*-Butyl)isoxazol-3-yl)-3-(4-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)phenyl)harnstoff

Kopplung von **131** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.41 mmol aus 1.98 mmol \rightarrow 21% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc.

Schmelzpunkt: 216.4 - 217.3 °C.



IR (pure): ν (cm^{-1}) = 3296, 2966, 1703, 1591, 1521.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.63 (s, 1H, Indol-NH), 9.66 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, NH), 8.96 (s, 1H, OH), 7.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.31 (d, J

= 8.8 Hz, 1H, ArH), 6.97 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, ArH), 6.85 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H, ArH), 6.54 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

EI-MS (70 eV) m/z (%): 419.1 (100) [MH⁺] (MW = 418.16 g/mol).

Anal. (C₂₃H₂₂N₄O₄· $\frac{1}{5}$ EtOAc): Ber. C 65.55, H 5.45, N 12.85. Gef. C 65.40, H 5.36, N 13.14.

47

tert-Butyl 2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl carboxylat

Entschützung von **88** nach AV 6A.

Ausbeute: 1.50 mmol aus 2.10 mmol → 71% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM: EtOAc 5:1 (v/v).

Umkristallisation: EtOAc.

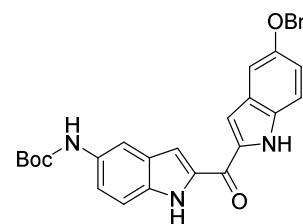
Schmelzpunkt: 215.7 – 217.9 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3451, 3278, 2978, 1665, 1527.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.87 (s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H, ArH), 7.47 (dd, $J = 11.9, 9.0$ Hz, 4H, ArH), 7.45 – 7.39 (m, 4H, ArH), 7.40 – 7.29 (m, 2H, ArH), 7.26 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, ArH), 7.05 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H, ArH), 5.14 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 1.49 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 482.0 (100) [MH⁺] (MW = 481.20 g/mol)

Anal. (C₂₉H₂₇N₃O₄): Ber. C 72.33, H 5.65, N 8.73. Gef. C 72.22, H 5.83, N 8.75.



49

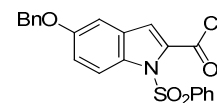
5-(Benzyloxy)-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-2-carbonyl chlorid [89, 91]

Darstellung aus **85** nach Mahboobi *et al.* [89].

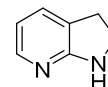
Ausbeute: 71 mmol aus 89 mmol → 80% (2 Stufen, beige Feststoff).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 1763.

Lit. IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 1752 [89].



59

2,3-Dihydro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin [101]

Darstellung aus 7-Azaindol (**58**) nach Pearson *et al.* [101].

Ausbeute: 121 mmol aus 127 mmol → 95% (weißer Feststoff).

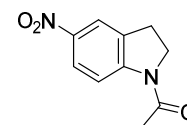
Schmelzpunkt: 78.3 – 79.5 °C (Lit. 78-79 °C) [101].

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:DCM 10:1 (v/v).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.11 – 8.05 (m, 1H, Indol-NH), 7.64 (dd, *J* = 7.0, 1.3 Hz, 1H, ArH), 6.84 – 6.76 (m, 1H, ArH), 6.71 (s, 1H, ArH), 3.85 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH₂), 3.35 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH₂).

Lit. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.67 (dd, *J* = 5.3, 1.3 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 7.0, 1.3 Hz, 1H), 6.39 (dd, *J* = 7.0, 5.3 Hz, 1H), 6.25 (bs, 1H), 3.44 (td, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 2H), 2.94 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H) [101].

61

1-(5-Nitroindolin-1-yl)ethanon [102]

Darstellung aus Indolin (**50**) nach Terent'ev *et al.* [102].

Aubeute: 90 mmol aus 100 mmol → 90% (gelber Feststoff) (2 Stufen).

Schmelzpunkt: 181 °C (Lit. 175.0 – 176.0 °C) [203].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO *d*₆): δ = 8.23 – 7.97 (m, 3H, ArH), 4.20 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, CH₂), 3.22 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, CH₂), 2.24 (d, *J* = 12.3 Hz, 3H, Methyl).⁹

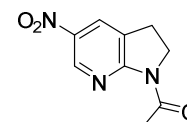
62

1-(5-Nitro-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-1-yl)ethanon [205]

Darstellung aus **59** wie **61** in Anlehnung an die Vorschrift von Terent'ev *et al.* [102].

Ausbeute: 56 mmol aus 130 mmol → 43% (beiger Feststoff).

Schmelzpunkt: 171.2 °C (Lit. 186 °C) [205].



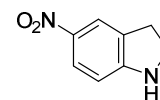
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.05 – 8.93 (m, 1H, ArH), 8.38 (dt, *J* = 2.7, 1.4 Hz, 1H, ArH), 4.17 – 3.90 (m, 2H, CH₂), 3.13 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, CH₂), 2.59 (s, 3H, CH₃).¹⁰

⁹ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl₃ vor [204].

¹⁰ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl₃ vor [205].

63

5-Nitroindolin [102]



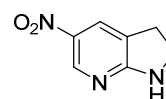
Darstellung aus **61** nach Terent'ev *et al.* [102].

Ausbeute: 90 mmol aus 90 mmol (quantitativ) (zitronengelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 93 °C (Lit. 91.0 - 91.5 °C) [102].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.96 – 7.78 (m, 2H, ArH), 7.26 (s, 1H, NH), 6.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 3.76 – 3.55 (m, 2H, CH₂), 3.04 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH₂).¹¹

64

5-Nitro-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin [101]

Darstellung aus **62** wie **63** in Anlehnung an die Vorschrift von Terent'ev *et al.* [102].

Ausbeute: 3.9 mmol aus 4.6 mmol → 84% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 158.3 – 160.1 °C (Lit. 155 - 160 °C) [101].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.68 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, Indol-NH), 8.25 (s, 1H, ArH), 7.95 – 7.78 (m, 1H, ArH), 3.68 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH₂), 3.09 (dd, *J* = 12.3, 4.6 Hz, 2H, CH₂).

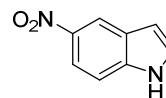
Lit. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.18 (s, 1 H). 8.66 (s, 1 H), 4.14 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 3.26 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H) [101].

65

5-Nitro-1*H*-indol [102]

Darstellung aus **63** wie **66** in Anlehnung an die Vorschrift von Pearson *et al.* [101].

Ausbeute: 37.0 mmol aus 90.3 mmol → 41% (gelber Feststoff).



Schmelzpunkt: 141 °C (Lit. 137.5 - 139.5 °C) [206].

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.83 (s, 1H, Indol-NH), 8.57 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.99 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.60 (dt, *J* = 16.2, 6.4 Hz, 2H, ArH), 6.73 (dd, *J* = 3.2, 0.8 Hz, 1H, ArH).

Lit. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.83 (bs, 1H), 8.58 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H) [206][102].

¹¹ Es liegen keine Vergleichsdaten von NMR in der Literatur vor [102]. ¹H-NMR Daten entsprechen den angegebenen Daten des Sigma Aldrich Produktes (CAS-Nr. 32692-19-6).

66

5-Nitro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin [207]

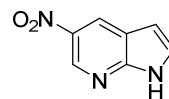
Darstellung aus **64** nach Pearson *et al.* [101].

Ausbeute: 8 mmol aus 15 mmol → 53% (oranger Feststoff).

Schmelzpunkt: 280 °C (Lit. 279 - 281 °C) [101].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.09 (s, 1H, ArH), 8.88 (s, 1H, ArH), 7.77 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, ArH), 6.74 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, ArH).

Lit. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.46 (br s, 1 H), 9.10 (br s, 1 H), 8.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 7.75 (dd, *J* = 3.5, 2.2 Hz, 1 H), d = 6.74 (dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, 1 H) [101].



67

5-Nitro-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol [208]

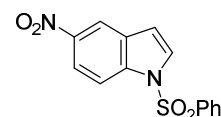
Phenylsulfonierung von **65** nach AV 1.

Ausbeute: 16 mmol aus 52 mmol → 31% (beiger Feststoff).

Schmelzpunkt: 131.4 – 132.1 °C (Lit. 132 - 134 °C) [209].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.59 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 8.27 – 8.14 (m, 2H, ArH), 8.12 – 8.03 (m, 3H, ArH), 7.74 (ddd, *J* = 6.7, 3.8, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.66 – 7.58 (m, 2H, ArH), 7.09 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, ArH).

Lit. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.59 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 8.22 (dd, 1H, *J* = 2.2 Hz, *J* = 9.2 Hz), 8.17 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 8.10 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 8.07 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.74 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.63 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.09 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz) [208].



68

5-Nitro-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin [210]

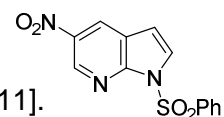
Phenylsulfonierung von **66** in Anlehnung an die Vorschrift von Maya *et al.* [211].

Ausbeute: 60 mmol aus 81 mmol → 74% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 261.3 - 263.8 °C.¹²

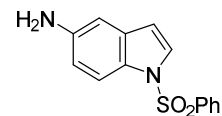
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.20 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 8.95 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 8.18 (t, *J* = 2.8 Hz, 2H, ArH), 8.15 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.81 – 7.72 (m, 1H, ArH), 7.69 – 7.62 (m, 2H, ArH), 7.05 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, ArH).

Lit. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9.21 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.97 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.21 - 8.16 (m, 3H), 7.78 (m, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.07 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H) [212].



¹² Es liegen keine Vergleichsdaten zum Schmelzpunkt in der Literatur vor [210].

69

1-(Phenylsulfonyl)-1*H*-indol-5-amin [208]Reduktion von **67** nach AV 3.

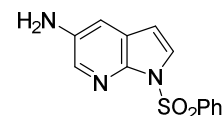
Ausbeute: 13 mmol aus 16 mmol → 81% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 117.8 – 118.2 °C (Lit. 116.4 – 116.8 °C) [208].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.89 (s, 1H, ArH), 7.86 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.67 (dt, *J* = 4.4, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.65 – 7.59 (m, 2H, ArH), 7.55 (ddd, *J* = 7.8, 4.7, 3.0 Hz, 3H, ArH), 6.63 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.61 – 6.56 (m, 1H, ArH), 4.97 (s, 2H, NH₂).

Lit. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.90 – 7.86 (m, 2H), 7.69 – 7.63 (m, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 4H), 6.64 – 6.58 (m, 3H), 4.97 (bs, 2H) [208].

70

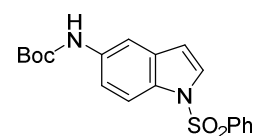
1-(Phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-amin [210]Reduktion von **68** nach AV 3.

Ausbeute: 14 mmol aus 15 mmol → 90% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 243 °C.¹³

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.11 – 7.92 (m, 2H, ArH), 7.76 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.71 – 7.62 (m, 2H, ArH), 7.62 – 7.53 (m, 2H, ArH), 7.09 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, ArH), 6.59 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, ArH), 5.17 (bs, 2H, NH₂).

71

***tert*-Butyl-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-5-ylcarbammat** [208]*tert*-Butyloxycarbonyl Schützung von **69** nach AV 4.

Ausbeute: 12 mmol aus 13 mmol → 93% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 172.0 °C (Lit. 168.8 – 169.6 °C) [208].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.38 (s, 1H, NH), 7.93 (dd, *J* = 5.3, 3.4 Hz, 2H, ArH), 7.79 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.75 – 7.64 (m, 3H, ArH), 7.56 (dd, *J* = 10.4, 4.8 Hz, 2H, ArH), 7.35 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.78 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, ArH), 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃).

Lit. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.37 (s, 1H), 7.94 (td, 2H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 3.4 Hz), 7.80 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.73 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 7.68 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.57 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.35 (dd, 1H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 9.0 Hz), 6.78 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 1.46 (s, 9H) [208].

¹³ Es liegen keine Vergleichsdaten zu NMR und Schmelzpunkt in der Literatur vor [210].

72

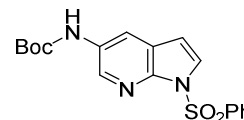
tert-Butyl-1-(phenylsulfonyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-5-ylcarbamate [210, 213]

tert-Butyloxycarbonyl Schützung von **70** nach AV 4.

Ausbeute: 12 mmol aus 14 mmol → 86% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 278 °C (Zersetzung).¹⁴

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.32 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 8.15 – 8.08 (m, 2H, ArH), 8.06 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, ArH), 7.72 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.61 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 6.89 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, ArH), 1.35 (s, 9H, (CH₃)₃).



74

tert-Butyl-(4-methyl-5-nitropyridin-2-yl)carbamate [214]

Darstellung aus **73** nach Lougiakis *et al.* [214].

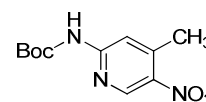
Ausbeute: 15 mmol aus 33 mmol → 45% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 187.5 – 189.0 °C (Lit. 186 °C) [214].

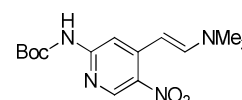
Umkristallisation: EtOH.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.56 (s, 1H, NH), 8.92 (s, 1H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 2.58 (s, 3H, CH₃), 1.49 (s, 9H, (CH₃)₃).

Lit. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.43 (bs, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 2.69 (s, 3H), 1.59 (s, 9H) [214].



77

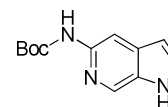
(E)-tert-Butyl-(4-(2-(dimethylamino)vinyl)-5-nitropyridin-2-yl)carbamate

tert-Butyl(4-methyl-5-nitropyridin-2-yl)carbamate **74** (29 mmol) wurde in DMF gelöst und mit 1.5 equiv. DMFDMA (32 mmol) und 2 ml Pyrrolidin 30 min bei 60 °C gerührt. Danach wurde auf RT abgekühlt, auf dest. H₂O gegossen und abgesaugt (Vorschrift modifiziert nach Filla *et al.* [215]). Das Produkt konnte nach NMR-Kontrolle ohne weitere Reinigung zu **78** umgesetzt werden. Ausbeute: 26 mmol aus 29 mmol → 90% (orangefarbener Feststoff).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.97 (s, 1H, NH), 8.71 (s, 1H, ArH), 7.86 (s, 1H, ArH), 7.78 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, CH), 5.89 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, CH), 1.91 (s, 3H, CH₃), 1.48 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.23 (s, 3H, CH₃).

¹⁴ Es liegen keine Vergleichsdaten zu NMR und Schmelzpunkt in der Literatur vor [210, 213].

78

tert-Butyl-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-5-ylcarbamate [216]

Darstellung aus **77** in Anlehnung an die Vorschrift von Andaloussi *et al.* [216].

Das Enamin **77** (8.0 mmol) wurde in Methanol/THF (2:1, v/v) gelöst und unter Rühren mit Pd/C (10%) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 70 °C im Autoklaven (Wasserstoffatmosphäre 40 bar) gerührt. Der Katalysator wurde am folgenden Tag über Na₂SO₄ abgesaugt, das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Ausbeute: 4.8 mmol aus 8.0 mmol → 59% (weißer Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:DCM 10:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 202.5 – 206.7 °C.¹⁵

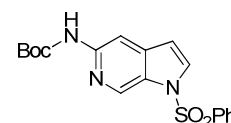
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.41 (s, 1H, NH), 9.44 (s, 1H, ArH), 8.45 (s, 1H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 7.55 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, ArH), 6.50 – 6.36 (m, 1H, ArH), 1.48 (s, 9H, (CH₃)₃).¹⁵

79

tert-Butyl-(1-(phenylsulfonyl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-5-yl)carbamate

Phenylsulfonierung von **78** nach AV 1.

Ausbeute: 14 mmol aus 22 mmol → 64% (weißer Feststoff).



Schmelzpunkt: 141.8 – 142.4 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.74 (s, 1H, NH), 8.84 (s, 1H, ArH), 8.04 (s, 1H, ArH), 8.02 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, ArH), 7.96 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, ArH), 7.76 – 7.68 (m, 1H, ArH), 7.60 (dd, *J* = 10.4, 4.8 Hz, 2H, ArH), 6.88 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, ArH), 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 1724, 1604, 1519.

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 374.1 (100) [MH⁺] (MW = 373.11 g/mol).

Anal. (C₉H₁₀N₂O): Ber. C 57.89, H 5.13, N 11.25, S 8.59. Gef. C 58.20, H 5.27, N 10.99, S 8.38.

¹⁵ Es liegen keine Vergleichsdaten zu NMR und Schmelzpunkt in der Literatur vor [216].

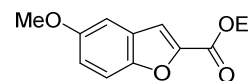
81**Ethyl-5-methoxybenzofuran-2-carboxylat** [90, 217]

Darstellung aus **80** (2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyd) nach Mahboobi *et al.* [90].

Ausbeute: 67 mmol 167 mmol → 40% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 59.3 - 61.7 °C (Lit. 62 °C) [218].

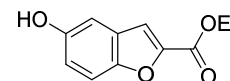
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.63 (dd, *J* = 6.6, 5.1 Hz, 2H, ArH), 7.24 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.10 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H, ArH), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.78 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, O-CH₃), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).¹⁷

**82****Ethyl-5-hydroxybenzofuran-2-carboxylat** [90, 217]

Darstellung aus **81** nach Mahboobi *et al.* [90].

Ausbeute: 40 mmol aus 59 mmol → 67% (weißer Feststoff).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.49 (s, 1H, OH), 7.60 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.05 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H, ArH), 4.33 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).¹⁷

**83****Ethyl-5-(benzyloxy)benzofuran-2-carboxylat** [90]

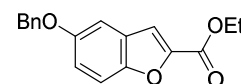
Darstellung aus **82** nach Mahboobi *et al.* [90].

Ausbeute: 34 mmol aus 40 mmol → 85% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 81.2 – 83.5 °C (Lit. 83.9 – 85.3 °C) [90].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO *d*₆): δ = 7.64 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.47 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 2H, ArH), 7.44 – 7.32 (m, 4H, ArH), 7.20 (dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz, 1H, ArH), 5.13 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

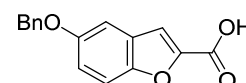
Lit. ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 7.65–7.32 (m, 8H), 7.19 (dd, 1H, *J* = 7.1 Hz, 2.5 Hz), 5.13 (s, 2H), 4.34 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz) [90].

**84****5-(Benzyloxy)benzofuran-2-carbonsäure** [90]

Darstellung aus **83** nach Mahboobi *et al.* [90].

Ausbeute: 31 mmol aus 34 mmol → 91% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 181.9 – 183.4 °C (Lit. 182.6 – 184.3 °C) [90].



¹⁷ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl₃ vor [90].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.47$ (d, $J = 8.8$ Hz, 3H, ArH), 7.44 – 7.31 (m, 3H, ArH), 7.25 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, ArH), 7.09 (s, 1H, ArH), 7.01 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, 1H, ArH), 5.12 (s, 2H, O- CH_2 -Ph).

Lit. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 13.60$ (brs, 1H), 7.58 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.31 – 7.51 (m, 7H), 7.13 (dd, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H). 5.13 (s, 2H) [90].

85

5-(Benzyloxy)-1-(phenylsulfonyl)-1H-indol [89]

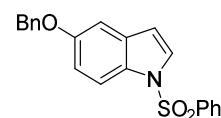
Darstellung aus 5-Benzyloxy-1H-indol (**51**) nach Mahboobi *et al.* [89].

Ausbeute: 18 mmol aus 18 mmol \rightarrow quantitativ (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 79.5 – 81.3 °C (Lit. 79 - 81 °C) [89].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.97 - 7.27$ (m, 12 H, ArH), 7.20 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, ArH), 7.02 (dd, $J = 3.5$ Hz, 8.9 Hz, 1H, ArH), 6.76 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, ArH), 5.09 (s, 2H, O- CH_2 -Ph).

Lit. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.97 - 7.27$ (m, 12 H), 7.20 (d, $J = 3.5$ Hz, 1 H), 7.02 (dd, $J = 8.9$ Hz, 3.5 Hz, 1 H), 6.76 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H) [89].



86

5-(Benzyloxy)-1-(phenylsulfonyl)-1H-indol-2-carbonsäure [89]

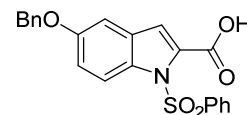
Darstellung aus **85** nach Mahboobi *et al.* [89].

Ausbeute: 89 mmol aus 71 mmol \rightarrow 80% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 175.3 °C (Lit. 175 - 178 °C) [89].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 13.62$ (s, 1H, COOH), 7.97 (m, 2H, ArH), 7.92 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, ArH), 7.70 (m, 1H, ArH), 7.60 (m, 2H, ArH), 7.45 (m, 2H, ArH), 7.36 (m, 3H, ArH), 7.25 (m, 2H, ArH), 7.15 (dd, 1H, $J = 2.6$ Hz, $J = 9.1$ Hz, ArH), 5.10 (s, 2H, O- CH_2 -Ph).

Lit. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 13.56$ (brs, 1H). 7.97 – 7.90 (m, 3H), 7.74 – 7.13 (m, 11 H), 5.11 (s, 2H) [89].



87

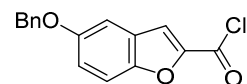
5-(Benzyloxy)benzofuran-2-carbonyl chlorid [90]

Darstellung aus **84** nach AV 2B.

Ausbeute: 20 mmol aus 13 mmol \rightarrow 65% (beiger Feststoff).

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 2854, 1759, 1736.

Lit. IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 2875, 1787, 1730 [90].



88

***tert*-Butyl-2-(5-(benzyloxy)-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-indole-2-carbonyl)-1*H*-
(phenylsulfonyl)-1*H*-indol-5-yl carbamat**

Kopplung von **71** mit **49** nach AV 5.

Ausbeute: 2 mmol aus 10 mmol → 21% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM.

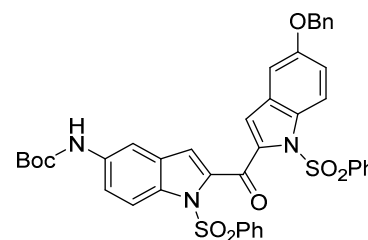
Schmelzpunkt: 122.1 – 124.5 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3396, 1723, 1533.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.54 (s, 1H, NH), 8.12 – 7.98 (m, 5H, ArH), 7.93 (s, 1H, ArH), 7.79 – 7.58 (m, 8H, ArH), 7.38 (m, 9H, ArH), 5.13 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 762.0 (100) [MH⁺] (MW = 761.19 g/mol).

Anal. (C₄₁H₃₅N₃O₈S₂): Ber. C 64.64, H 4.63, N 5.52, S 8.42. Gef. C 64.31, H 4.93, N 5.44, S 8.17.



89

***tert*-Butyl-(2-(5-(benzyloxy)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)
carbamat**

Kopplung von **72** mit **49** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonyl-Entschützung nach AV 6A

Ausbeute: 7.1 mmol aus 10.7 mmol → 66% (2 Stufen, beiger Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc/THF.

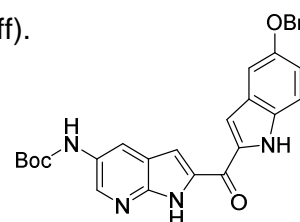
Schmelzpunkt: 197.7 °C

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3299, 1694, 1525.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.34 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH), 9.47 (s, 1H, NH), 8.44 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.30 (s, 1H, ArH), 7.50 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, ArH), 7.42 (m, 4H, ArH), 7.37 – 7.31 (m, 1H, ArH), 7.27 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.07 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 5.14 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 1.50 (d, *J* = 9.1 Hz, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 483.2 (100) [MH⁺] (MW = 482.20 g/mol).

Anal. (C₂₈H₂₆N₄O₄ × 1/4 EtOAc): Ber. C 69.07, H 5.55, N 11.07. Gef. C 68.96, H 5.40, N 11.43.



90

tert-Butyl-(2-(5-(benzyloxy)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-5-yl) carbamat

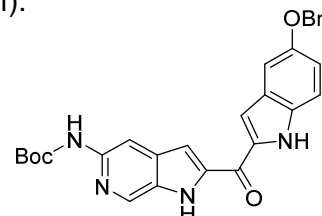
Kopplung von **79** mit **49** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylabspaltung nach AV 6A.

Ausbeute: 4.6 mmol aus 10 mmol → 41% (2 Stufen, beiger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 1:1 (v/v).

Umkristallisation: DCM.

Schmelzpunkt: 172.1 – 172.3 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3455, 3301, 1731, 1524.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.22 (s, 1H, NH), 11.96 (s, 1H, NH), 9.46 (s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, ArH), 8.04 (s, 1H, ArH), 7.54 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.49 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, ArH), 7.45 – 7.38 (m, 3H, ArH), 7.35 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.09 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H, ArH), 5.10 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 1.50 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 483.2 (100) [MH⁺] (MW = 482.20 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 483.2027. Gef. 483.2034 (C₂₈H₂₇N₄O₄) [MH⁺].

Anal. (C₂₈H₂₆N₄O₄· $\frac{1}{4}$ DCM): Ber. C 67.35, H 5.30, N 11.12. Gef. C 67.53, H 5.35, N 11.03.

91

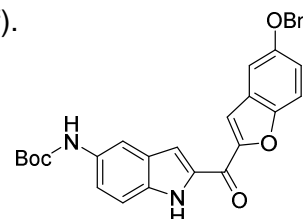
tert-Butyl-(2-(5-(benzyloxy)benzofuran-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl) carbamat

Kopplung von **71** mit **87** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylabspaltung nach AV 6A.

Ausbeute: 5.1 mmol aus 20 mmol → 26% (2 Stufen) (beiger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 20:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 226.1 – 228.0 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3419, 3301, 1712, 1606.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.93 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH), 7.92 (t, *J* = 1.9 Hz, 2H, ArH), 7.81 – 7.70 (m, 2H, ArH), 7.56 – 7.46 (m, 2H, ArH), 7.47 – 7.30 (m, 6H, ArH), 7.27 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H, ArH), 5.19 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 1.49 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 483.2 (81) [MH⁺] (MW = 482.18 g/mol).

Anal. (C₂₉H₂₆N₂O₅): Ber. C 72.18, H 5.43, N 5.81. Gef. C 72.17, H 5.63, N 5.65.

92

tert-Butyl-(2-(5-(benzyloxy)benzofuran-2-carbonyl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-5-yl)carbamate

Kopplung von **79** und **87** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylabspeicherung nach AV 6A.

Ausbeute: 2.5 mmol aus 12 mmol → 21% (2 Stufen) (beiger Feststoff).

Umkristallisation: DMSO.

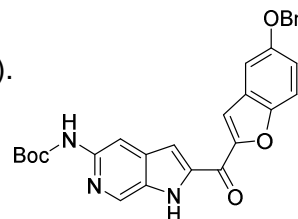
Schmelzpunkt: 220.0 – 222.0 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3327, 2977, 1607, 1549.

¹H-NMR (300 MHz, Aceton-*d*₆): δ = 11.39 (s, 1H, NH), 8.71 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, ArH), 8.26 (s, 1H, ArH), 7.92 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, ArH), 7.85 (s, 1H, ArH), 7.73 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.54 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, ArH), 7.48 – 7.39 (m, 3H, ArH), 7.39 – 7.29 (m, 2H, ArH), 5.23 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 1.54 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 484.2 (100) [MH⁺] (MW = 483.18 g/mol).

Anal. (C₂₈H₂₅N₃O₅·¹/₅DMSO): Ber. C 68.34, H 5.29, N 8.42. Gef. C 68.37, H 5.33, N 8.23.



93

5-Methoxy-1-(phenylsulfonyl)-1H-indol [89]

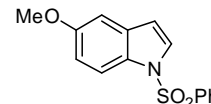
Darstellung aus 5-Methoxy-1H-indol nach Mahboobi *et al.* [89].

Ausbeute: 56 mmol aus 170 mmol → 80% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 97.3 – 98.5 °C (Lit. 97 - 98 °C) [89].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.93 (m, 2 H, ArH), 7.83 (m, 1H, ArH), 7.76 (m, 1H, ArH), 7.68 (m, 1H, ArH), 7.57 (m, 1H, ArH), 7.11 (m, 1H, ArH), 6.95 (m, 1H, ArH), 6.77 (m, 1H, ArH), 3.73 (s, 3H).

Lit. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 7.91-7.95 (m, 2H), 7.81-7.84 (m, 1H), 7.75-7.77 (m, 1H), 7.64-7.71 (m, 1H), 7.54-7.61 (m, 2H), 7.11-7.12 (m, 1H), 6.92-6.97 (m, 1H), 6.77-6.78 (m, 1H), 3.73 (s, 3H) [89].



97

(5-(Benzyloxy)-1*H*-indol-2-yl)-(4-nitrophenyl)methanon

Kopplung von **85** mit **94** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylentschützung nach AV 6B.

Ausbeute: 9.4 mmol aus 11.0 mmol → 85% (2 Stufen) (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): PE:EtOAc 9:2 (v/v).

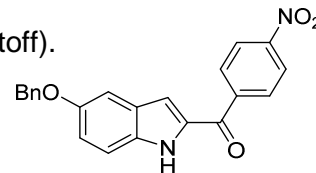
Schmelzpunkt: 233.1 - 233.7 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3302, 1619, 1595, 1516.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.03 (s, 1H, Indol-NH), 8.45 – 8.36 (m, 2H, ArH), 8.18 – 8.09 (m, 2H, ArH), 7.50 – 7.30 (m, 6H, ArH), 7.24 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.10 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.05 (s, 1H, ArH), 5.11 (s, 2H, O-CH₂-Bn).

EI-MS (70 eV) *m/z* (%): 91.1 [C₇H₇⁺] (100), 372.2 (20) [MH⁺] (MW = 372.11 g/mol).

Anal. (C₂₂H₁₆N₂O₄): Ber. C 70.96, H 4.33, N 7.52. Gef. C 71.12, H 4.27, N 7.36.



98

(5-Methoxy-1*H*-indol-2-yl)-(4-nitrophenyl)methanon [219]¹⁸

Kopplung von **93** mit **94** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylentschützung nach AV 6B.

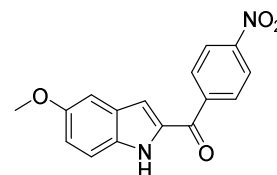
Ausbeute: 0.4 mmol aus 10.0 mmol → 4% (2 Stufen) (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM.

Umkristallisation: DCM/Hexan.

Schmelzpunkt: 166.5 °C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.02 (s, 1H, Indol-NH), 8.50 – 8.33 (m, 2H, ArH), 8.19 – 8.01 (m, 2H, ArH), 7.42 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.14 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.06 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.02 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H, ArH), 3.76 (s, 3H, O-CH₃).



¹⁸ Es liegen keine Vergleichsdaten zu NMR und Schmelzpunkt in der Literatur vor [219].

101

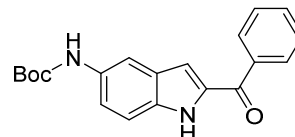
tert-Butyl-(2-benzoyl-1H-indol-5-yl)carbamat

Kopplung von **71** mit **99** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylentschützung nach AV 6B.

Ausbeute: 7.2 mmol aus 10.7 mmol → 67% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM: EtOAc 10:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 230.5 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3390, 3302, 1739, 1622, 1517.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.86 (s, 1H, Indol-NH), 9.23 (s, 1H, NH), 7.92 (dd, *J* = 5.2, 3.3 Hz, 2H, ArH), 7.84 (s, 1H, ArH), 7.68 (ddd, *J* = 6.5, 3.8, 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.63 – 7.54 (m, 2H, ArH), 7.40 – 7.32 (m, 2H, ArH), 7.05 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 1.48 (s, 9H, (CH₃)₃).

ES-MS (70 eV) *m/z* (%): 337.0 (70) [MH⁺] (MW = 336.15 g/mol).

Anal. (C₂₀H₂₀N₂O₃): Ber. C 71.41, H 5.99, N 8.33. Gef. C 71.54, H 6.27, N 7.95.

102

(5-Amino-1H-indol-2-yl)(phenyl)methanon

Entschützung von **101** nach AV 7.

Ausbeute: 2.9 mmol aus 2.9 mmol → 97% (weißer Feststoff).

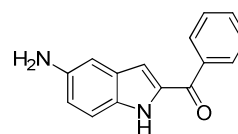
Schmelzpunkt: 163.5 – 164.5 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3409, 3347, 1610, 1528.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.56 (s, 1H, Indol-NH), 7.93 – 7.86 (m, 2H, ArH), 7.70 – 7.62 (m, 1H, ArH), 7.61 – 7.52 (m, 2H, ArH), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 6.80 – 6.73 (m, 2H, ArH), 4.91 (bs, 2H, NH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 236.0 (100) [MH-Radikal] (MW = 236.09 g/mol).

Anal. (C₁₅H₁₂N₂Ox^{1/5}H₂O): Ber. C 75.11, H 5.21, N 11.68. Gef. C 75.38, H 5.13, N 11.26.¹⁹

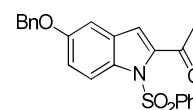


104

1-(5-Benzyloxy-1-phenylsulfonyl-1H-indol-2-yl)ethan-1-on

Darstellung aus **85** in Anlehnung an die Vorschrift von Smart *et al.* [220].

Ausbeute: 25 mmol aus 28 mmol → 89% (weißer Feststoff).



¹⁹Der gefundene Elementaranalysenwert für N weicht um 0.42% von der Theorie ab.

Umkristallisation: EtOH.

Schmelzpunkt: 155.6 – 159.1 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 1672, 1530.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.89 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.74 – 7.66 (m, 1H, ArH), 7.59 (dd, *J* = 10.4, 4.8 Hz, 2H, ArH), 7.51 (s, 1H, ArH), 7.49 – 7.43 (m, 2H, ArH), 7.43 – 7.30 (m, 3H, ArH), 7.27 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.20 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H, ArH), 5.13 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 2.59 (s, 3H, CH₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 406.1 (100) [MH⁺] (MW = 405.10 g/mol).

Anal. (C₂₃H₁₉NO₄S): Ber. C 68.13, H 4.72, N 3.45, S 7.91. Gef. C 67.98, H 4.76, N 3.37, S 7.71.

106

1-(5-Benzyloxy-1-phenylsulfonyl-1*H*-indol-2-yl)-2-bromethan-1-on

Vorschrift modifiziert nach Mahboobi *et al.* [105] und Wagle *et al.* [107]: CuBr₂ (2.0 equiv.) wurde in 20 ml EtOAc gelöst und mit 10 Tropfen HBr (72%) versetzt. Nach Erhitzen zum Reflux wurden 1.0 g **104** (2.5 mmol) in Chloroform gelöst und zur Reaktionsmischung getropft. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz über Celite abgesaugt und die organische Phase zweimal mit H₂O (dest.), zweimal mit wässriger NaHCO₃ und mit wässriger NaCl extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeeengt und *in vacuo* getrocknet. Ausbeute: 0.9 mmol aus 2.5 mmol → 36% (beiger Feststoff).

Umkristallisation: EtOH.

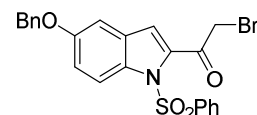
Schmelzpunkt: 139.9 – 141.4 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 1672, 1530.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.01 (ddd, *J* = 14.1, 9.0, 3.2 Hz, 3H, ArH), 7.79 – 7.70 (m, 2H, ArH), 7.63 (td, *J* = 7.6, 4.2 Hz, 2H, ArH), 7.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, ArH), 7.44 – 7.32 (m, 4H, ArH), 5.27 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 5.02 (s, 2H, CH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 484.02 ⁷⁹BrC₂₃H₁₈NO₄S (91) [MH⁺]. 486.02 ⁸¹BrC₂₃H₁₈NO₄S (90) [MH⁺] (MW = 483.01 g/mol).

Anal. (C₂₃H₁₈BrNO₄S): Ber. C 57.03, H 3.75, N 2.89, S 6.62. Gef. C 57.04, H 3.76, N 2.62, S 6.51.



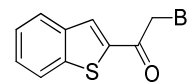
107**1-(Benzo[*b*]thiophen-2-yl)-2-bromethan-1-on [108]**

Darstellung aus **103** (Benzo[*b*]thiophen) nach Debray *et al.* synthetisiert [108].

Ausbeute: 17 mmol aus 24 mmol → 73% (2 Stufen) (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 110.2 – 113.5 °C (Lit. 114 – 1116 °C) [108].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.50 (s, 1H, ArH), 8.12 – 8.03 (m, 2H, ArH), 7.54 (dtd, *J* = 14.9, 7.2, 1.2 Hz, 2H, ArH), 4.97 (s, 2H, CH₂).²⁰

**110****Benzo[*b*]thiophen-2-yl(5-nitrobenzofuran-2-yl)methanon**

Kopplung von **107** mit **108** nach AV 5B.

Ausbeute: 11 mmol aus 60 mmol → 18% (beiger Feststoff).

Schmelzpunkt: 217.7 – 218.8 °C.

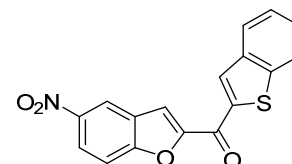
IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 2626, 2547, 1510.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.84 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.83 (s, 1H, ArH), 8.46 (dd, *J* = 9.2, 2.5 Hz, 1H, ArH), 8.26 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, ArH), 8.20 – 8.05 (m, 3H, ArH), 7.66 – 7.50 (m, 2H, ArH).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 324.0 (100) [MH⁺] (MW = 323.03 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 324.0325. Gef. 324.0325 (C₁₇H₁₀NO₄S) [MH⁺].

Anal. (C₁₇H₉NO₄S): Ber. C 63.15, H 2.81, N 4.33, S 9.92. Gef. C 63.40, H 2.94, N 4.20, S 9.84.

**111****(5-Benzyloxy-1*H*-indol-2-yl)(5-nitrobenzofuran-2-yl)methanon**

Kopplung von **106** mit **108** nach AV 5B mit anschließender Phenylsulfonylentschützung nach AV 6A.

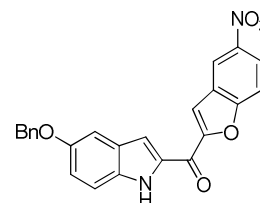
Ausbeute: 0.6 mmol aus 2.3 mmol → 27% (2 Stufen) (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): PE:EtOAc 5:2 (v/v).

Umkristallisation: DCM/MeOH.

Schmelzpunkt: 278.2 – 281.1 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3292, 2862, 1610, 1557.



²⁰ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl₃ vor [108].

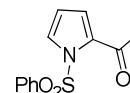
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.08 (s, 1H, Indol-NH), 8.83 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 8.44 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H, ArH), 8.18 (s, 1H, ArH), 8.09 (d, J = 9.2 Hz, 1H, ArH), 7.76 (s, 1H, ArH), 7.49 (d, J = 6.8 Hz, 2H, ArH), 7.45 – 7.27 (m, 5H, ArH), 7.12 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H, ArH), 5.15 (s, 2H, O- CH_2 -Ph).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 413.1 (100) [MH^+] (MW = 412.11 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$): Ber. C 69.90, H 3.91, N 6.79. Gef. C 69.72, H 3.95, N 6.74.

115

1-(1-Phenylsulfonyl-1H-pyrrol-2-yl)ethan-1-on [221]



Phenylsulfonierung von **112** (1-(1H-pyrrol-2-yl)ethanon) nach AV 1.

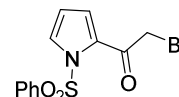
Ausbeute: 11 mmol aus 18 mmol \rightarrow 61% (braunes Öl; Feststoff laut Literatur [221]).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.99 – 7.89 (m, 3H, ArH), 7.77 – 7.69 (m, 1H, ArH), 7.69 – 7.59 (m, 2H, ArH), 7.45 – 7.37 (m, 1H, ArH), 6.54 (dd, J = 17.5, 14.0 Hz, 1H, ArH), 2.32 (s, 3H, Methyl).²¹

Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung zu **116** umgesetzt.

116

2-Brom-1-(1-phenylsulfonyl-1H-pyrrol-2-yl)ethan-1-on [222]



Bromierung von **115** analog zu **106**.

Ausbeute: 4.6 mmol aus 10.4 mmol \rightarrow 44% (beiger Feststoff).

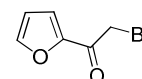
Umkristallisation: EtOH.

Schmelzpunkt: 92.3 – 94.1 °C (Lit. 89 – 91 °C) [222].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.02 (dd, J = 3.2, 1.7 Hz, 2H, ArH), 7.98 (d, J = 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.77 – 7.72 (m, 1H, ArH), 7.69 – 7.63 (m, 2H, ArH), 7.58 (dd, J = 3.9, 1.6 Hz, 1H, ArH), 6.63 – 6.55 (m, 1H, ArH), 4.65 (s, 2H, CH_2).²²

117

2-Brom-1-(furan-2-yl)ethan-1-on [109]



Darstellung aus **113** (1-(furan-2-yl)ethanon) nach Lapointe *et al.* [109].

Ausbeute: 9 mmol aus 47mmol \rightarrow 18% (beiger Feststoff).

Schmelzpunkt: 32.3 - 35.2 °C (Lit. 34.5 - 36 °C) [223].

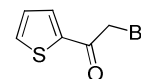
²¹ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl_3 vor [221].

²² Es liegen keine Vergleichsdaten zu NMR in der Literatur vor [222].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.10$ (ddd, $J = 4.9, 4.4, 1.1$ Hz, 2H, ArH), 7.29 (dd, $J = 4.9, 3.9$ Hz, 1H, ArH), 4.84 (s, 2H, CH_2).²³

118

2-Brom-1-(thiophen-2-yl)ethan-1-on [224]



Darstellung aus **114** (1-(thiophen-2-yl)ethanon) nach Roman *et al.* [224].

Ausbeute: 20 mmol aus 50 mmol \rightarrow 40% (gelbes Öl).

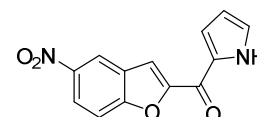
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.09$ (dd, $J = 1.6, 0.5$ Hz, 1H, ArH), 7.70 – 7.62 (m, 1H, ArH), 6.78 (dd, $J = 3.7, 1.7$ Hz, 1H, ArH), 4.65 (s, 2H, CH_2).²⁴

119

5-Nitrobenzofuran-2-yl(1H-pyrrol-2-yl)methanon²⁵

Kopplung von **116** mit **108** nach AV 5B mit anschließender Phenylsulfonylentschützung nach AV 6A.

Ausbeute: 5.5 mmol aus 17 mmol \rightarrow 32% (gelber Feststoff).



Schmelzpunkt: 244.0 – 246.9 °C.

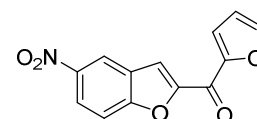
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 12.35$ (s, 1H, NH), 8.79 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, ArH), 8.40 (dd, $J = 9.1, 2.5$ Hz, 1H, ArH), 8.04 (dd, $J = 9.2, 5.0$ Hz, 2H, ArH), 7.58 – 7.50 (m, 1H, ArH), 7.34 (s, 1H, ArH), 6.39 (dd, $J = 3.9, 2.4$ Hz, 1H, ArH).

120

Furan-2-yl(5-nitrobenzofuran-2-yl)methanon

Kopplung von **117** mit **108** nach AV 5B.

Ausbeute: 7.4 mmol aus 8.6 mmol \rightarrow 87% (beiger Feststoff).



Umkristallisation: 2-Butanon.

Schmelzpunkt: 247.4 – 248.7 °C.

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 1631, 1515.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.86$ (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 8.43 (dd, $J = 9.2, 2.5$ Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, $J = 0.9$ Hz, 2H, ArH), 8.06 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, ArH), 7.89 (dd, $J = 3.6, 0.5$ Hz, 1H, ArH), 6.92 (dd, $J = 3.7, 1.7$ Hz, 1H, ArH).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 258.0 (100) [MH^+] (MW = 257.03 g/mol).

²³ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl_3 vor [109].

²⁴ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl_3 vor [224].

²⁵ Kommerziell erhältlich, jedoch keine Originalliteraturdaten zu experimentellen Daten verfügbar.

Anal. (C₁₃H₇NO₅): Ber. C 60.71, H 2.74, N 5.45. Gef. C 60.46, H 2.86, N 5.35.

121

5-Nitrobenzofuran-2-yl(thiophen-2-yl)methanon

Kopplung von **118** mit **108** nach AV 5B.

Ausbeute: 14 mmol aus 20 mmol → 73% (beiger Feststoff).

Umkristallisation: 2-Butanon.

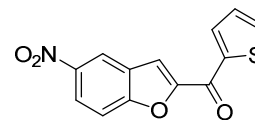
Schmelzpunkt: 182.3 – 182.9 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 1618, 1514.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.48 – 8.37 (m, 2H), 8.25 (dd, *J* = 4.9, 1.1 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 4.9, 3.9 Hz, 1H).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 274.0 (100) [MH⁺] (MW = 273.01 g/mol).

Anal. (C₁₃H₇NO₄S): Ber. C 57.14, H 2.58, N 5.13, S 11.73. Gef. C 57.14, H 2.72, N 5.05, S 11.66.



122

5-Amino-1*H*-indol-2-yl(5-benzyloxy-1*H*-indol-2-yl)methanon

Entschützung von **47** nach AV 7.

Ausbeute: 2.1 mmol aus 3.4 mmol → 62% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: DCM.

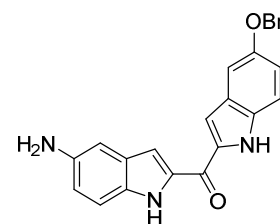
Schmelzpunkt: 187.2 - 191.2 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3375, 3025, 1526.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.78 (s, 1H, Indol-NH), 11.51 (s, 1H, Indol-NH), 7.47 (t, *J* = 9.7 Hz, 2H, ArH), 7.44 – 7.29 (m, 5H, ArH), 7.24 (dt, *J* = 16.0, 4.8 Hz, 3H, ArH), 7.09 – 6.97 (m, 1H, ArH), 6.88 – 6.65 (m, 2H, ArH), 5.13 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 4.80 (s, 2H, NH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 382.0 (100) [MH⁺] (MW = 381.15 g/mol)

Anal. (C₂₄H₁₉N₃O₂x^{1/4}H₂O): Ber. C 74.69, H 5.09, N 10.89. Gef. C 74.66, H 5.37, N 10.79.



123

tert-Butyl-(2-(5-hydroxybenzofuran-2-carbonyl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-5-yl)carbamate

Darstellung aus **92** nach AV 8.

Ausbeute: 1.0 mmol aus 2.3 mmol → 45% (weißer Feststoff).

Umkristallisation: Heptan.

Schmelzpunkt: 310 °C (Zersetzung).

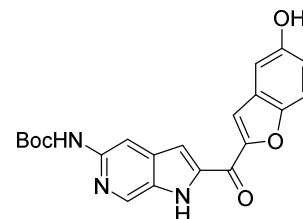
IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3317, 1611, 1550.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.29 (s, 1H, Indol-NH), 9.57 (s, 1H, OH), 9.47 (s, 1H, NH), 8.61 (s, 1H, ArH), 8.06 (s, 1H, ArH), 7.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.14 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.06 (m, 1H, ArH), 1.49 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 394.1 (100) [MH⁺] (MW = 393.13 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 394.1397. Gef. 394.1404 (C₂₁H₂₀N₃O₅) [MH⁺].

Anal. (C₂₁H₁₉N₃O₅·1/2Heptan): Ber. C 66.35, H 6.14, N 9.47. Gef. C 66.23, H 6.04, N 9.11.



124

tert-Butyl-(2-(5-hydroxy-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl)carbamate

Entschützung von **47** nach AV 8.

Ausbeute: 19 mmol aus 25 mmol → 77% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc.

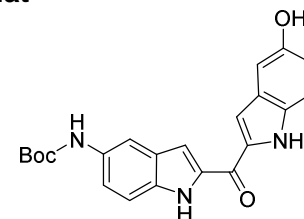
Schmelzpunkt: 225.5 – 225.7 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3529, 3345, 2982, 1585, 1534.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.78 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Indol-NH), 11.66 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, OH), 9.23 (s, 1H, Indol-NH), 8.98 (s, 1H, NH), 7.86 (s, 1H, ArH), 7.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.42 – 7.27 (m, 4H, ArH), 7.00 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.85 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, ArH), 1.49 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 392.0 (80) [MH⁺] (MW = 391.15 g/mol).

Anal. (C₂₂H₂₁N₃O₄): Ber. C 67.51, H 5.41, N 10.74. Gef. C 67.19, H 5.34, N 10.74.



125

tert-Butyl-(2-(5-hydroxy-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-5-yl)carbamate

Entschützung von **90** nach AV 8.

Ausbeute: 2.1 mmol aus 4.6 mmol → 59%.

Umkristallisation: EtOAc.

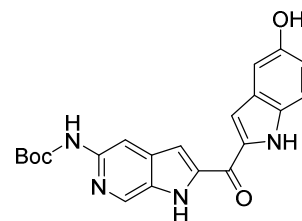
Schmelzpunkt: 288.4 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3439, 3334, 2978, 1522.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.18 (s, 1H, Indol-NH), 11.79 (s, 1H, OH), 9.45 (s, 1H, Indol-NH), 9.05 (s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, ArH), 8.04 (s, 1H, ArH), 7.50 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.89 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, ArH), 1.50 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 393.2 (100) [MH⁺] (MW = 392.15 g/mol).

Anal. (C₂₁H₂₀N₄O₄·¹/₅EtOAc): Ber. C 63.86, H 5.31, N 13.66. Gef. C 63.50, H 5.18, N 13.94.



126

tert-Butyl-(2-(5-hydroxybenzofuran-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)carbamate

Entschützung von **91** nach AV 8.

Ausbeute: 0.18 mmol aus 5.14 mmol → 35% (weißer Feststoff).

Umkristallisation: DCM/EtOAc.

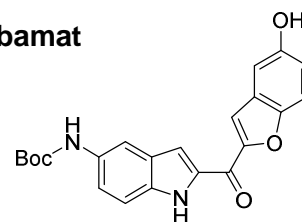
Schmelzpunkt: 217.3 – 220.2 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3311, 2978, 1552.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.91 (s, 1H, Indol-NH), 9.54 (s, 1H, OH), 9.27 (bs, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, ArH), 7.87 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, ArH), 7.72 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.38 (s, 2H, ArH), 7.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.03 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H, ArH), 1.50 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 393.1 (100) [MH⁺] (MW = 392.14 g/mol).

Anal. (C₂₂H₂₀N₂O₅·¹/₃H₂O): Ber. C 66.32, H 5.23, N 7.03. Gef. C 66.45, H 5.24, N 7.03.



127**(5-Amino-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-2-yl)(5-hydroxybenzofuran-2-yl)methanon**Entschützung von **123** nach AV 8.

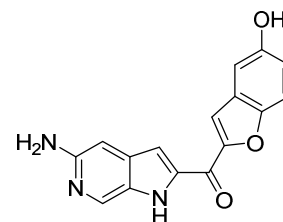
Ausbeute: 0.5 mmol aus 1.0 mmol → 50%.

Umkristallisation: THF.

Schmelzpunkt: 261.0 – 263.0 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3425, 1678, 1571.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.56 (s, 1H, Indol-NH), 9.67 (s, 1H, OH), 8.48 (s, 1H, ArH), 8.06 (s, 1H, ArH), 7.68 – 7.61 (m, 2H, ArH), 7.19 (s, 1H, ArH), 7.15 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.10 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H, ArH).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 294.1 (100) [MH⁺] (MW = 293.08 g/mol).HR-MS (120 eV) *m/z*. Ber. 294.0873. Gef. 294.0876 (C₁₆H₁₂N₃O₃) [MH⁺].Anal. (C₁₈H₁₂F₃N₃O₅·0.59 THF): Ber. C 54.36, H 3.75, N 9.34. Gef. C 53.96, H 4.15, N 9.31.**128****(5-Amino-1*H*-indol-2-yl)(5-hydroxy-1*H*-indol-2-yl)methanon**Entschützung von **124** nach AV 8.

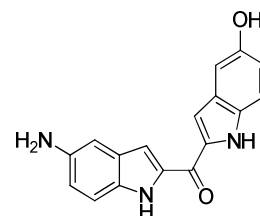
Ausbeute: 2.1 mmol aus 2.8 mol → 74% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: DCM.

Schmelzpunkt: 289.1 - 290.4 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3416, 1603, 1534.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.61 (s, 1H, Indol-NH), 11.47 (s, 1H, OH), 8.97 (s, 1H, Indol-NH), 7.35 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 11.9, 4.9 Hz, 2H, ArH), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.02 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 6.83 (dt, *J* = 7.8, 3.9 Hz, 1H, ArH), 6.80 – 6.69 (m, 2H, ArH), 4.72 (bs, 2H, NH₂).

CI-MS (120 eV) *m/z* (%): 292.0 (100) [MH⁺] (MW = 291.10 g/mol).Anal. (C₁₇H₁₃N₃O₂·¹/₆H₂O): Ber. C 69.38, H 4.50, N 14.28. Gef. C 69.32, H 4.61, N 14.26.

129

(5-Amino-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-2-yl)(5-hydroxy-1*H*-indol-2-yl)methanon

Entschützung von **125** nach AV 8.

Ausbeute: 0.4 mmol aus 2.1 mmol → 19% (beiger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc/MeOH 97.5:2.5 (v/v).

Umkristallisation: DCM

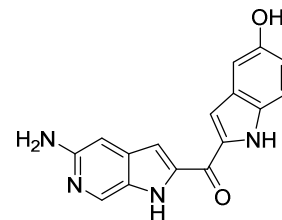
Schmelzpunkt: 354.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3432, 3323, 1627, 1522.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.73 (s, 2H, Indol-NH), 9.02 (s, 1H, OH), 8.37 (s, 1H, ArH), 7.43 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.23 (s, 1H, ArH), 7.01 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.87 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.65 (s, 1H, ArH), 5.23 (s, 2H, NH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 293.1 (100) [MH⁺] (MW = 292.30 g/mol).

Anal. (C₁₆H₂₁N₄O₂·xH₂O): Ber. C 61.93, H 4.55, N 18.06. Gef. C 62.13, H 4.46, N 17.20.²⁶



131

(4-Aminophenyl)(5-hydroxy-1*H*-indol-2-yl)methanon

Reduktion und Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe von **97** nach AV 8.

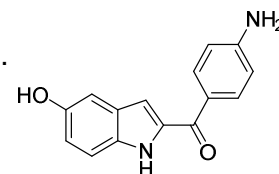
Ausbeute: 1.98 mmol aus 9.34 mmol → 21% (rotes Öl).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3395, 1641, 1583, 1555.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.45 (s, 1H, Indol-NH), 8.90 (s, 1H, OH), 7.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH), 7.29 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, ArH), 6.92 (dd, *J* = 18.5, 1.7 Hz, 2H, ArH), 6.80 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.70 – 6.57 (m, 2H, ArH), 6.05 (s, 2H, NH₂).

EI-MS (70 eV) *m/z* (%): 252.1(100) [M⁺ Radikal] (MW = 252.09 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 253.0972. Gef. 253.0976 (C₁₅H₁₃N₂O₂) [MH⁺].



²⁶ Der gefundene Elementaranalysenwert für N weicht um 0.86% von der Theorie ab.

132

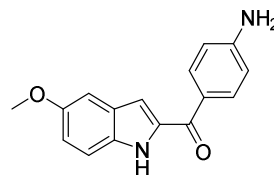
(4-Aminophenyl)(5-methoxy-1*H*-indol-2-yl)methanon [219]

Reduktion von **98** nach AV 8.

Ausbeute: 1.01 mmol aus 1.35 mmol → 75% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 149.2 - 149.7 °C.²⁷

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.60 (s, 1H, Indol-NH), 7.78 (s, 1H, ArH), 7.76 (s, 1H, ArH), 7.37 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.14 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.98 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 6.92 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.69 – 6.65 (m, 1H, ArH), 6.65 – 6.62 (m, 1H, ArH), 6.08 (s, 2H, NH₂), 3.76 (s, 3H, O-CH₃).



133

(5-Aminobenzofuran-2-yl)(benzo[*b*]thiophen-2-yl)methanon

Reduktion von **110** nach AV 8.

Ausbeute: 4.43 mmol aus 5.26 mmol → 84% (hellgelber Feststoff).

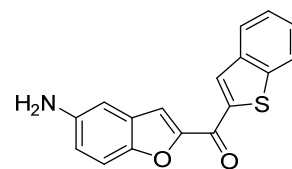
Schmelzpunkt: 159.6 – 162.0 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3542, 1624, 1554, 1512.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.72 (s, 1H), 8.13 (dd, *J* = 8.5, 7.8 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.63 – 7.46 (m, 3H), 6.96 – 6.87 (m, 2H), 5.21 (s, 2H).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 294.1 (100) [MH⁺] (MW = 293.05 g/mol).

Anal. (C₁₇H₁₁NO₂S): Ber. C 69.61, H 3.78, N 4.78, S 10.93. Gef. C 69.36, H 3.84, N 4.69, S 10.93.



134

(5-Aminobenzofuran-2-yl)(5-hydroxy-1*H*-indol-2-yl)methanon

Reduktion und Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe von **111** nach AV 8.

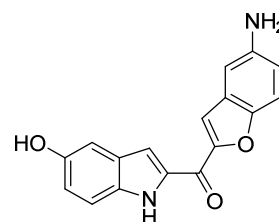
Ausbeute: 0.34 mmol aus 0.97 mmol → 35% (weißer Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:MeOH 20:1 (v/v).

Umkristallisation: DMSO.

Schmelzpunkt: 228.4 – 231.2 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3453, 1612, 1518.



²⁷ Es liegen keine Vergleichsdaten zu NMR und Schmelzpunkt in der Literatur vor [219].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.74 (s, 1H, Indol-NH), 9.04 (s, 1H, OH), 7.75 (d, J = 0.7 Hz, 1H, ArH), 7.58 (d, J = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.47 (m, 1H, ArH), 7.31 (m, 1H, ArH), 7.01 (d, J = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.88 (dd, J = 4.8, 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.86 (d, J = 2.5 Hz, 2H, ArH), 5.12 (s, 2H, NH_2).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 293.1 (100) [MH^+] (MW = 292.08 g/mol).

HR-MS (120 eV) m/z : Ber. 293.0921. Gef. 293.0924 ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$) [MH^+].

Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \frac{2}{5}\text{DMSO}$): Ber. C 66.08, H 4.49, N 8.66. Gef. C 66.04, H 4.73, N 8.14.²⁸

135

(5-Aminobenzofuran-2-yl)(1H-pyrrol-2-yl)methanon

Reduktion von **119** nach AV 8.

Ausbeute: 3.97 mmol aus 5.46 mmol \rightarrow 73% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 124.0 – 126.8 °C.

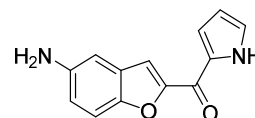
IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3453, 1605, 1555.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.12 (s, 1H, NH), 7.60 (d, J = 0.8 Hz, 1H, ArH), 7.42 (ddd, J = 5.3, 3.3, 0.9 Hz, 2H, ArH), 7.27 – 7.20 (m, 1H, ArH), 6.90 – 6.73 (m, 2H, ArH), 6.33 (dt, J = 4.5, 2.3 Hz, 1H, ArH), 5.08 (s, 2H, NH_2).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 227.1 (100) [MH^+] (MW = 226.07 g/mol).

HR-MS (120 eV) m/z : Ber. 227.0557. Gef. 227.0558 ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$) [MH^+].

Anal. ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$): Ber. C 69.02, H 4.46, N 12.38. Gef. C 68.79, H 4.56, N 12.16.



136

(5-Aminobenzofuran-2-yl)(furan-2-yl)methanon

Reduktion von **120** nach AV 8.

Ausbeute: 5.30 mmol aus 7.45 mmol \rightarrow 71% (rotes Öl).

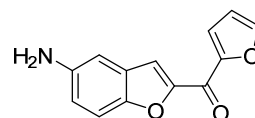
Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM.

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3359, 1620, 1543.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8.18 – 8.10 (m, 1H, ArH), 7.83 (d, J = 0.8 Hz, 1H, ArH), 7.77 – 7.72 (m, 1H, ArH), 7.49 – 7.41 (m, 1H, ArH), 6.85 (dt, J = 5.3, 1.6 Hz, 3H, ArH), 5.18 – 5.09 (m, 2H, NH_2).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 228.1 (100) [MH^+] (MW = 227.06 g/mol).

HR-MS (120 eV) m/z : Ber. 228.0657. Gef. 228.0655 ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_3$) [MH^+].



²⁸ Der gefundene Elementaranalysenwert für N weicht um 0.52% von der Theorie ab.

137

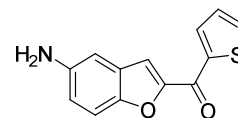
(5-Aminobenzofuran-2-yl)(thiophen-2-yl)methanonReduktion von **121** nach AV 8.

Ausbeute: 1.64 mmol aus 7.32 mmol → 22% (rotes Öl).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 2924, 1609, 1546.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.35 – 8.29 (m, 1H, ArH), 8.15 (dd, *J* = 5.0, 1.0 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, ArH), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.36 (dd, *J* = 4.9, 3.9 Hz, 1H, ArH), 6.94 – 6.81 (m, 2H, ArH), 5.15 (s, 2H, NH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 244.0 (100) [MH⁺] (MW = 243.04 g/mol).HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 244.0431. Gef. 244.0427 (C₁₃H₁₀NO₂S) [MH⁺].

141

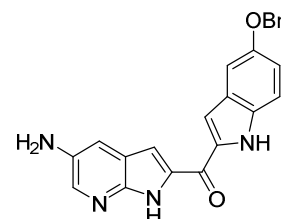
(5-Amino-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)(5-benzyloxy-1H-indol-2-yl)methanonEntschützung von **89** nach AV 7.

Ausbeute: 6.5 mmol aus 7.1 mmol → 93% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 290 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3410, 1654, 1595.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.96 (s, 1H, Indol-NH), 11.81 (s, 1H, Indol-NH), 7.99 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.49 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, ArH), 7.43 (s, 1H, ArH), 7.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, ArH), 7.34 (dd, *J* = 6.3, 3.8 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.05 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H, ArH), 5.13 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 5.04 (bs, 2H, NH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 383.2 (100) [MH⁺] (MW = 382.14 g/mol).Anal. (C₂₃H₁₈N₄O₂· $\frac{2}{3}$ H₂O): Ber. C 70.04, H 4.94, N 14.20. Gef. C 70.71, H 4.91, N 14.64.

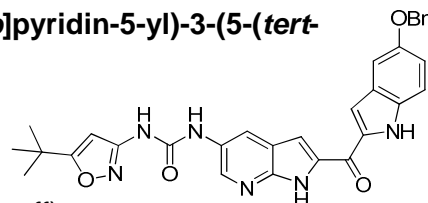
142

1-(2-(5-Benzyloxy-1H-indol-2-carbonyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-5-yl)-3-(5-(tert-butyl)isoxazol-3-yl)harnstoffKopplung von **141** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 0.64 mmol aus 2.62 mmol → 24% (brauner Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 20:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 249.7 – 252.1 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3260, 2967, 1653.

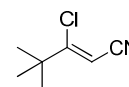
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.45 (s, 1H, NH), 11.90 (s, 1H, NH), 9.65 (s, 1H, NH), 8.92 (s, 1H, ArH), 8.43 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, ArH), 8.38 – 8.31 (m, 1H, ArH), 7.52 – 7.45 (m, 4H, ArH), 7.43 (s, 1H, ArH), 7.40 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.36 – 7.32 (m, 1H, ArH), 7.28 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.13 – 7.03 (m, 1H, ArH), 6.53 (s, 1H, Isoxazol-CH), 5.14 (s, 2H, O-CH₂-Ph), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 549.2 (100) [MH⁺] (MW = 548.22 g/mol).

Anal. (C₃₁H₂₈N₆O₄·¹/₂EtOAc): Ber. C 66.94, H 5.36, N 14.19. Gef. C 66.42, H 5.08, N 14.88.²⁹

144

(Z)-3-Chlor-4,4-dimethylpent-2-en-nitril [112]



Darstellung aus **143** analog nach Hackler *et al.* [112].

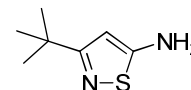
Ausbeute: 18 mmol aus 29.5 mmol → 61% (dunkelrotes Öl).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.18 (s, 1H, CH), 1.22 (s, 9H, (CH₃)₃).³⁰

IR (pure liquid): ν (cm⁻¹) = 2227 (Nitril).

147

5-Amino-3-tert-butylisothiazol [112]



Darstellung aus **144** nach Hackler *et al.* [112].

Ausbeute: 4.4 mmol aus 110 mmol → 4% (rot-brauner wachsiger Stoff; Feststoff laut Literatur [112])

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.27 (s, 1H, CH), 5.95 (bs, 2H, NH₂), 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃).³⁰

²⁹ Der gefundenen Elementaranalysenwerte für C (0.52%) und N (0.69%) weichen von der Theorie ab.

³⁰ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl₃ vor [112].

153

(E)-N-(2-((2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)ethyl)-3-(dimethylamino)acrylamid

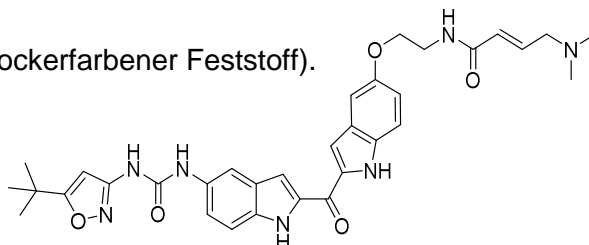
Darstellung aus **158** mit **162** in Anlehnung an die Vorschrift von Kobus *et al.* in zwei Stufen [116].

Ausbeute: 0.21 mmol aus 0.40 mmol → 50 % (ockerfarbener Feststoff).

Umkristallisation: DCM

Schmelzpunkt: 184.0 - 184.9 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3458, 1668, 1568.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.90 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH), 9.51 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, NH), 8.36 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.51 (s, 1H, ArH), 7.48 (s, 1H, ArH), 7.43 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.21 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 6.99 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.59 (dt, *J* = 15.5, 6.3 Hz, 1H, CH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.13 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, CH), 4.05 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 3.54 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂), 3.11 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 2.20 (d, *J* = 11.2 Hz, 6H, N-(CH₃)₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 612.3 (100) [MH⁺] (MW = 611.29 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*. Ber. 612.2929. Gef. 612.2938 (C₃₃H₃₇N₇O₅) [MH⁺].

154

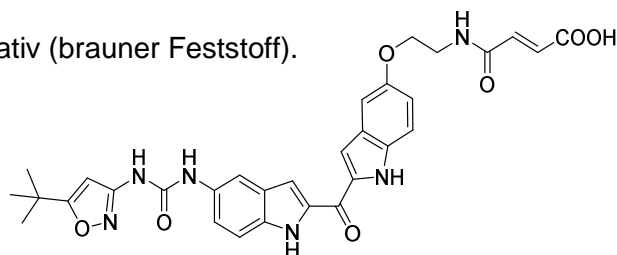
(E)-4-((2-((2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)ethyl)amino)-4-oxobut-2-ensäure

Darstellung aus **158** mit **163** in Anlehnung an die Vorschrift von Smaill *et al.* [85].

Ausbeute: 0.20 mmol aus 0.20 mmol → quantitativ (brauner Feststoff).

Schmelzpunkt: 188.6 – 190.0 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3396, 1652, 1558.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14.65 (s, 1H, COOH), 11.90 (s, 1H, NH), 11.87 (s, 1H, NH), 9.47 (s, 1H, NH), 9.31 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, NH), 7.93 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, ArH), 7.51 (s, 1H, ArH), 7.49 (s, 1H, ArH), 7.43 (dd, *J* = 8.9, 6.0 Hz, 2H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.01 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.46 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH), 6.27 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH), 4.11 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 3.60 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 599.2 (100) [MH⁺]. (MW = 598.22 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*. Ber. 599.2249. Gef. 599.2250 (C₃₁H₃₁N₆O₇) [M+H⁺].

Anal. (C₃₁H₃₀N₆O₇·xH₂O): Ber. C 60.38, H 5.23, N 13.63. Gef. C 60.01, H 5.34, N 13.59.

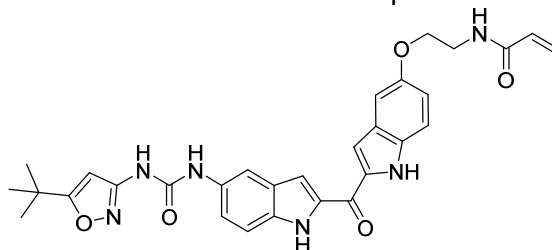
155

***N*-(2-((2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)ethyl)acrylamid**

0.4 mmol **158** wurde in 40 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 3.5 equiv. Triethylamin, 1.2 equiv. BOP und 1.1 equiv. **164** (Acrylsäure) wurde die Reaktionslösung 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von H₂O (dest.) und Extraktion mit EtOAc wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt (beiger Feststoff).

Schmelzpunkt: 146.4 – 149.0 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3304, 1527, 1225, 1195.



¹H-NMR (300 MHz, Aceton-*d*₆): δ = 10.94 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H, Indol-NH), 9.17 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, ArH), 8.13 (s, 1H, ArH), 7.66 (s, 1H, ArH), 7.60 – 7.57 (m, 2H, ArH), 7.54 (t, *J* = 9.4 Hz, 2H, ArH), 7.46 (dd, *J* = 8.8, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.27 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.01 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.49 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.36 (dd, *J* = 17.0, 9.9 Hz, 1H, CH), 6.23 (dd, *J* = 17.0, 2.5 Hz, 1H, CH), 4.15 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 3.71 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 1.35 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.4 (+, (CH₃)₃), 38.5 (-, CH₂), 66.8 (-, CH₂), 92.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 103.7 (+, CH), 109.1 (+, CH), 111.1 (+, CH), 112.9 (+, CH), 113.6 (+, CH), 117.4 (+, CH), 119.6 (+, CH), 128.2 (+, CH), 131.7 (+, CH), 132.0 (C_q), 128.0 (C_q), 133.3 (C_q), 134.4 (C_q), 135.0 (C_q), 135.2 (C_q), 151.7 (C_q), 153.1 (C_q), 158.6 (C_q), 164.9 (C_q), 165.4 (C_q), 169.6 (C_q), 176.4 (C_q, C=O, Bisindol), 180.1 (C_q).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 555.2 (100) [MH⁺] (MW = 554.2 g/mol).

155 wurde mittels präoperativer HPLC aufgereinigt: Agilent Technologies 1290 Infinity; Säule: Phenomenex Luna C18(2) 3 μ m 150 x 2.00 mm, 100A. Detektor: DADG4212A. Fluss: 0.3 ml/min. Temperatur: 25 °C.

0 min: 35% MeCN / H₂O + 0.059 % [w] TFA

nach 20 min: 65% MeCN / H₂O + 0.059 % [w] TFA

nach 35 min: 98% MeCN / H₂O + 0.059 % [w] TFA

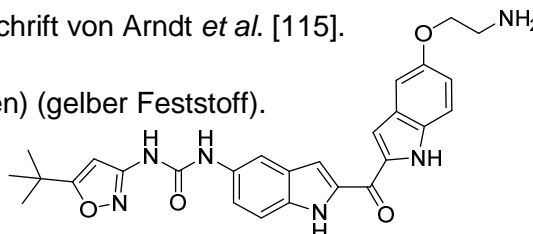
Retentionszeit (**155**): 16.06 min → 64.7% Reinheit.

158

1-(2-(5-(2-Aminoethoxy)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)-3-(5-(*tert*-butyl)isoxazol-3-yl)harnstoff

Darstellung aus **156** mit **29** in Anlehnung an die Vorschrift von Arndt *et al.* [115].

Ausbeute: 0.70 mmol aus 1.79 mmol → 39% (2 Stufen) (gelber Feststoff).



Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 2:3 (v/v) + 1% [w] NH₃

Umkristallisation: THF/PE.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.85 (s, 2H, Indol-NH), 9.03 (s, 1H, NH), 7.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.51 (s, 1H, ArH), 7.49 (s, 1H, ArH), 7.42 (t, *J* = 9.1 Hz, 2H, ArH), 7.31 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.18 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.99 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 4.03 – 3.86 (m, 2H, CH₂), 2.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 501.2 (100) [MH⁺] (MW = 500.22 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 501.2245. Gef. 501.2248 (C₂₇H₂₉N₆O₄) [MH⁺].

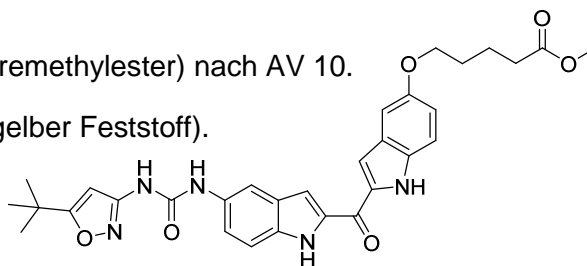
175

Methyl-5-((2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy) pentanoat

Alkylierung von **29** mit **173** (5-Bromvaleriansäuremethylester) nach AV 10.

Ausbeute: 0.72 mmol aus 0.77 mmol → 94% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 162.5 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3262, 2964, 1528.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.85 (d, *J* = 17.9 Hz, 2H, Indol-NH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.51 (s, 1H, ArH), 7.50 – 7.37 (m, 3H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.97 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.99 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 3.60 (s, 3H, O-CH₃), 2.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 1.72 (dd, *J* = 9.9, 3.3 Hz, 4H, 2xCH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 572.1 (100) [MH⁺] (MW = 571.24 g/mol).

Anal. (C₃₁H₃₃N₅O₆): Ber. C 65.14, H 5.82, N 12.25. Gef. C 65.01, H 6.00, N 12.35

176

Methyl-7-((2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy) heptanoat

Alkylierung von **29** mit **174** (7-Bromönanthsäuremethylester) nach AV 10.

Ausbeute: 0.33 mmol aus 0.77 mmol → 43% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: DCM.

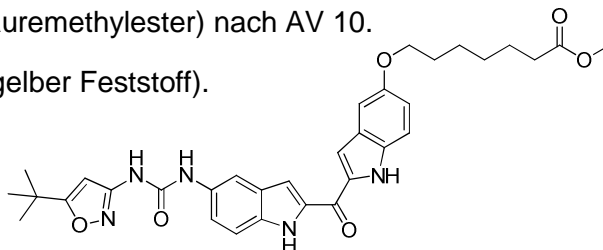
Schmelzpunkt: 134.5 – 136.5 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3286, 3030, 1713, 1567.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.89 (s, 1H, Indol-NH), 11.83 (s, 1H, Indol-NH), 9.46 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, NH), 7.92 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.51 (s, 1H, ArH), 7.50 – 7.37 (m, 3H, ArH), 7.30 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.58 (s, 3H, O-CH₃), 2.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.81 – 1.67 (m, 2H, CH₂), 1.64 – 1.50 (m, 2H, CH₂), 1.48 – 1.32 (m, 4H, 2x CH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 600.1 (100) [MH⁺] (MW = 599.27 g/mol).

Anal. (C₃₃H₃₇N₅O₆ × 1/2 EtOAc): Ber. C 65.30, H 6.42, N 10.88. Gef. C 65.27, H 6.67, N 10.57.



177

5-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy) pentansäure

Esterspaltung von **175** nach AV 11A.

Ausbeute: 0.57 mmol aus 0.61 mmol → 93% (gelber Feststoff).

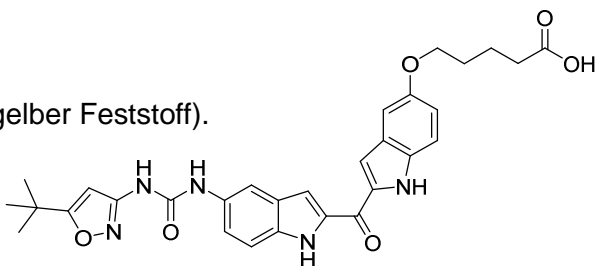
Schmelzpunkt: 190.5 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3455, 3279, 1678, 1528.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.77 (s, 1H, Indol-NH), 11.73 (s, 1H, Indol-NH), 11.30 (s, 1H, NH), 10.66 (s, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, ArH), 7.50 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H, ArH), 7.37 (t, *J* = 9.8 Hz, 3H, ArH), 7.12 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.98 – 6.91 (m, 1H, ArH), 6.53 (s, 1H, Isoxazol-CH), 4.02 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 2.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 1.78 (dd, *J* = 13.7, 6.3 Hz, 4H, 2xCH₂), 1.27 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 558.1 (100) [MH⁺] (MW = 557.23 g/mol).

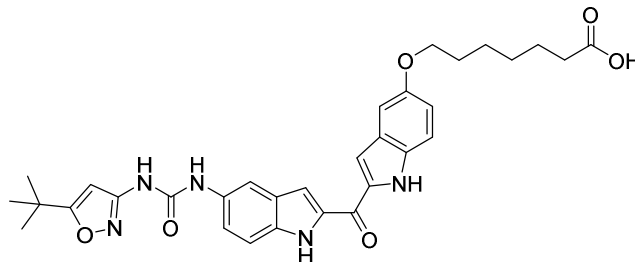
Anal. (C₃₀H₃₁N₅O₆ × 1H₂O): Ber. C 63.59; H 5.69; N 12.36. Gef. C 63.36; H 5.46; N 12.35.



178

7-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)heptansäure

Esterspaltung von **176** nach AV 11A.



Ausbeute: 0.29 mmol aus 0.33 mmol → 88% (brauner Feststoff).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.98 (s, 1H, COOH), 11.88 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Indol-NH), 11.82 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, Indol-NH), 9.46 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, NH), 7.91 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.49 – 7.37 (m, 3H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.97 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, Isoxazol-CH), 3.98 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 2.30 – 2.13 (m, 2H, CH₂), 1.88 – 1.66 (m, 2H, CH₂), 1.54 (dt, *J* = 14.7, 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.50 – 1.42 (m, 2H, CH₂), 1.41 – 1.33 (m, 2H, CH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung zu **190** umgesetzt.

180

Methyl 6-((2-(5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)hexanoat

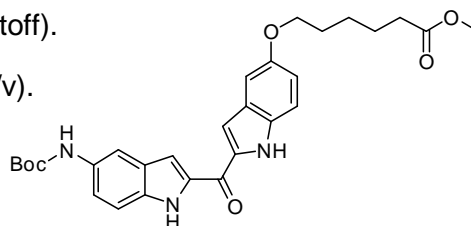
Alkylierung von **124** mit **179** (6-Bromcapronsäuremethylester) nach AV 10.

Ausbeute: 1.2 mmol aus 2.6 mmol → 46% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 5:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 67.4 – 68.2 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3363, 2933, 1719, 1527.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.80 (s, 1H, Indol-NH), 9.22 (s, 1H, NH), 7.87 (s, 1H, ArH), 7.47 (s, 2H, ArH), 7.43 – 7.32 (m, 3H, ArH), 7.16 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.98 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.59 (s, 3H, O-CH₃), 3.32 (s, 2H, CH₂), 2.42 – 2.26 (m, 2H, CH₂), 1.81 – 1.67 (m, 2H, CH₂), 1.60 (dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.50 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 520.0 (90) [MH⁺] (MW = 519.24 g/mol).

Anal. (C₂₉H₃₃N₃O₆): Ber. C 67.04, H 6.40, N 8.09. Gef. C 67.04, H 6.67, N 7.95.

181

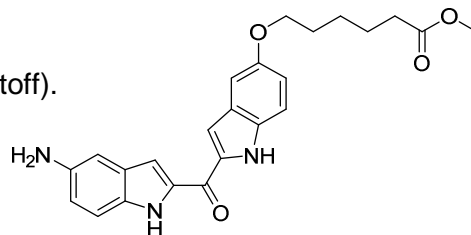
Methyl-6-((2-(5-amino-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)hexanoatEntschützung von **180** nach AV 7.

Ausbeute: 4.8 mmol aus 5.2 mmol → 91% (beiger Feststoff).

Schmelzpunkt: 67.4 – 68.2 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3282, 2947, 1666, 1532.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.18 (s, 1H, Indol-NH), 11.88 (s, 1H, Indol-NH), 9.83 (bs, 2H, NH₂), 7.71 (s, 1H, ArH), 7.64 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, ArH), 7.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.52 (s, 1H, ArH), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.25 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, ArH), 7.16 (s, 1H, ArH), 6.98 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H, ArH), 3.98 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 3.65 – 3.53 (m, 3H, O-CH₃), 2.41 – 2.26 (m, 2H, CH₂), 1.81 – 1.39 (m, 6H, CH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 420.0 (90) [MH⁺] (MW = 419.18 g/mol).Anal. (C₂₄H₂₅N₃O₄· $\frac{1}{2}$ H₂O): Ber. C 67.99, H 6.06, N 9.91. Gef. C 67.96, H 6.16, N 9.73.

182

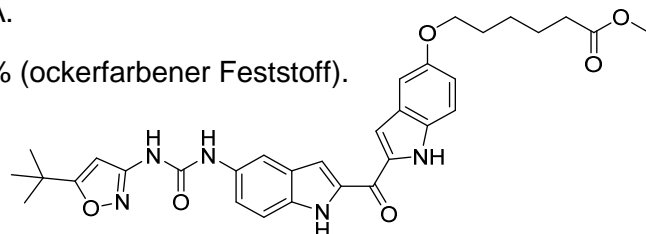
Methyl-6-((2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)hexanoatKopplung von **181** mit **140** nach nach AV 9A.

Ausbeute: 0.39 mmol aus 0.77 mmol → 51% (ockerfarbener Feststoff).

Schmelzpunkt: 115.7 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3317, 2966, 2947, 1720, 1684.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.88 (s, 1H, Indol-NH), 11.82 (s, 1H, Indol-NH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.51 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.49 – 7.36 (m, 3H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.98 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.59 (s, 3H, O-CH₃), 2.40 – 2.28 (m, 2H, CH₂), 1.82 – 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.68 – 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.54 – 1.39 (m, 2H, CH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 586.1 (100) [MH⁺] (MW = 585.26 g/mol).Anal. (C₃₂H₃₅N₅O₆): Ber. C 65.63, H 6.02, N 11.96. Gef. C 65.41, H 6.40, N 11.63.

183

Methyl-6-((2-(5-(3-(5-methylisoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)hexanoat

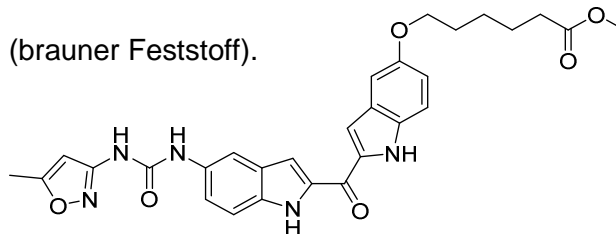
Kopplung von **181** mit **150** nach AV 9B.

Ausbeute: 1.83 mmol aus 2.15 mmol → 85% (brauner Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc.

Schmelzpunkt: 186.7 – 188.2 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3367, 3228, 2946, 1686.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.89 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, Indol-NH), 11.83 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Indol-NH), 9.41 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, NH), 7.92 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd, *J* = 10.1, 1.7 Hz, 2H, ArH), 7.42 (dd, *J* = 14.1, 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.28 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.56 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, Isoxazol-CH), 3.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.59 (s, 3H, O-CH₃), 2.37 (3s, 3H, CH₃), 2.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.83 – 1.67 (m, 2H, CH₂), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH₂), 1.54 – 1.37 (m, 2H, CH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 544.2 (100) [MH⁺] (MW = 543.21 g/mol).

HR-MS (120 eV) *m/z*: Ber. 544.2191. Gef. 544.2196 (C₂₉H₃₀N₅O₆) [MH⁺].

Anal. (C₂₉H₂₉N₅O₆·1.5 H₂O): Ber. C 62.69, H 5.50, N 12.61. Gef. C 62.55, H 5.25, N 12.40.

184

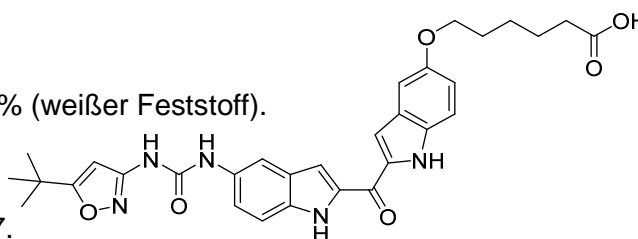
6-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)hexansäure

Esterspaltung von **182** nach AV 11A.

Ausbeute: 0.20 mmol aus 0.31 mmol → 65% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 200.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3283, 2966, 1703, 1527.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.78 (s, 2H, Indol-NH), 11.45 (s, 1H, NH), 10.87 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, ArH), 7.57 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H, ArH), 7.38 (dd, *J* = 8.9, 3.6 Hz, 2H, ArH), 7.16 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.53 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.98 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 2.14 – 2.09 (m, 2H, CH₂), 1.88 – 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.60 (dd, *J* = 14.5, 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.49 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 572.1 (100) [MH⁺] (MW = 571.24 g/mol)

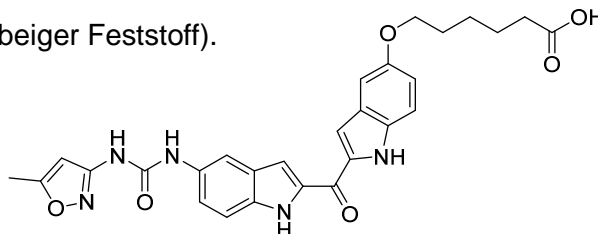
Anal. (C₃₁H₃₃N₅O₆·1/2H₂O): Ber. C 64.13, H 5.90, N 12.06. Gef. C 64.19, H 5.79, N 11.99.

185**6-((2-(5-(3-(5-Methylisoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl)oxy)hexansäure**Esterspaltung von **183** nach AV 11A.

Ausbeute: 1.59 mmol aus 1.65 mmol → 96% (beiger Feststoff).

Umkristallisation: THF.

Schmelzpunkt: 175.1 – 175.7 °C.

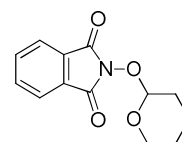
IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3249, 2932, 1572.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.99 (bs, 1H, COOH), 11.89 (s, 1H, Indol-NH), 11.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, Indol-NH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, NH), 7.92 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.48 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, ArH), 7.42 (dd, *J* = 13.6, 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.28 (dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.56 (s, 1H, Isoxazol-CH), 4.04 – 3.93 (m, 2H, CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 2.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.81 – 1.68 (m, 2H, CH₂), 1.66 – 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.51 – 1.43 (m, 2H, CH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 530.2 (100) [MH⁺] (MW = 529.20 g/mol).Anal. (C₂₈H₂₇N₅O₆·xH₂O): Ber. C 61.42, H 5.34, N 12.79. Gef. C 61.05, H 5.03, N 12.58.**187****2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)isoindolin-1,3-dion [225]**Darstellung aus **186** (2-Hydroxyisoindoline-1,3-dion) analog Hong *et al.* [225].

Ausbeute: 30 mmol aus 37 mmol → 81% (weißer Feststoff).

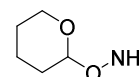
Schmelzpunkt: 121 °C (Lit. 123 °C) [183].



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.10 (m, 2H, ArH), 7.68 (m, 2H, ArH), 5.04 (s, 1H, O-CH-O), 4.08 (m, 1H, CH₂), 3.56 (s, 1H, CH₂), 1.74 (s, 3H, CH₂), 1.57 (s, 3H, CH₂).³¹

188**O-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)hydroxylamin [225]**Darstellung aus **187** nach Hong *et al.* [225].

Ausbeute: 12 mmol aus 16 mmol → 70% (farbloses Öl).

³¹ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl₃ vor [225].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 5.98 (s, 2H, NH_2), 5.04 (s, 1H, O-CH-O), 4.08 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 3.56 (s, 1H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.74 (s, 3H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.57 (s, 3H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$).³¹

189

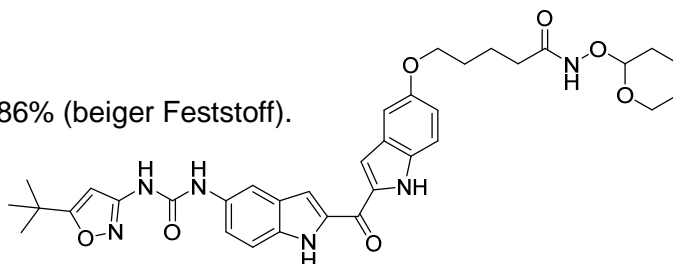
5-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)pentansäureamid

Darstellung aus **177** nach AV 12.

Ausbeute: 0.31 mmol aus 0.36 mmol \rightarrow 86% (beiger Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc/Heptan.

Schmelzpunkt: 164.4 °C.



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3287, 2963, 1607, 1527.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.89 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Indol-NH), 11.83 (d, J = 1.7 Hz, 1H, Indol-NH), 10.97 (s, 1H, NH), 9.46 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, NH), 7.91 (d, J = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d, J = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, J = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.42 (dd, J = 12.8, 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.29 (dd, J = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.18 (d, J = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.97 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 4.82 (s, 1H, O-CH-O), 4.05 – 3.85 (m, 3H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 3.49 (d, J = 11.0 Hz, 1H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 2.08 (t, J = 6.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.69 (dd, J = 13.5, 7.5 Hz, 7H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.50 (s, 3H, $\text{CH}_2(\text{THP})$), 1.30 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 657.2 (100) [MH^+] (MW = 656.30 g/mol)

Anal. ($\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_{17} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$): Ber. C 63.14; H 6.21; N 12.62. Gef. C 62.90; H 6.42; N 12.21.

190

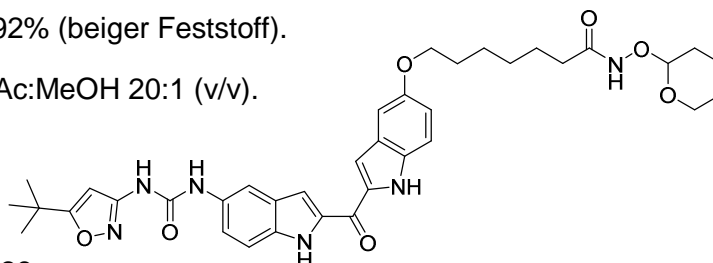
7-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)heptansäureamid

Darstellung aus **178** nach AV 12.

Ausbeute: 0.24 mmol aus 0.26 mmol \rightarrow 92% (beiger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 20:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 110.1 – 111.0 °C.



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3415, 2986, 1608, 1528.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.88 (s, 1H, Indol-NH), 11.81 (s, 1H, Indol-NH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.49 – 7.38 (m, 3H, ArH), 7.29 (dd, J = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, J = 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.97 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.98 (t, J = 6.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.96 (ddd, J =

20.9, 14.1, 8.7 Hz, 2H, CH₂-(OTHP)), 1.78 – 1.67 (m, 4H, CH₂-(OTHP)), 1.63 (s, 2H, CH₂-(OTHP)), 1.56 – 1.38 (m, 11H, CH₂-(OTHP)), 1.30 (d, $J = 2.1$ Hz, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 685.2 (100) [MH⁺] (MW = 684.33 g/mol).

Anal. (C₃₇H₄₄N₆O₇·0.16 EtOAc): Ber. C 64.68, H 6.53, N 12.01. Gef. C 64.46, H 6.31, N 12.03.

191

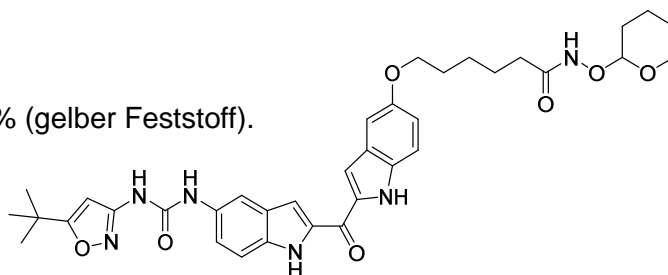
6-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)hexansäureamid

Darstellung aus **184** nach AV 12.

Ausbeute: 0.13 mmol aus 0.16 mmol → 81% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc/Heptan.

Schmelzpunkt: 142.0 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3302, 2941, 1599, 1528.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.89 (s, 1H, Indol-NH), 11.82 (s, 1H, Indol-NH), 10.93 (s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.49 – 7.36 (m, 3H, ArH), 7.29 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, ArH), 6.96 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 4.81 (s, 1H, O-CH₂-O), 3.96 (dd, $J = 14.9, 8.6$ Hz, 2H, CH₂-(OTHP)), 3.49 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, CH₂-(OTHP)), 2.03 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂-(OTHP)), 1.73 (dd, $J = 14.0, 6.8$ Hz, 2H, CH₂-(OTHP)), 1.54 (m, 11H, CH₂-(OTHP)), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 671.2 (100) [MH⁺] (MW = 670.31 g/mol)

Anal. (C₃₆H₄₂N₆O₇· $\frac{1}{2}$ H₂O): Ber. C 63.61, H 6.38, N 12.36. Gef. C 63.57, H 6.35, N 12.56.

192

6-((2-(5-(3-(5-Methylisoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)hexansäureamid

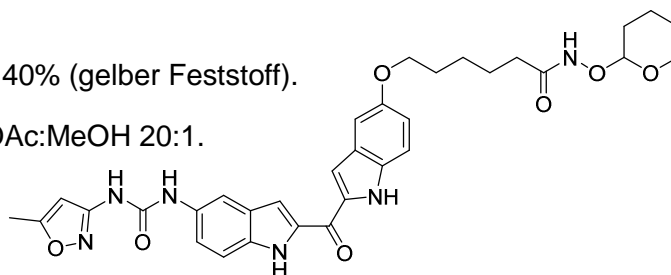
Darstellung aus **185** nach AV 12.

Ausbeute: 0.64 mmol aus 1.59 mmol → 40% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 20:1.

Umkristallisation: DCM.

Schmelzpunkt: 147.0 – 148.0 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3276, 2941, 2654, 1526.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.88 (s, 1H, Indol-NH), 11.82 (s, 1H, Indol-NH), 10.94 (s, 1H, NH), 9.41 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, NH), 7.92 (d, J = 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.52 (d, J = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, J = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.42 (dd, J = 14.0, 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.28 (dd, J = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, J = 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.97 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.55 (d, J = 0.8 Hz, 1H, Isoxazol-CH), 4.81 (s, 1H, O-CH-O), 3.96 (dd, J = 14.6, 8.3 Hz, 2H, CH_2 -(OTHP)), 3.49 (d, J = 11.4 Hz, 1H, CH_2 -(THP)), 2.37 (d, J = 0.5 Hz, 3H, CH_3), 2.10 – 1.99 (m, 2H, CH_2 -(OTHP)), 1.73 (dd, J = 14.1, 6.8 Hz, 2H, CH_2 -(OTHP)), 1.60 (dd, J = 16.7, 8.7 Hz, 5H, CH_2 -(OTHP)), 1.53 – 1.38 (m, 5H, CH_2 -(OTHP)).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 545.2 (100) [MH^+ - 3,4-Dihydro-2H-pyran (MW = 84.12 g/mol)] (MW = 628.26 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_7 \times 0.16 \text{ DCM}$): Ber. C 61.97, H 5.70, N 13.07. Gef. C 61.63, H 5.85, N 12.84.

193

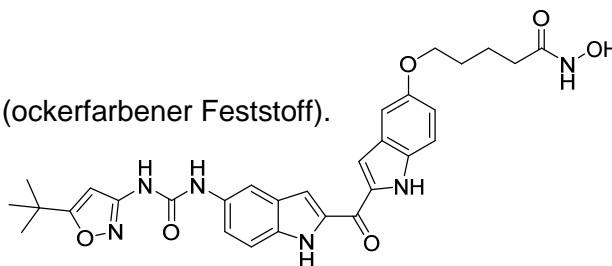
5-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl)oxy)-N-hydroxypentansäureamid

Darstellung aus **189** nach AV 13.

Ausbeute: 0.12 mmol aus 0.16 mmol \rightarrow 75% (ockerfarbener Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc/DCM.

Schmelzpunkt: 145.1 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3280, 2965, 1608, 1527.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.86 (d, J = 13.8 Hz, 1H, Indol-NH), 11.82 (s, 1H, Indol-NH), 10.39 (s, 1H, OH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, NH), 8.70 (s, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.50 (s, 1H, NH), 7.50 – 7.36 (m, 3H, ArH), 7.29 (dd, J = 8.9, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.18 (d, J = 1.9 Hz, 1H, ArH), 6.97 (dd, J = 8.9, 2.2 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.99 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2), 2.04 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH_2), 1.71 (bs, 4H, CH_2), 1.30 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 573.2 (100) [MH^+] (MW = 572.24 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6 \times 1/2 \text{H}_2\text{O}$): Ber. C 61.95, H 5.72, N 14.45. Gef. C 62.34, H 5.67, N 14.08.

194

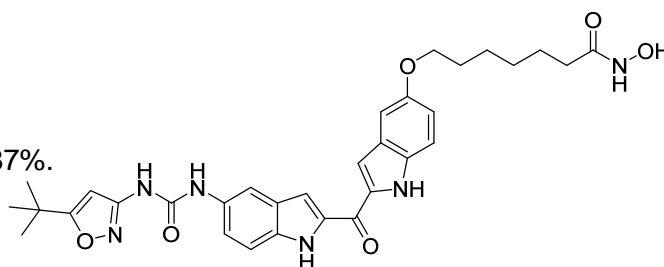
7-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl)oxy)-N-hydroxyheptansäureamid

Darstellung aus **190** nach AV 13.

Ausbeute: 3.16 mmol aus 3.65 mmol \rightarrow 87%.

Umkristallisation: DCM.

Schmelzpunkt: 166.7 – 166.8 °C.



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3286, 2935, 1598, 1526.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.85 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H, Indol-NH), 11.81 (s, 1H, Indol-NH), 10.34 (s, 1H, ArH), 9.45 (s, 1H, ArH), 8.75 (s, 1H, ArH), 7.91 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.45 (ddd, *J* = 22.4, 10.9, 5.3 Hz, 4H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.97 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.98 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 3.38 (s, 2H, CH₂), 1.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.82 – 1.65 (m, 2H, CH₂), 1.62 – 1.38 (m, 4H, 2xCH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 180.1 (C_q), 176.4 (C_q, C=O, Bisindol), 169.1 (C_q), 158.6 (C_q), 153.4 (C_q), 151.7 (C_q), 135.2 (C_q), 134.9 (C_q), 134.4 (C_q), 133.2 (C_q), 131.9 (C_q), 127.6 (C_q), 127.4 (C_q), 119.6 (+, CH), 117.5 (+, CH), 113.6 (+, CH), 112.9 (+, CH), 111.6 (+, CH), 109.1 (+, CH), 103.3 (+, CH), 92.4 (+, CH, Isoxazol-CH), 67.7 (-, CH₂), 32.8 (-, CH₂), 32.3 (-, CH₂), 28.8 (-, CH₂), 28.4 (+, (CH₃)₃), 25.4 (-, CH₂), 25.1 (-, CH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 601.1 (100) [MH⁺] (MW = 600.2 g/mol).

Anal. (C₃₂H₃₆N₆O₆· $\frac{1}{2}$ H₂O): Ber. C 63.04, H 6.12, N 13.78. Gef. C 62.99, H 6.36, N 14.15.

195

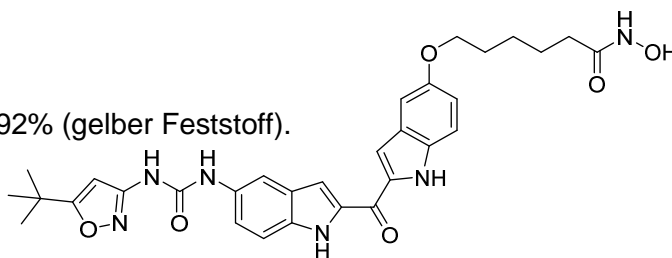
6-((2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)-*N*-hydroxyhexansäureamid

Darstellung aus **191** nach AV 13.

Ausbeute: 0.12 mmol aus 0.13 mmol → 92% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc/DCM.

Schmelzpunkt: 135.6 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3300, 2966, 1635, 1528.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.88 (s, 1H, Indol-NH), 11.82 (s, 1H, Indol-NH), 10.36 (s, 1H, NH), 9.46 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, ArH), 8.68 (s, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.53 – 7.36 (m, 4H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.8, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.17 (s, 1H, ArH), 6.97 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 3.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 1.98 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 1.75 (s, 2H, CH₂), 1.68 – 1.52 (m, 2H, CH₂), 1.44 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 180.1 (C_q), 176.4 (C_q, C=O, Bisindol), 169.1 (C_q), 153.4 (C_q), 151.7 (C_q), 135.2 (C_q), 134.9 (C_q), 133.2 (C_q), 132.0 (C_q), 127.6 (C_q), 119.6 (+, CH), 117.5 (+, CH), 113.6 (+, CH), 112.9 (+, CH), 111.5 (+, CH), 109.1 (+, CH), 103.3 (+, CH), 92.7 (+, CH, Isoxazol-CH), 67.7 (-, CH₂), 32.5 (-, CH₂), 32.3 (-, CH₂), 28.4 (+, (CH₃)₃), 25.3 (-, CH₂), 25.0 (-, CH₂).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 587.2 (100) [MH⁺] (MW = 586.2 g/mol).

Anal. (C₃₁H₃₄N₆O₆· $\frac{1}{2}$ H₂O): Ber. C 62.51, H 5.92, N 14.11. Gef. C 62.66, H 5.79, N 13.96.

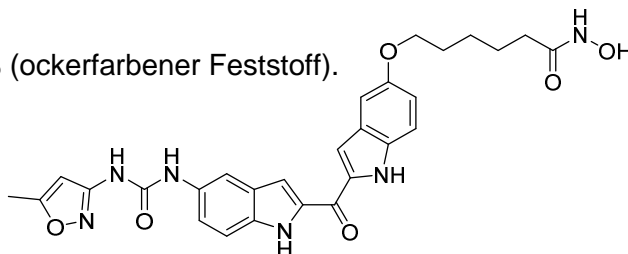
196

N-Hydroxy-6-((2-(5-(3-(5-methylisoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl)oxy)hexansäureamidDarstellung aus **192** nach AV 13.

Ausbeute: 0.37 mmol aus 0.48 mmol → 80% (ockerfarbener Feststoff).

Umkristallisation: DCM/THF.

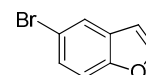
Schmelzpunkt: 270 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3285, 2934, 2863, 1528.

¹H-NMR (300 MHz, Aceton-*d*₆): δ = 10.95 (s, 1H, Indol-NH), 10.89 (s, 1H, Indol-NH), 8.81 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, ArH), 8.10 (s, 1H, ArH), 7.60 (s, 1H, ArH), 7.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.41 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.02 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.48 (s, 1H, Isoxazol-CH), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.18 (dd, *J* = 15.7, 8.5 Hz, 2H, CH₂), 1.91 – 1.79 (m, 2H, CH₂), 1.72 (dt, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.55 (dd, *J* = 13.6, 6.7 Hz, 2H, CH₂), 1.38 – 1.07 (m, 2H, CH₂). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176.4 (C_q, C=O, Bisindol), 169.1 (C_q), 158.9 (C_q), 153.4 (C_q), 151.7 (C_q), 135.2 (C_q), 134.9 (C_q), 134.4 (C_q), 133.2 (C_q), 131.9 (C_q), 127.6 (C_q), 127.4 (C_q), 119.3 (+, CH), 117.2 (+, CH), 113.3 (+, CH), 113.2 (+, CH), 112.6 (+, CH), 111.3 (+, CH), 104.6 (+, CH), 103.3 (+, CH), 95.5 (+, CH, Isoxazol-CH), 67.7 (-, CH₂), 33.7 (-, CH₂), 32.3 (-, CH₂), 28.6 (-, CH₂), 25.3 (-, CH₂), 24.9 (-, CH₂), 24.4 (-, CH₂), 12.1 (CH₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 545.2 (100) [MH⁺] (MW = 544.2 g/mol).Anal. (C₃₃H₃₆N₆O₇·0.16 DCM): Ber. C 61.97, H 5.70, N 13.07. Gef. C 61.63, H 5.80, N 12.84.

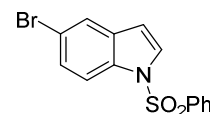
199

5-Brombenzofuran [185]Darstellung aus **197** (4-Bromphenol) nach Yu *et al.* [226]

Ausbeute: 14 mmol aus 27 mmol → 52% (2 Stufen) (farbloses Öl).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.05 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.48 – 7.41 (m, 1H, ArH), 6.95 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H, ArH).³²

200

5-Brom-1-phenylsulfonyl-1H-indol [227]

Phenylsulfonierung von 5-Brom-1H-indol nach AV 1.

Ausbeute: 23 mmol aus 40 mmol → 59% (beiger Feststoff).

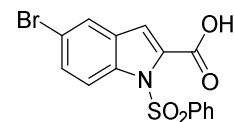
³² Es liegen keine Vergleichsdaten für NMR in der Literatur vor [183, 224].

Schmelzpunkt: 87.6 – 89.2 °C (Lit. 89 – 90 °C) [228].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.99 (dt, J = 8.7, 1.8 Hz, 2H, ArH), 7.92 – 7.81 (m, 3H, ArH), 7.75 – 7.65 (m, 1H, ArH), 7.60 (dt, J = 7.4, 1.8 Hz, 2H, ArH), 7.49 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.83 (dd, J = 3.7, 0.6 Hz, 1H, ArH).³³

202

5-Brom-1-phenylsulfonyl-1*H*-indol-2-carbonsäure



Carboxylierung von **200** nach AV 2B.

Ausbeute: 19 mmol aus 24 mmol → 80%. (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 172.2 – 173.4 °C

Umkristallisation: DCM/Ethanol.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 13.84 (s, 1H, COOH), 7.96 (t, J = 9.6 Hz, 2H, ArH), 7.93 – 7.78 (m, 3H, ArH), 7.70 (t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.59 (t, J = 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.48 (dd, J = 8.8, 1.7 Hz, 1H, ArH), 6.83 (d, J = 3.6 Hz, 1H, ArH).

205

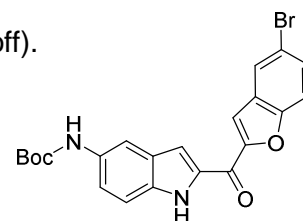
tert-Butyl (2-(5-brombenzofuran-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)carbamate

Kopplung von **71** mit **203** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylabspaltung nach AV 6B.

Ausbeute: 5.3 mmol aus 11 mmol → 45% (2 Stufen) (brauner Feststoff).

Umkristallisation: DCM.

Schmelzpunkt: 242 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3367, 3302, 1698, 1517.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 11.98 (s, 1H, Indol-NH), 9.28 (s, 1H, NH), 8.09 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.96 (s, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.84 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.77 (s, 1H, ArH), 7.72 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.39 (s, 2H, ArH), 1.49 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 455.1 (100) $[\text{MH}^+]$ (MW = 454.05 g/mol)

205 wurde mittels präoperativer HPLC aufgereinigt: Agilent Technologies 1290 Infinity; Säule: Phenomenex Luna C18(2) 3 μm 150 x 2.00 mm, 100A. Detektor: DAD G4212A. Fluß: 0.3 ml/min. Temperatur: 25 °C.

0 min: 5% MeCN / H_2O + 0.059% [w] TFA

nach 30 min: 80% MeCN / H_2O + 0.059% [w] TFA

nach 35 min: 98% MeCN / H_2O + 0.059% [w] TFA

³³ Vergleichs NMR aus der Literatur liegt nur in CDCl_3 vor [226, 227].

Retentionszeit (**205**): 29.57 min → 75% Reinheit.

205 wurde nach präoperativer HPLC Reinigung ohne weitere Analytik zu **210** umgesetzt.

206

tert-Butyl-2-(5-brom-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-ylcarbammat [225]

Kopplung von **71** mit **204** nach AV 5 mit anschließender Phenylsulfonylabsplattung nach AV 6B.

Ausbeute: 6.6 mmol aus 15 mmol → 44% (2 Stufen) (beiger Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM.

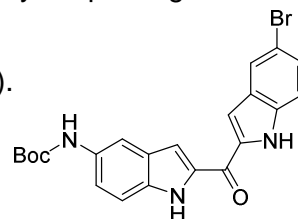
Schmelzpunkt: 229.2 - 230.7 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3300, 1697, 1526.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.16 (s, 1H, Indol-NH), 11.95 (s, 1H, Indol-NH), 9.25 (s, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 7.54 – 7.34 (m, 6H, ArH), 1.48 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 453.9 (C₂₂H₂₀⁷⁹BrN₃O₃) (55) [MH⁺], 455.9 (C₂₂H₂₀⁸¹Br,N₃O₃) (45) [MH⁺] (MW = 453.07 g/mol).

Anal. (C₂₂H₂₀BrN₃O₃): Ber. C 58.16, H 4.44, N 9.25. Gef. C 58.07, H 4.64, N 9.28.



207

(5-Amino-1*H*-indol-2-yl)(5-brombenzofuran-2-yl)methanon

205 wurde in THF gelöst und mit 1.1 equiv. 0.1 M HCl in Isopropanol bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz auf Eiswasser gegossen und mit konz. NH₃ alkalisiert. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und *in vacuo* getrocknet.

Ausbeute: 4.0 mmol aus 5.3 mmol → 76% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: EtOAc

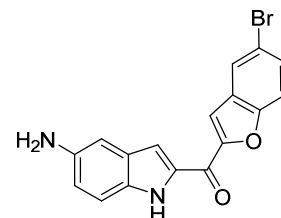
Schmelzpunkt: 220.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3446, 3398, 1733, 1652, 1598.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.68 (s, 1H, Indol-NH), 8.07 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.91 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H, ArH), 7.83 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.70 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.53 (s, 1H, ArH), 7.23 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 6.81 (dd, *J* = 6.9, 2.2 Hz, 2H, ArH), 4.80 (s, 2H, NH₂).

ES-MS (70 eV) *m/z* (%): 354.0 ⁷⁹Br C₁₇H₁₁BrN₂O₂ (42) [M⁺ Radikal]. 356.0 ⁸¹Br C₁₇H₁₁BrN₂O₂ (40) [MH⁺] (MW = 354.00 g/mol).

Anal. (C₁₇H₁₁BrN₂O₂·0.66 HCl): Ber. C 53.80, H 3.10, N 7.38. Gef. C 53.77, H 3.52, N 7.38.



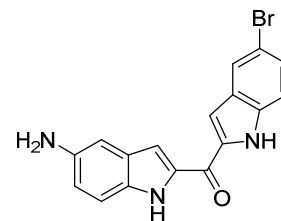
208

(5-Amino-1*H*-indol-2-yl)(5-brom-1*H*-indol-2-yl)methanon*tert*-Butyloxycarbonyl Schützung von **206** nach AV 7.

Ausbeute: 2.8 mmol aus 6.6 mmol → 43% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 1:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 221.9 - 222.2 °C.

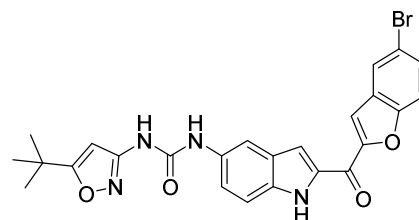
IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3459, 3323, 1529.¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.10 (s, 1H, Indol-NH), 11.54 (s, 1H, Indol-NH), 7.94 (s, 1H, ArH), 7.58 – 7.35 (m, 6H, ArH), 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 4.64 (s, 2H, NH₂).ES-MS (70 eV) *m/z* (%): 396.6 (100) [MH⁺+MeCN] (MW = 353.02 g/mol).Anal. (C₁₇H₁₂BrN₃Ox¹/₈EtOAc): Ber. C 57.55, H 3.59, N 11.51. Gef. C 57.85, H 3.65, N 11.29.

209

1-(2-(5-Brombenzofuran-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)-3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)harnstoffKopplung von **207** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 1.65 mmol aus 3.94 mmol → 42%.

Schmelzpunkt: 145.0 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3422, 1699, 1553.¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.03 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, Indol-NH), 9.47 (s, 1H, NH), 8.78 (s, 1H, NH), 8.10 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.97 (t, *J* = 1.4 Hz, 2H, ArH), 7.89 – 7.82 (m, 1H, ArH), 7.79 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.73 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.34 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.31 (s, 9H, (CH₃)₃).ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 521.1 ⁷⁹Br C₂₅H₂₁N₄O₄ (96) [MH⁺]. 523.1 ⁸¹Br C₂₅H₂₁N₄O₄ (100) [MH⁺] (MW = 520.07 g/mol).Anal. (C₂₅H₂₁BrN₄O₄x¹/₈EtOAc): Ber. C 57.87, H 4.32, N 10.28. Gef. C 57.87, H 4.37, N 9.99.

210

1-(2-(5-Brom-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)-3-(5-(*tert*-butyl)isoxazol-3-yl)harnstoff

Kopplung von **208** mit **140** nach AV 9A.

Ausbeute: 2.12 mmol aus 6.07 mmol → 35% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 2:1 (v/v).

Umkristallisation: Pentan.

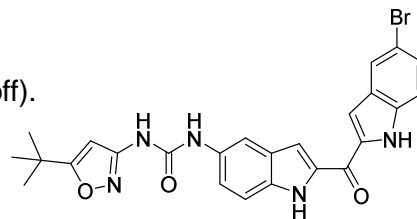
Schmelzpunkt: 183.2 – 184.6 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3297, 2968, 1686, 1526.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.19 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, Indol-NH), 11.95 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, Indol-NH), 9.47 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, NH), 7.96 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.56 (dd, *J* = 7.3, 1.7 Hz, 2H, ArH), 7.51 – 7.39 (m, 3H, ArH), 7.31 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 519.9 (100) [MH⁺] (MW = 519.09 g/mol).

Anal. (C₂₅H₂₂BrN₅O₃·0.11 Pentan): Ber. C 58.25, H 4.51, N 13.18. Gef. C 58.12, H 4.32, N 13.32



211

(*E*-*tert*-Butyl-3-(2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)acrylat

Darstellung aus **209** analog zu **212** [187].

Ausbeute: 1.10 mmol aus 1.65 mmol → 67% (gelber Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 3:2 (v/v).

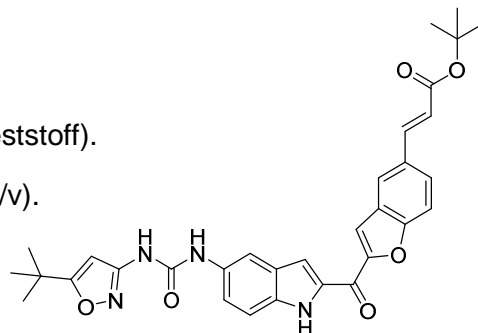
Schmelzpunkt: 281.0 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3283, 2971, 1694.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.50 (s, 1H, Indol-NH), 8.80 (s, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, ArH), 8.03 – 7.96 (m, 3H, ArH), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.80 (s, 1H, ArH), 7.73 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.33 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.61 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.51 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 569.2 (100) [MH⁺] (MW = 568.23 g/mol).

Anal. (C₃₂H₃₂N₄O₆·¹/₄DCM): Ber. C 65.67, H 5.55, N 9.50. Gef. C 65.73, H 5.51, N 9.64.



212

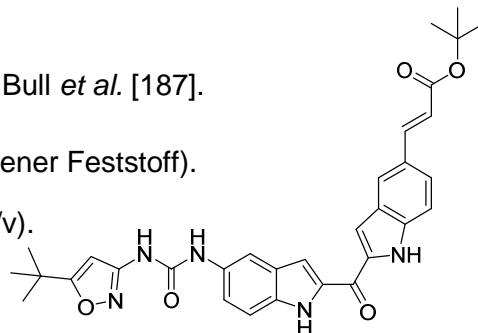
(E)-tert-Butyl-3-(2-(5-(3-(5-tert-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl) acrylat

Darstellung aus **210** in Anlehnung an die Vorschrift von Bull *et al.* [187].

Ausbeute: 1.76 mmol aus 2.20 mmol → 80% (ockerfarbener Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM:EtOAc 2:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 260.8 – 264.1 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3454, 3285, 2969, 1637.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.20 (s, 1H, Indol-NH), 11.94 (s, 1H, Indol-NH), 9.46 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, ArH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.73 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, ArH), 7.57 (s, 1H, ArH), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.45 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.46 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH), 1.50 (s, 9H, O-(CH₃)₃), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 568.3 (100) [MH⁺] (MW = 567.25 g/mol).

Anal. (C₃₂H₃₃N₅O₅ × 0.16 DCM): Ber. C 66.41, H 5.78, N 12.04. Gef. C 66.72, H 5.79, N 11.99

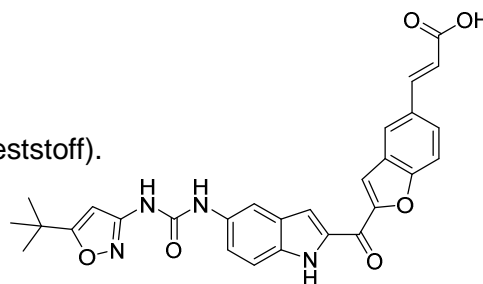
213

(E)-3-(2-(5-(3-(5-tert-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl) acrylsäure

Esterspaltung von **211** nach AV 11B.

Ausbeute: 0.75 mmol aus 1.10 mmol → 68% (gelber Feststoff).

Schmelzpunkt: 170.0 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3315, 2954, 1684, 1612, 1558.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.05 (s, 1H, Indol-NH), 9.48 (s, 1H, NH), 8.79 (s, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, ArH), 8.01 – 7.94 (m, 2H, ArH), 7.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.79 (dd, *J* = 10.8, 9.0 Hz, 2H, ArH), 7.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.33 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.61 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 1.30 (s, 9H, (CH₃)₃).

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 513.2 (100) [MH⁺] (MW = 512.17 g/mol).

213 wurde mittels präoperativer HPLC aufgereinigt: Agilent Technologies 1290 Infinity; Säule: Phenomenex Luna C18(2) 3 μ m 150 x 2.00 mm, 100A. Detektor: DAD G4212A. Fluss: 0.3 ml/min. Temperatur: 25 °C.

0 min: 5% MeCN / H₂O + 0.059% [w] TFA

nach 20 min: 80% MeCN / H₂O + 0.059% [w] TFA

nach 35 min: 98% MeCN / H₂O + 0.059% [w] TFA

Retentionszeit (**213**): 22.64 min → 93.4% Reinheit.

213 wurde nach präoperativer HPLC Reinigung ohne weitere Analytik zu **215** umgesetzt.

214

(*E*)-3-(2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)acrylsäure

Esterspaltung von **212** nach AV 11B.

Ausbeute: 1.56 mmol aus 1.76 mmol → 89% (brauner Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 20:1 (v/v).

Schmelzpunkt: 162.0 – 165.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3287, 2969, 1533.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.94 (s, 1H, Indol-NH), 8.03 (s, 1H, ArH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.72 (s, 1H, ArH), 7.68 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, ArH), 7.65 (s, 1H, ArH), 7.58 (s, 1H, ArH), 7.53 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, CH), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 6.51 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.47 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, ArH), 1.27 (s, 9H, CH₃)₃.

214 wurde mittels präoperativer HPLC aufgereinigt: Agilent Technologies 1290 Infinity; Säule: Phenomenex Luna C18(2) 3 μ m 150 x 2.00 mm, 100A. Detektor: DAD G4212A. Fluss: 0.3 ml/min. Temperatur: 25 °C.

0 min: 5% MeCN / H₂O + 0.059 % [w] TFA

nach 20 min: 80% MeCN / H₂O + 0.059% [w] TFA

nach 35 min: 98% MeCN / H₂O + 0.059% [w] TFA

Retentionszeit (**214**): 21.53 min → 85.2% Reinheit.

214 wurde nach präoperativer HPLC Reinigung ohne weitere Analytik zu **216** umgesetzt.

215

(*E*)-3-(2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)acrylamid

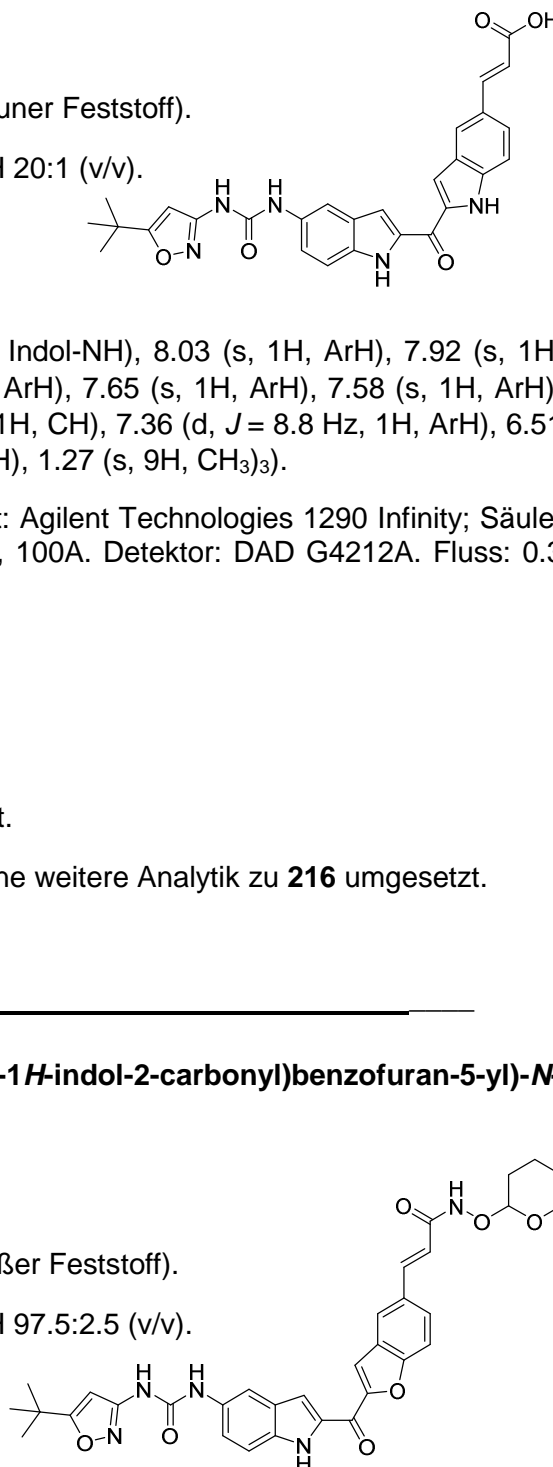
Darstellung aus **213** nach AV 12.

Ausbeute: 0.23 mmol aus 0.75 mmol → 31% (weißer Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 97.5:2.5 (v/v).

Schmelzpunkt: 204.6 – 206.1 °C.

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3312, 2965, 1602, 1557.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.05 (s, 1H, Indol-NH), 11.29 (s, 1H, NH), 9.48 (s, 1H, NH), 8.79 (s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, ArH), 8.06 (s, 1H, ArH), 7.97 (d, J = 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.89 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.82 (d, J = 12.0 Hz, 2H, ArH), 7.66 (d, J = 15.8 Hz, 1H, CH), 7.46 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.33 (dd, J = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.57 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 4.94 (s, 1H, O-CH-O), 4.02 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 1H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 3.56 (d, J = 11.1 Hz, 1H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.72 (s, 3H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.55 (s, 3H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.31 (s, 9H, CH_3)₃.

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 528.2 (60) $[\text{MH}^+ - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}]$, 612.2 (36) $[\text{MH}^+]$ (MW = 611.24 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_7 \times 1/2\text{H}_2\text{O}$): Ber. C 63.86, H 5.52, N 11.28. Gef. C 63.65, H 5.43, N 11.11.

216

(*E*)-3-(2-(5-(3-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)-*N*-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)acrylamid

Darstellung aus **214** nach AV 12.

Ausbeute: 0.11 mmol aus 0.57 mmol \rightarrow 19% (brauner Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): EtOAc:MeOH 20:1 (v/v).

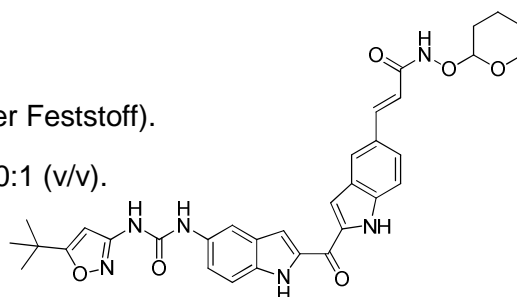
Schmelzpunkt: 195 °C.

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3260, 2965, 1609, 1531.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.19 (s, 1H, Indol-NH), 11.94 (s, 1H, Indol-NH), 9.47 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, ArH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.65 (s, 1H, ArH), 7.61 – 7.54 (m, 3H, ArH), 7.45 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd, J = 8.8, 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.52 – 6.44 (m, 1H, ArH), 4.92 (s, 1H, O-CH-O), 3.57 (t, J = 10.4 Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.78 – 1.65 (m, 3H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.55 (s, 3H, $\text{CH}_2(\text{OTHP})$), 1.30 (s, 9H, CH_3)₃.

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 527.2 (100) $[\text{MH}^+ - 3,4\text{-dihydro-}2\text{H-pyran}]$ (MW = 610.25 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_6 \times 1/2\text{H}_2\text{O}$): Ber. C 63.96, H 5.69, N 13.56. Gef. C 63.95, H 5.79, N 13.18.



217

(*E*)-3-(2-(5-(3-(5-*tert*-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)benzofuran-5-yl)-*N*-hydroxyacrylamid

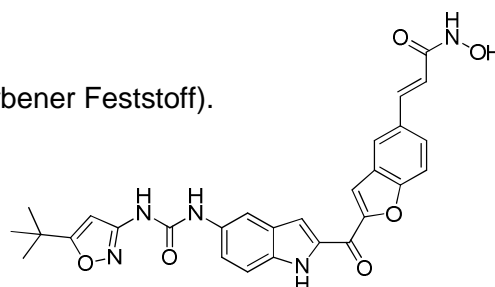
Darstellung aus **215** nach AV 13.

Ausbeute: 0.18 mmol aus 0.23 mmol \rightarrow 78% (ockerfarbener Feststoff).

Umkristallisation: DCM.

Schmelzpunkt: 188.1 – 190.0 °C.

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3313, 2969, 1609, 1520.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = (400 MHz) 12.04 (s, 1H, Indol-NH), 10.81 (s, 1H, Harnstoff-NH), 9.49 (s, 1H, Harnstoff-NH), 8.83 (s, 1H, ArH), 8.06 (d, J = 5.6 Hz, 2H, ArH), 7.97 (d, J = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.91 – 7.85 (m, 1H, ArH), 7.84 – 7.77 (m, 2H, ArH), 7.63 (d, J = 15.7 Hz, 1H, CH), 7.46 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.33 (dd, J = 8.9, 2.0 Hz, 1H, ArH), 6.56 – 6.49 (m, 2H), 1.31 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 180.1 (Cq), 173.1 (Cq, C=O, Bisindol), 162.7 (Cq), 158.6 (Cq), 156.6 (Cq), 152.9 (Cq), 137.8 (+, CH), 135.0 (Cq), 134.1 (Cq), 131.3 (Cq), 127.5 (Cq), 127.4 (Cq), 127.2 (+, CH), 122.6 (+, CH), 120.2 (+, CH), 118.7 (+, CH), 114.2 (+, CH), 112.8 (+, CH), 112.7 (+, CH), 111.3 (+, CH), 110.9 (+, CH), 92.2 (+, CH, Isoxazol-CH), 28.1 (+, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 528.2 (100) $[\text{MH}^+]$ (MW = 527.18 g/mol).

HR-MS (120 eV) m/z : Ber. 528.1878. Gef. 528.1879 ($\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_6$) $[\text{MH}^+]$.

Anal. ($\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_6 \times 7/3 \text{DCM}$): Ber. C 60.55, H 4.62, N 12.42. Gef. C 60.65, H 5.12, N 12.07.³⁴

218

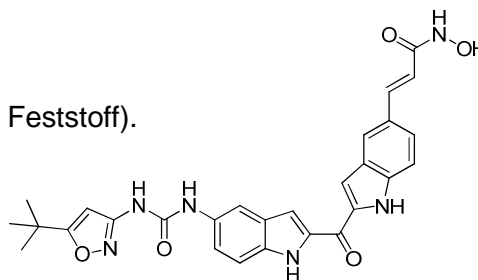
(E)-3-(2-(5-(3-(5-tert-Butyl-isoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl)-N-hydroxyacrylamid

Darstellung aus **216** nach AV 13.

Ausbeute: 0.10 mmol aus 0.11 mmol \rightarrow 91% (gelber Feststoff).

Umkristallisation: DCM/Heptan.

Schmelzpunkt: 193.0 – 195.5 °C.



IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3277, 2966, 1652, 1531.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.16 (s, 1H, Indol-NH), 11.93 (s, 1H, Indol-NH), 10.71 (s, 1H, ArH), 9.49 (s, 1H, ArH), 8.83 (s, 1H, ArH), 7.93 (d, J = 4.3 Hz, 2H, ArH), 7.65 (s, 1H, ArH), 7.56 (q, J = 8.7 Hz, 4H, ArH), 7.45 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd, J = 8.9, 1.7 Hz, 1H, ArH), 6.52 (s, 1H, Isoxazol-CH), 6.43 (d, J = 15.7 Hz, 1H, CH), 1.30 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 180.1 (Cq), 176.4 (Cq, C=O, Bisindol), 158.6 (Cq), 151.7 (Cq), 139.3 (+, CH), 138.3 (Cq), 135.4 (Cq), 134.9 (Cq), 134.5 (Cq), 132.1 (Cq), 127.5 (Cq), 127.4 (Cq), 123.8 (+, CH), 123.3 (+, CH), 119.5 (+, CH), 116.2 (+, CH), 113.1 (+, CH), 112.6 (+, CH), 111.2 (+, CH), 109.7 (+, CH), 109.2 (+, CH), 92.2 (+, CH, Isoxazol-CH), 28.4 (+, $(\text{CH}_3)_3$).

ESI-MS (120 eV) m/z (%): 525.2 (100) $[\text{MH}^+]$ (MW = 526.20 g/mol).

Anal. ($\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_5 \times 0.33 \text{DCM}$): Ber. C 61.57, H 4.86, N 15.22. Gef. C 61.50, H 5.04, N 14.85.

³⁴ Der gefundene Elementaranalysenwert für H weicht um 0.50% von der Theorie ab.

223**tert-Butyl (2-(4-(bromomethyl)benzamido)phenyl)carbamate** [188]

Darstellung aus **220** nach Beckers *et al.* [188].

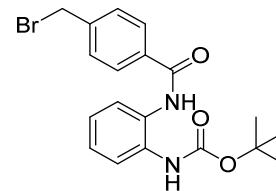
Ausbeute: 4.30 mmol aus 13.90 mmol → 31% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 282.2 – 283.0 °C (Lit. 282.0 – 283.0 °C) [188].

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3327, 1656.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.85 (s, 1H, NH), 8.69 (s, 1H, NH), 7.96 (dd, *J* = 6.6 Hz, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.61 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.18 (m, 2H, ArH), 7.55 (m, 2H, ArH), 4.82 (d, 2H, ArH), 1.45 (s, 9H, CH₃)₃.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 9.85 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.96 (dd, *J* = 6.6, 8.2 Hz, 2H), 7.61 (dd, *J* = 1.8, 8.3 Hz, 2H), 7.55 (m, 2H), 7.18 (m, 2H), 4.82 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 1.45 (s, 9H) [188].

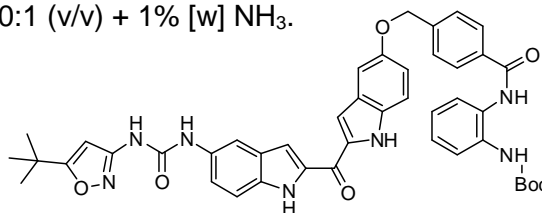
**224****tert-Butyl (2-(4-(((2-(5-(3-(5-(tert-butyl)isoxazol-3-yl)ureido)-1H-indol-2-carbonyl)-1H-indol-5-yl)oxy)methyl)benzamido)phenyl)carbamate**

Kopplung von **29** mit **223** in Anlehnung an die Vorschrift von Beckers *et al.* [188].

Ausbeute: 0.15 mmol aus 0.53 mmol → 28% (weißer Feststoff).

Säulenchromatographie (Kieselgel): DCM: MeOH 20:1 (v/v) + 1% [w] NH₃.

Schmelzpunkt: 200.5 – 200.9 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3287, 2977, 1662.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, Indol-NH), 9.82 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, NH), 9.46 (s, 1H, NH), 8.72 (d, *J* = 18.5 Hz, 2H, NH), 7.98 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.49 – 7.39 (m, 5H, ArH), 7.29 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 2H, ArH), 7.22 – 7.06 (m, 4H, ArH), 6.51 (s, 1H, Isoxazol-CH), 5.27 (s, 2H, CH₂), 1.39 (s, 9H, CH₃)₃, 1.30 (s, 9H, CH₃)₃.

ESI-MS (120 eV) *m/z* (%): 782.4 (100) [MH⁺] (MW = 781.32 g/mol).

Anal. (C₄₄H₄₃N₇O₇·x^{1/2}DMF): Ber. C 67.59, H 5.54, N 12.54. Gef. C 66.77, H 5.73, N 12.84.

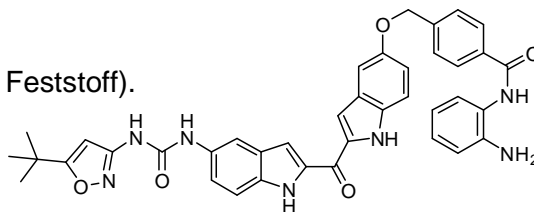
225

***N*-(2-Aminophenyl)-4-(((2-(5-(3-(5-(*tert*-butyl)isoxazol-3-yl)ureido)-1*H*-indol-2-carbonyl)-1*H*-indol-5-yl)oxy)methyl)benzamid**

Entschützung von **224** nach AV 7.

Ausbeute: 0.10 mmol aus 0.12 mol → 86% (weißer Feststoff).

Schmelzpunkt: 200.5 - 200.9 °C (Zersetzung).



IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 2973, 1669.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.88 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H, Indol-NH), 9.68 (s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, NH), 8.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.90 (s, 1H, ArH), 7.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.57 – 7.39 (m, 2H, ArH), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.29 (d, 2H, ArH), 7.17 (d, 1H, ArH), 7.10 (d, 1H, ArH), 7.02 – 6.92 (m, 1H, ArH), 6.78 (d, 1H, ArH), 6.60 (t, 1H, ArH), 6.51 (s, 1H, Isoxazol-CH), 5.25 (s, 2H, CH₂), 4.91 (s, 2H, NH₂), 1.30 (s, 9H, CH₃)₃.

ESI-MS (70 eV) *m/z* (%): 682.2 (100) [MH⁺] (MW = 681.27 g/mol).

Anal. (C₃₉H₃₅N₇O₅·xDCM): Ber. C 62.66, H 4.86, N 12.79. Gef. C 63.04, H 4.90, N 13.09.

F. Material und Methoden

2. Material und Geräte

Absauggerät (Pumpe)	VWR
Analysenwaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen Kern&Sohn, Balingen-Frommern
Blotkammer, Mini Trans Blot® Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Durchflusszytometer, FACSCanto	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Expositionskassetten	Amersham Pharmacia, Freiburg
Flüssigstickstofftank	Cryoson, Schöllkrippen
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Proteingelelektrophoresekammer (Xcell SurLock Mini Cell)	Invitrogen, Darmstadt
Heizblock BT 130-2	Heap Labor Consult, Bovenden
Infrarot-Abbildungsanlage, Typ Odyssey	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen Bosch, Gerlingen Schillerhöhe
Kühlzentrifuge	Thermo-Scientific, Waltham, USA
Mikroskop TMS-F	Nikon, Düsseldorf Carl Zeiss, Jena
Mikro-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Odyssey® - Infrared-Imaging-Systems	Li-COR Biotechnology, Lincoln, USA
pH-Meter, Typ Five Easy	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipetten (Pipetman)	Gilson, Middleton
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Landquart
Probenkämme für SDS-PAGE	Invitrogen, Darmstadt
Rocking Platform Shaker	VWR, Darmstadt
Rollenmischgerät	VWR, Darmstadt

Sterilbank	Heto-Holzen A/S, Allerød, DK BDK Luft- und Reinraumtechnik Bio Flow Technik, Meckenheim
Tiefkühler (- 20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen Bosch, Gerlingen Schillerhöhe
Tiefkühler (- 80 °C)	Symo, München Heraeus, Oderode
Vakuumpumpe N022 AN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Vi-Cell XR Cell Analyzer	Beckmann Coulter, Krefeld
Vortexer	Bender & Hobein, Zürich Cenco, Breda, NL
Wasserbad	Haske, Karlsruhe
Zentrifuge, Megafuge 16	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Centrifuge 3K30	LTF Labortechnik

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 30%ig	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagenz	Bio-Rad, München
Coulter Clenz Cleaning Agent	Beckman Coulter, Krefeld
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Krefeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
ECL Plus Detection Reagenz	Amersham Pharmacia, Freiburg
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethan-1-sulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad, München
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PenicillinG/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Rainbow Marker	Amersham Pharmacia, Freiburg
RNase A Solution	Merck, Darmstadt
Roti®-Load (Lämmli-puffer)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypan Blau	Invitrogen, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20 (Polysorbat 20)	Merck, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien

6/24/96-well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen Nunc, Thermo Elektron LED, Langenselbold
Einmalpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS-Analyseröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
GelBlotting Papier	Schleicher&Schüll, Dassel
Glaswaren	Schott Duran, Wertheim Simax Bohemia Cristal Selb
High Performance Chemiluminescence Film	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nitrozellulose-Membran Protan®	Whatman, Dassel
Pasteurpipetten	Pechiney Plastic Packaging Company, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0.5 ml/1.5 ml/2.0 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen/Mehrzweckgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
SDS-Gelkassetten	Invitrogen, Darmstadt
Sterilfilter	Millipore, Billerica, MA, USA
Vi-Cell 4 ml Sample Vial	Beckmann Coulter, Krefeld
Vollpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

Medien und Komponenten für Zellkultur

Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma (Taufkirchen), PAN (Aidenbach)
RPMI 1640 + Glutamax	GIBCO (Invitrogen, Darmstadt)
PenicillinG-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Darmstadt

Zelllinien

MV4-11	Humane akute monozytäre Leukämie-Zelllinie aus peripherem Blut eines 10-jährigen Jungen mit AML FAB F5	RPMI + 20% FCS + 1% Pen/Strep
Ba/F3	Murine IL-3 abhängige pro-B-Zelllinie aus dem peripheren Blut einer BALB/c Maus	RPMI + 10% FCS + 10% WEHI-3B Überstand + 1% Pen/Strep
WEHI-3B	Murine IL-3 produzierende myelomonocytäre Leukämie-Zelllinie aus peripherem Blut einer BALB/c Maus	

Inhibitoren und Zytokine

Bezeichnung		Herkunft
8 (AC220)	FLT3-Inhibitor	Synthetisiert am AK Mahboobi
Imatinib	Bcr-Abl-Inhibitor	L.C. Laboratories, Woburn, MA, USA
168 (LBH-589)	HDAC-Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
167 (SAHA)	HDAC-Inhibitor	Synthetisiert am AK Mahboobi
FLT3-Ligand (rmFLT3)		Promocell, Heidelberg Immunttools, Friesoythe
Interleukin-3 (IL-3)		Biosource, Camarillo, CA, USA Immunttools, Friesoythe

Antikörper**Primärantikörper**

Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft
Anti- β -Actin	mAb (1:2500)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FLT3-Flk2 (S-18): sc-480	pAb (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Phospho-FLT3 (Tyr591)	pAb (1:500)	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Phospho-STAT5 (pTyr694)	mAb (1:1000)	Thermo-Scientific (Pierce Biotechnology), Rockford, USA
STAT5	mAb (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Sekundäre Detektionsantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft
IgG Kaninchen IRDye 800CW	1:10000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IgG Maus IRDye 800CW	1:10000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Puffer und Lösungen

Im Folgenden werden alle verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet:

Westernblot-Analyse

- Lysispuffer

0.5 l:

25 ml 1 M HEPES pH 7.5

15 ml 5 M NaCl

2.5 ml 200 mM EGTA

100 ml Glycerin 50%

5 ml Triton X-100

Net Puffer (10x)

5 l:

438.3 g NaCl

93.6 g Na₂EDTA

802.85 g Tris

25 g Triton X-100

ad aqua dest. auf 5 l, pH 7.7

- G-Net Puffer

1 l:

Net 1x mit 2.5 g Gelatine aufkochen

- 1.5M Tris/HCl pH 8.8

5 l:

908.55 g Tris

ad aqua dest. auf 5 l, pH 8.8

- 1.5 M Tris/HCl pH 6.8

5 l:

908.55 g Tris

ad aqua dest. auf 5 l

pH 6.8

- 10% SDS

10 g SDS

ad 100 ml aqua dest.

- 10% APS

1 g Ammoniumpersulfat

ad 10 ml aqua dest.

Aliquots a 1 ml bei -20 °C lagern.

- Elektrophoresepuffer (10x)

5 l:

151.4 g Tris

720.65 g Glycin

50.0 g Natriumdodecylsulfat

ad aqua dest. auf 5 l, pH 8.3

- Semi-Dry-Blotting-Buffer

1 l:

80 ml Transblot

200 ml Methanol

ad aqua dest.

- Transblot-Puffer

5 l:

72.75 g Tris

36.36 g Glycin

0.475 g Natriumdodecylsulfat

ad aqua dest. auf 5 l

- Stripping Puffer

1 l:

70 ml 2-Mercaptoethanol

7.56 g Tris

20 g Natriumdodecylsulfat

ad aqua dest. auf 1 l, pH 6.7

- TBS (TrisBuffered Saline) (10x)

5 l:

12.11 g Tris

87.99 g NaCl

ad aqua dest. auf 5 l, pH 8.0

- TBST

TBS 1x

0.1% Tween20

Analyse am Durchflusszytometer

- 80% EtOH

400 ml EtOH (99,9 %) + 100 ml aqua dest.

- Propidiumiodid-Lösung:

50 g/ml in aqua dest.

2. Methoden

2.1 Kultivierung humaner Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden vom KKG Leukämie in München bzw. vom Institut für Toxikologie, Uniklinik Mainz zur Verfügung gestellt. Um die Zellen aufzutauen und in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen kurz ins 37 °C warme Wasserbad gehalten. Die Zellen wurden direkt in warmem Medium aufgenommen und darin gewaschen (5 min, RT, 1000 U/min). Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine Kulturflasche transferiert. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre. Die humane AML-Zelllinie MV4-11 wurde in RPMI-1640 Medium mit 20% FCS und 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert und ca. jeden dritten Tag 1:3 gesplittet. Die IL-3-abhängige murine Zelllinie Ba/F3 wurden in RPMI-1640 Medium mit 10% FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin und 10% WEHI-3B konditioniertem Medium kultiviert. Die Zelllinien wurden ca. alle drei Tage 1:20 gesplittet. Die Zellzahl in der Suspension wurde mit Hilfe des Trypanblau-Exklusions-Test bestimmt. Der Farbstoff Trypanblau kann durch die perforierte Zellmembran toter Zellen eindringen, im Lichtmikroskop erscheinen diese dann blau, während vitale Zellen farblos sind. Die lebenden Zellen konnten mit der Neubauer-Zählkammer oder dem Vi-Cell Zellzähler gezählt werden. In der Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt, die Zellen unter dem Mikroskop (mindestens 2 Großquadrate) ausgezählt und die Zelldichte mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Anzahl lebender Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor}) \times 10\,000$$

Bei der Zellzählung im Vi-Cell hingegen wurden 500 µl der Zellsuspension in die Messbehälter gegeben und über Trypanblau-Exklusion ausgezählt.

Zusätzlich wurden Zellstocks in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Dazu wurden je 6×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in 1.5 ml Einfriergefäße überführt. Diese wurden in einen speziellen Einfriercontainer überführt und bei -80 °C eingefroren. Der Einfriercontainer enthält Isopropanol und gewährleistet somit eine langsame Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/min. Nach ca. einer Woche werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C eingelagert.

2.2 Bestimmung der Apoptosefrequenz mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Apoptosefrequenz erfolgte mit der Durchflusszytometrie, auch FACS (*engl.* fluorescence-activated cell sorting) genannt. Dabei wird die subG₁-Fraktion sowie die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt. Die SubG₁-Population ist durch fragmentierte, apoptotische Zellen charakterisiert, die wiederum durch degradierte DNA identifiziert werden können. Die nukleäre DNA wird durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z. B. Propidiumiodid (PI) angefärbt. Die Anregung der Farbstoffe erfolgt mit einem geeigneten Laser, wobei die Fluoreszenz einer Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist. Deshalb ist es möglich, den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus einer Zelle bzw. Zellpopulation im Durchflusszytometer zu bestimmen.

Für einen Versuch wurden pro Well wurden 0.2×10^6 MV4-11-Zellen/ml ausgesät und mit den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen bzw. Zellpopulationen geerntet und mit PBS gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 100 µl kaltem PBS resuspendiert und durch tropfenweise Zugabe von 1 ml eiskaltem EtOH (80%) für ca. 1 h bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 2000 U/min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einem Gemisch aus 333 µl PBS und 1 µl RNase (SL 10 mg/ml) resuspendiert und für 1 h bei RT weiter inkubiert. Danach wurden 164 µl PI (SL 50 µl/ml) zugeführt und fortan auf Eis im Dunkeln gelagert. Die Proben wurden direkt im Anschluss am Durchflusszytometer FACSCanto gemessen. Die Auswertung der Apoptoserate erfolgte über die FACSDiva Software.

2.3 Untersuchung der Proteinexpression

2.3.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Um die Expression zellulärer Proteine nachzuweisen, wurden 1×10^7 Zellen ausgesät. Nach 3 h Inkubation wurden die behandelten Zellen geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Die Pellets wurden in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert, um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten. Anschließend wurde die Zellsuspension weitere 30 min bei 4 °C und 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann per SDS-PAGE-Analyse untersucht und bei -20 °C gelagert.

2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der photometrischen Methode von Bradford [229]. Dabei bildet der im sauren Reagenz enthaltene Farbstoff Brilliant Blue-G Komplexe mit den Seitenketten der Proteine. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nach 595 nm. Dabei ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm proportional zur Proteinkonzentration und kann am Spektralphotometer gemessen werden. Die Lysate wurden 1:10 mit dem BioRad-Dye-Reagenz versetzt, wobei dieses 1:5 mit Aqua dest. verdünnt wurde. Es wurden 20 µl der Probe mit 180 µl BioRad-Dye-Reagenz versetzt und die Absorption nach 5 min Inkubation bei 595 nm vermessen. Zusätzlich wurden noch die Blank-Kontrolle, also BioRad-Dye-Reagenz mit Wasser und eine BSA-Konzentrationsreihe (200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml) als Standards vermessen. Anhand einer BSA-Kalibriergeraden konnte die absolute Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.4. Western Blot Analyse

2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld unter denaturierenden Bedingungen getrennt. Zur Detektion wurden 7.5%ige Polyacrylamidgele verwendet. Zunächst wurde das Gemisch für das Trenngel in die Gelkammer gegossen und zum Glätten der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisationszeit dauerte etwa 30 min. Danach wurde Isopropanol abgegossen, das Sammelgemisch auf das Trenngel gegossen und ein 1.0 mm breiter Kamm mit 10 Taschen eingebracht.

Gelvolumen für 1 Gel: Platten: 1.0 mm, Taschenbreite des Kamms: 1.0 mm

Substanz	Trenngel 7.5%	Sammelgel
Aqua dest.	2.85 ml	3.0 ml
Acrylamid (40%)	2.0 ml	0.65 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.0 ml	-
1 M Tris (pH 6.8)	-	1.25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
10% APS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, konnte das Gel entweder sofort verwendet oder für wenige Tage feucht im Kühlschrank gelagert werden. Nachdem der Kamm entfernt wurde, wurden die Taschen mit Elektrophorese-Puffer gespült. Das fertige Gel wurde in die Gelkammer gesetzt, welche anschließend mit Elektrophorese-Puffer gefüllt wurde. Die gewonnenen Zelllysate wurden 1:4 mit 4x Lämmli-puffer oder 1:1 mit dem 2x Lämmli-puffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Taschen mit den Proben beladen. Die Probenmenge pro Tasche lag bei ca. 35-40 µg. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Proteinmarker von 10 µL aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 60-80 mA.

2.4.2. Proteintransfer

Zur Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die semidry-Blot Methode mit Transferpuffer verwendet. Dabei werden die Proteine elektrisch von dem Gel auf die Membran übertragen. Der Proteintransfer wurde bei 250 mA für 90 min bei RT durchgeführt.

2.4.3. Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz

Anschließend wurde die Membran 3 x 20 min mit G-Net Puffer blockiert und mit dem Primärantikörper in G-Net über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dieser für 3 x 10 min mit TBST ausgewaschen und die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:20000 in G-Net, HRP „horse radish peroxidase“-gekoppeltes anti-Kaninchen- oder anti-Maus-Immunglobulin) für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder 3 x 10 min mit TBST und einmal kurz mit PBS gewaschen. Die Proteine konnten dann mit dem Chemilumineszenz-Reagenz ECL-Plus-Westernblot-Detection-System auf einem Hyperfilm detektiert werden.

2.4.4. Detektion der Proteine mittels Odyssey®-Infrared-Imaging-System

Die Membran musste anschließend bei RT für mind. 1 h in 5% Milchpulver in TBST geblockt werden, damit unspezifische Antikörperbindungen verhindert werden. Nach dem Blocken wurde die Membran 3 x 10 min in TBST gewaschen und die Lösung mit dem Primärantikörper (in 2% Milchpulver/TBST) inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran wieder 3 x 10 min mit TBST gewaschen und 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper im Dunklen inkubiert. Danach wurde die Membran

erneut 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Da der Sekundärantikörper mit einem Infrarot-Farbstoff gekoppelt war, erfolgte die Detektion der Proteine mithilfe des Odyssey® - Infrared-Imaging-Systems. Die Membran wurde nass gescannt und mithilfe der Software ImageStudio bearbeitet.

2.5. Strippen der Nitrozellulosemembran

Um die Nitrozellulose-Membran mehrmals verwenden zu können, um also verschiedene Antikörpern gegen unterschiedliche Proteine auf einer Membran zu detektieren, musste diese „gestrippt“ werden. Dabei wurden die zuvor entstandenen Protein-Antikörper Interaktionen aufgelöst. Hierzu wurde die Nitrozellulose-Membran für 40 min bei 56 °C in 20 ml StrippPuffer mit 100 µl β-Mercaptoethanol auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x10 Minuten mit TBST gewaschen und dann für 1 h mit 5% Milchpulver in TBST oder 10% G-Net-Puffer blockiert. Die Membran konnte daraufhin mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

2.6. Immunpräzipitation

Hierbei soll der FLT3-Rezeptor aus Ganzzelllysaten immunpräzipitiert werden, um eine Verstärkung der Phosphorylierung nachweisen zu können. Dazu wurden 450 µg Protein des Ganzzelllysates eingesetzt, welches mit 2 µg des spezifischen FLT3-Flk2 Antikörpers versetzt wurde. Diese Zellysate wurden anschließend auf 1000 µl mit Lysispuffer aufgefüllt und über Nacht auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden zur Bindung des Protein-Antikörper-Komplexes 30 µl Protein-G-Agarose zugegeben und für weitere 5 h auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Immunpräzipitate bei 2500 rpm für 2 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und 3x mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Nach Zugabe von 30 µl Lämmli-Puffer wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und über SDS-PAGE analysiert.

2.7. Proliferationsassay

Um das Zellwachstum von Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen zu bestimmen, wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl in einer 48-well Platte ausgesät und 72 h kultiviert. Die humanen AML Zellen, MV4-11, wurden in einer Dichte von 0.2×10^6 und die murinen Ba/F3-Zellen mit einer Zelldichte von 0.04×10^6 pro ml ausgesät.

Anschließend wurde die Zellzahl der viablen Zellen mittels Vi-Cell bestimmt. Die Zellzahl in den unbehandelten Kontrollen wurde bei der Auswertung als 100% dargestellt und die Zellzahl in den behandelten Ansätzen jeweils im Vergleich dazu angegeben.

2.8. Löslichkeitsversuche von **37 (BS228)** mit Hilfe von UV-Absorption

Es wurden zwei Lösungen von **37 (BS228)** mit Konzentrationen von 5.636×10^{-6} und 5.211×10^{-6} mol/l in Methanol hergestellt. Diese wurden anschließend 1:10 mit dest. H₂O verdünnt, um eine 10%ige Stammlösung in Methanol zu erreichen. Diese Stammlösungen wurden dann in einer Verdünnungsreihe mittels UV-Absorption vermessen. Diese Werte dienen zur Ermittlung einer Kalibriergeraden.

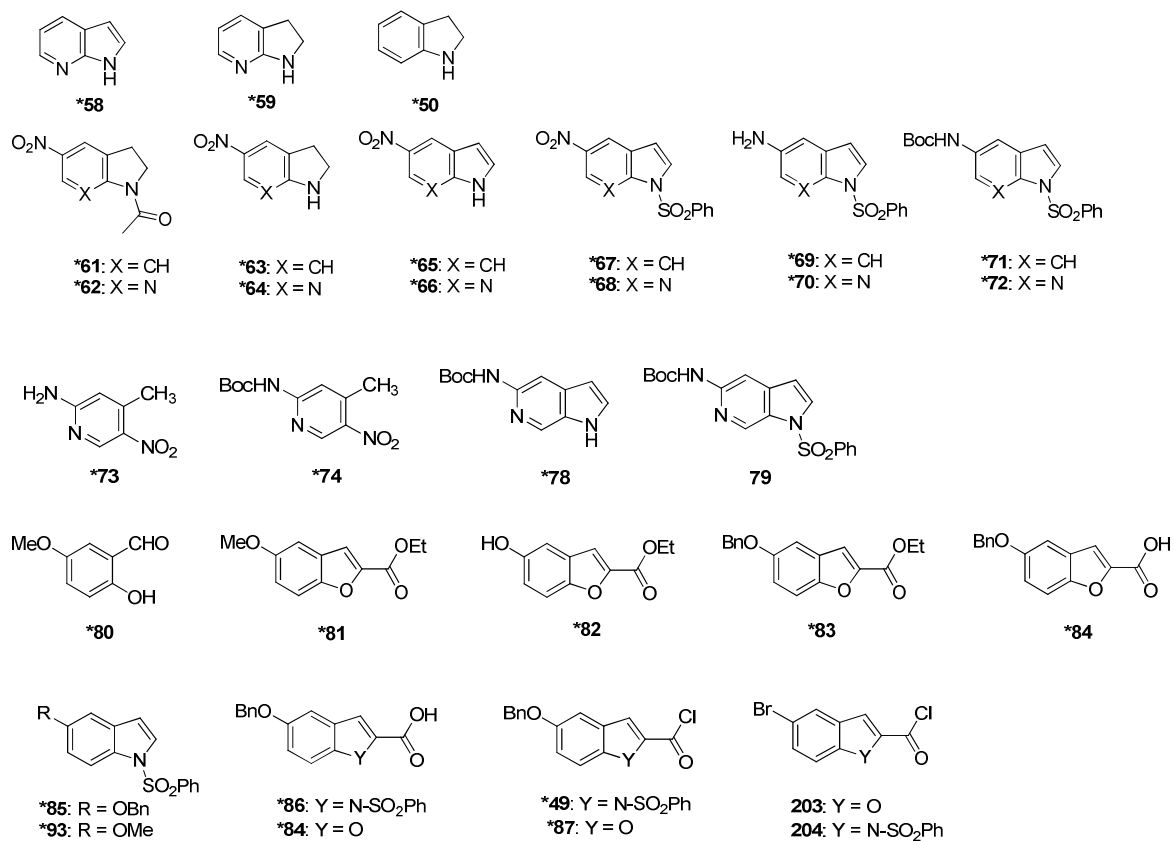
Von **37 (BS228)** wurden verschiedene Mengen eingewogen und mit einer Verdünnungsreihe aus Captisol® mit H₂O suspendiert (Tabelle 14). Die erhaltenen Suspensionen **A-E** wurden sonifiziert und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 Tagen wurden die Lösungen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mittels UV-Absorption vermessen.

Lösungen	Einwaage 37 (BS228)	Captisol® - Lösungen	w/v
A	46.038 mg	400 mg in 1 ml H ₂ O-Lsg.	40%
B	23.014 mg	0.5 ml Lsg. A + 0.5 ml H ₂ O	20%
C	12.006 mg	0.5 ml Lsg. B + 0.5 ml H ₂ O	10%
D	6.006 mg	0.5 ml Lsg. C + 0.5 ml H ₂ O	5%
E	3.054 mg	0.5 ml Lsg. D + 0.5 ml H ₂ O	2.5%

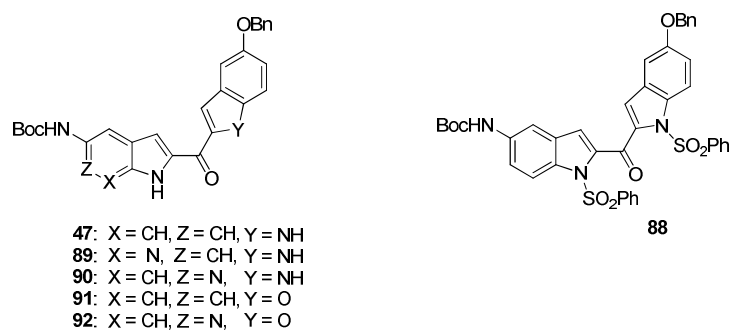
Tabelle 14. Übersicht der dargestellten Lösungen von **37 (BS228)** mit Captisol®.

G. Formelübersicht

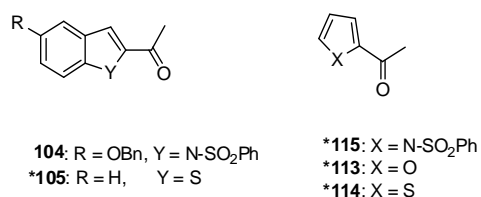
Ausgangsbausteine



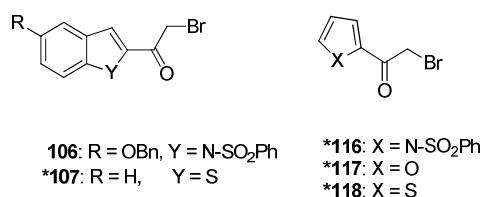
Gekoppelte Bisindole und deren Derivate



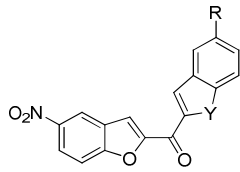
Acetylierte Edukte



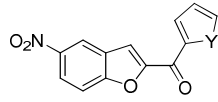
„bromierte“ Edukte



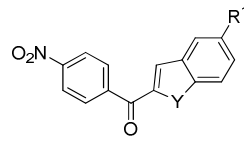
„Nitroverbindungen“



111: R = OBn, Y = NH
110: R = H, Y = S

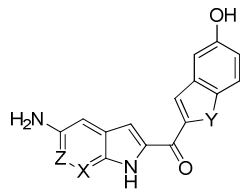


*119: Y = NH
120: Y = O
121: Y = S

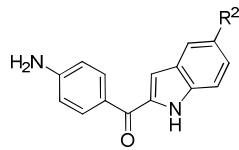


97: R¹ = OBn
*98: R¹ = OMe

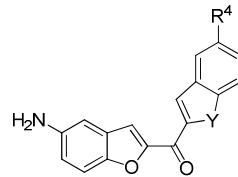
„Aminokomponenten“



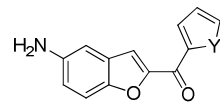
127: X = CH, Z = CH, Y = O
128: X = CH, Z = CH, Y = NH
129: X = CH, Z = N, Y = NH
130: X = CH, Z = CH, Y = O



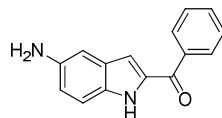
131: R² = OH
*132: R² = OMe



133: R⁴ = H, Y = S
134: R⁴ = OH, Y = NH

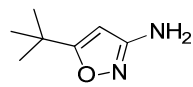


135: Y = NH
136: Y = O
137: Y = S

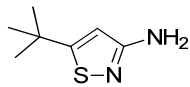


102

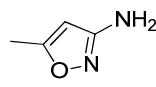
Kopplungsbausteine



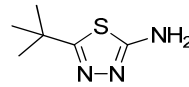
*138



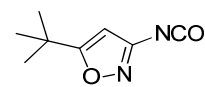
*147



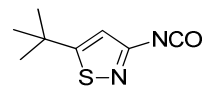
*149



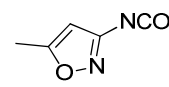
*151



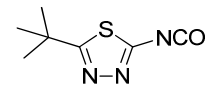
*140 (BIZ-NCO)



*148 (BIT-NCO)

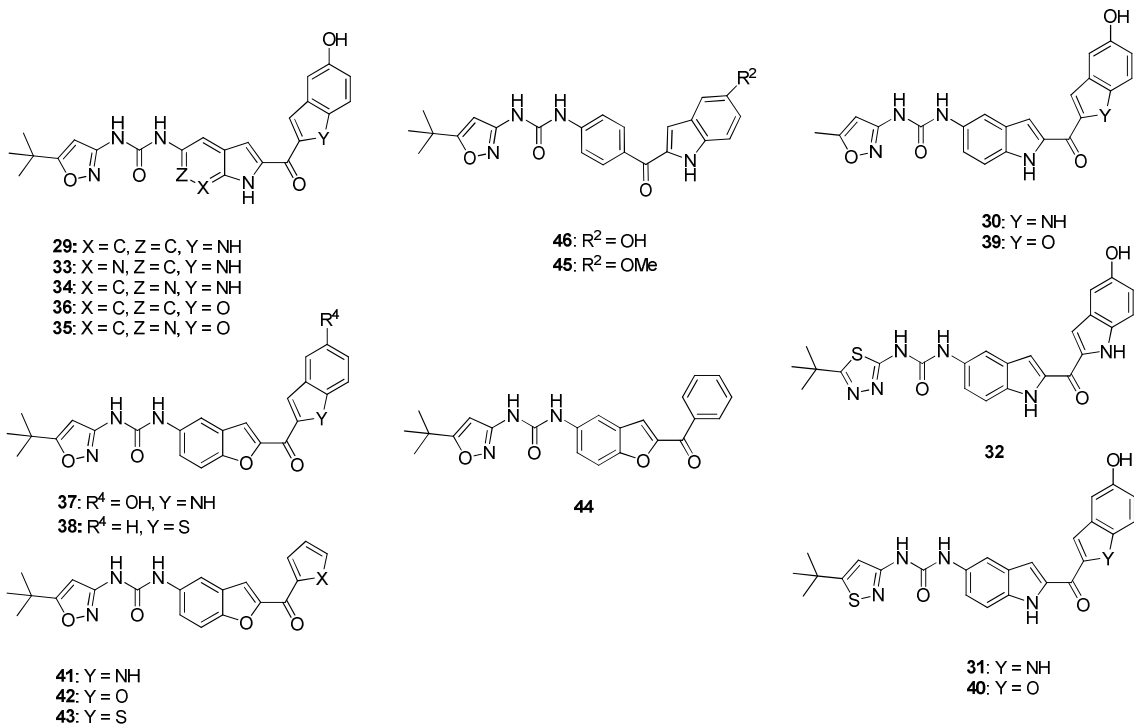


*150 (MIZ-NCO)

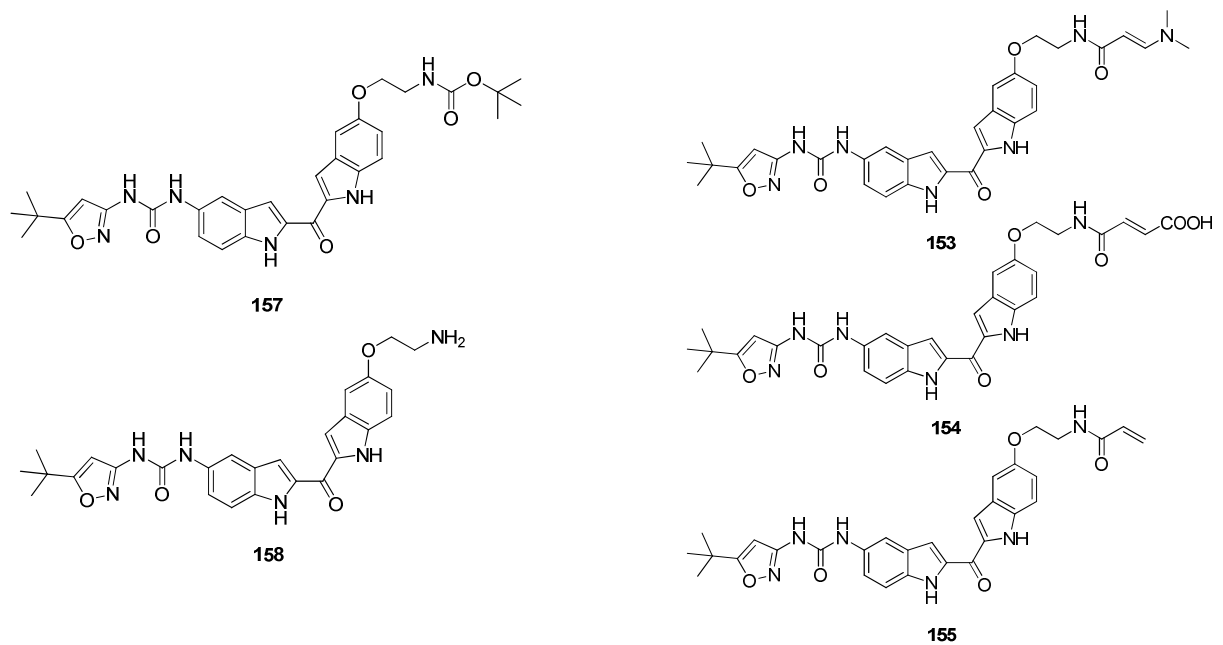


*152 (BTD-NCO)

FLT3-Inhibitor Derivate und potentielle FLT3i:

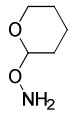


Edukte für potentielle irreversible Inhibitoren und potentielle irreversible Inhibitoren

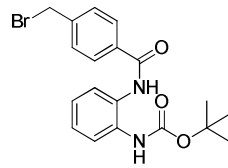


Chimäre Verbindungen

Kopplungsbausteine:

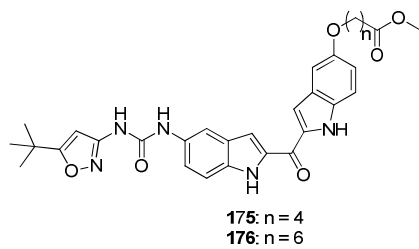


*188

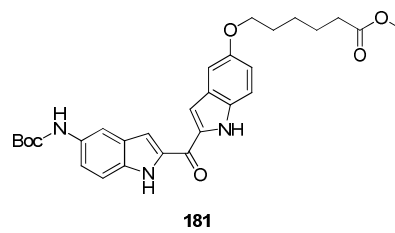


*223

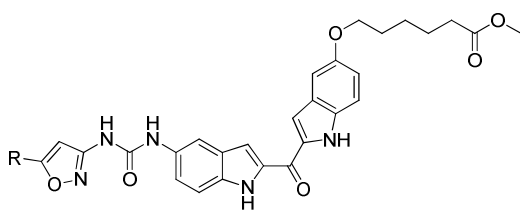
Chimäre Verbindungen mit Strukturanteil von **167** (SAHA)



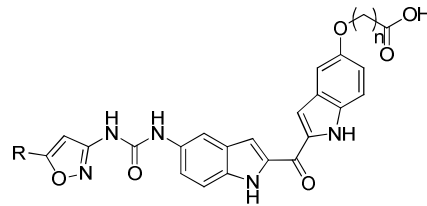
175: n = 4
176: n = 6



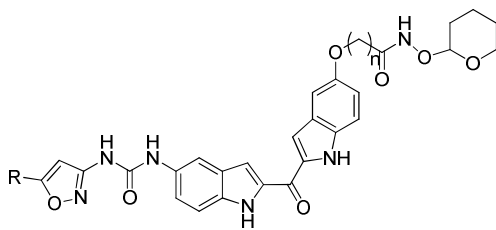
181



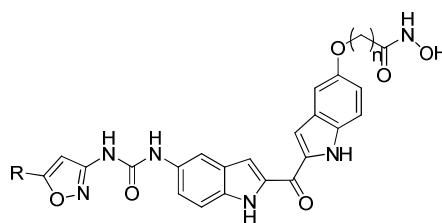
182: R = *tert*(butyl)
183: R = methyl



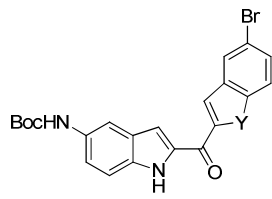
177: R = *tert*(butyl), n = 4
178: R = *tert*(butyl), n = 6
184: R = *tert*(butyl), n = 5
185: R = methyl, n = 5



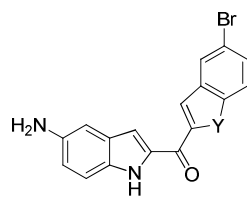
189: R = *tert*(butyl), n = 4
190: R = *tert*(butyl), n = 6
191: R = *tert*(butyl), n = 5
192: R = methyl, n = 5



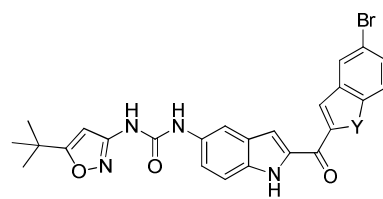
193: R = *tert*(butyl), n = 4
194: R = *tert*(butyl), n = 6
195: R = *tert*(butyl), n = 5
196: R = methyl, n = 5

Chimäre Verbindungen mit Strukturanteil von **168** (LBH-589)

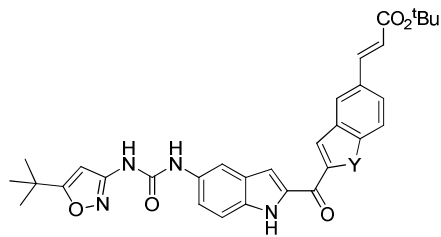
205: Y = O
206: Y = NH



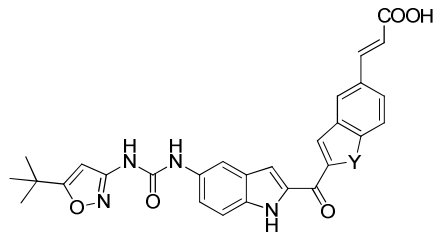
207: Y = O
208: Y = NH



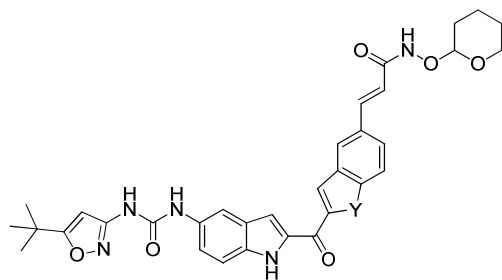
209: Y = O
210: Y = NH



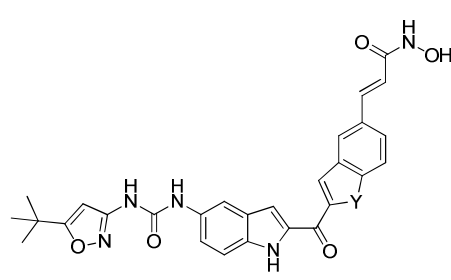
211: Y = O
212: Y = NH



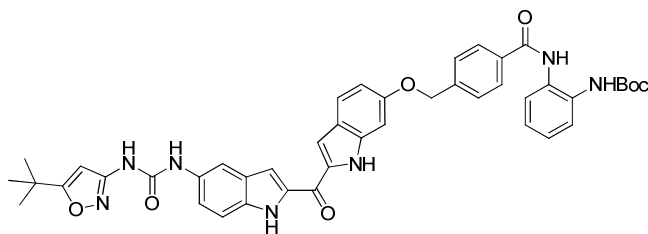
213: Y = O
214: Y = NH



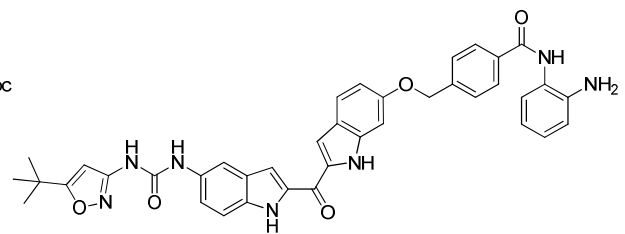
215: Y = O
216: Y = NH



217: Y = O
218: Y = NH

Chimäre Verbindungen mit Strukturanteil von **169** (MS-275)

224



225

H. Anhang

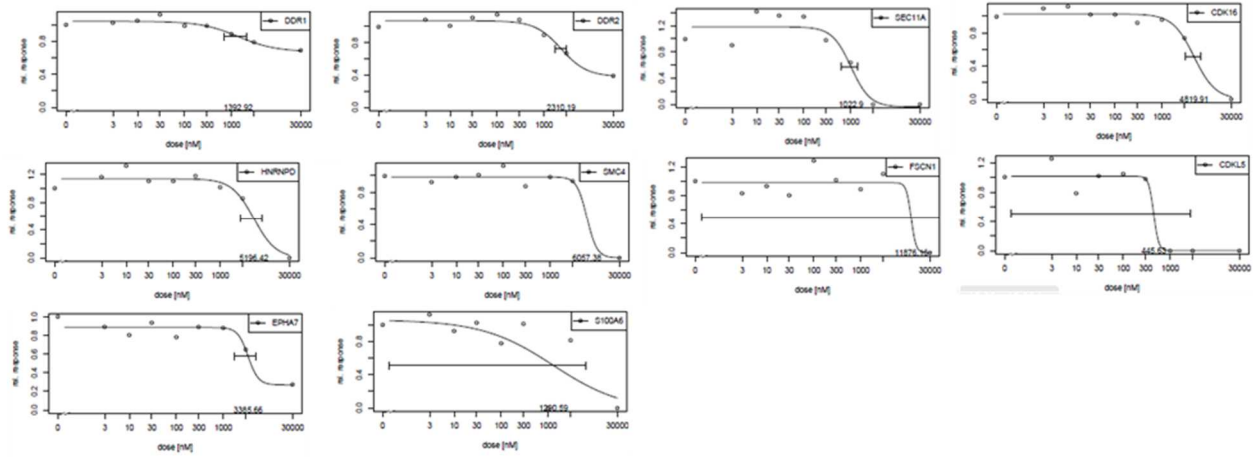


Abbildung 51. Darstellung zusätzlicher potentieller Targets aus dem Kinobead Versuch 1 (im Zellmix).

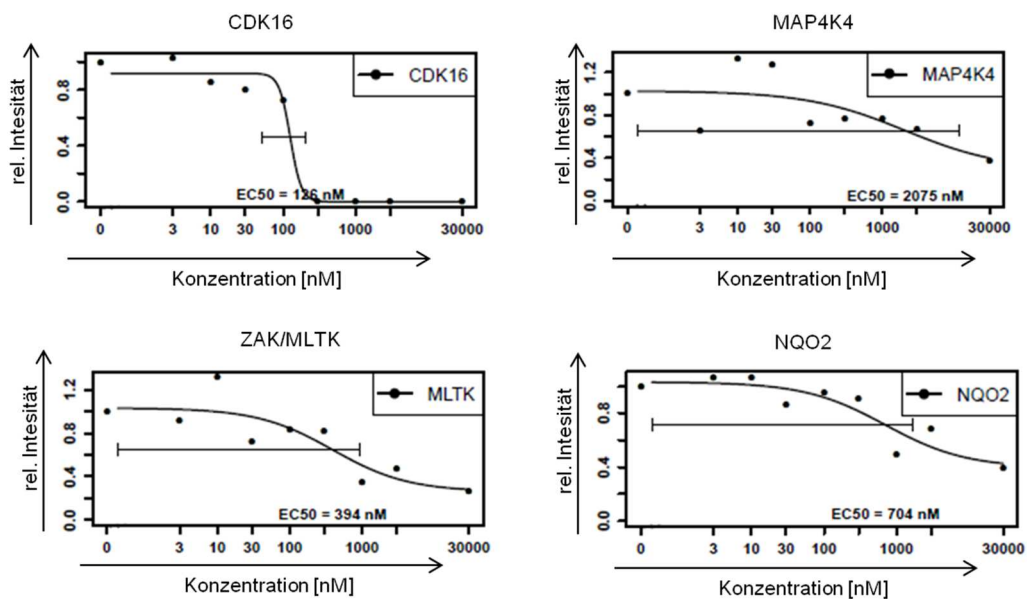


Abbildung 52. Darstellung der zusätzlichen potentiellen Targets aus dem Kinobead Versuch 2 (in MV4-11-Zellen).

Mutation	IC ₅₀ , nM
Parental	514.2 ± 158.5
FLT3-ITD	9.1 ± 3.8
D835V	2.9 ± 0.5
D835Y	5.3 ± 2.7
FLT3-ITD/F691L	55.4 ± 14.4
FLT3-ITD/D835V	13.1 ± 4.8
FLT3-ITD/D835Y	13.9 ± 4.3
FLT3-ITD/D835H	12.3 ± 2.5
FLT3-ITD/D835F	16.5 ± 0.4
FLT3-ITD/Y842C	15.4 ± 4.8
FLT3-ITD/Y842H	17.9 ± 2.0

Abbildung 53. Zum Vergleich: **9** (Crenolanib) **S1** aus [72].

Table 1. Potency comparison of FLT3 inhibitors in biochemical and cellular assays

Compound	FLT3 activity (IC ₅₀ , nM)		Human leukemia cell line (IC ₅₀ , nM)		BaF3 cells with FLT3 mutants (IC ₅₀ , nM)					
	WT	D835Y	MV4-11	Molm-14	WT	ITD	ITD/N676D	ITD/F691L	D835Y	D835Y/N676D
G-749	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	3.5 ± 0.9	7.5 ± 0.3	6.1 ± 0.4	11.8 ± 3.7	21.4 ± 1.1	38.1 ± 6.6	3.1 ± 0.5	2.1 ± 0.7
AC220	8.8 ± 1.4	28.2 ± 2.1	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.5	9.0 ± 1.8	3.7 ± 0.8	36.2 ± 4.0	194.2 ± 28	52.4 ± 4.7	149.7 ± 27.0
PKC412	15.4 ± 3.5	24.2 ± 3.1	18.5 ± 2.8	21.5 ± 1.5	28.9 ± 3.0	21.6 ± 1.1	128.7 ± 29	16.1 ± 4.7	11.4 ± 1	17.3 ± 3.7

Biochemical kinase assay for FLT3-WT and FLT3-D835Y obtained from Cerna Bioscience Inc. was performed in time-resolved fluorescence resonance energy transfer in series concentration of G-749, AC220, and PKC412, and their IC₅₀ values were calculated. For the determination of IC₅₀ values in human leukemia cell lines, the MV4-11 and Molm-14 cells were treated with test inhibitors, and cell viability was measured. The BaF3 model cell expressing double FLT3 mutants, FLT3-ITD/N676D, FLT3-ITD/D835Y, and FLT3-D835Y/N676D, and single mutants, FLT3-ITD and FLT3-D835Y, were treated with test inhibitors, and cell viability was measured.

Abbildung 54. Zum Vergleich: **10** (G-749) und **37** (BS228) Tabelle 1 aus [79].

I Publikationen

Mahboobi, Siavosh; Sellmer, Andreas; Pongratz, Herwig; Pils, Bernadette; Krämer, Oliver; Kindler, Thomas; Beyer, Mandy: *Synthesis, Pharmacology and use of New and Selective FMSlike tyrosine kinase 3 (FLT3) FLT3 Inhibitors*, Patent WO2019/034538A1.

Mahboobi, Siavosh; Pils, Bernadette; Sellmer, Andreas: *Generation and Assessment of Fusions Between HDACi and TKi*; *Methods Mol Biol.* 2017;1510:405-412.

Sellmer, Andreas; Pils, Bernadette; Beyer, Mandy; Pongratz, Herwig; Wirth, Lukas; Dove, Stefan; Spiekermann, Karsten; Polzer, Harald; Klaeger, Susan; Kuster, Bernhard; Böhmer, Frank-D.; Fiebig, Heinz-Herbert; Kraemer, Oliver H.; Mahboobi, Siavosh: *A series of novel aryl-methanone derivatives as inhibitors of FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia*; Manuskript in Bearbeitung.

J Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt., *Todesursachen in Deutschland*, 2014: Wiesbaden.
2. Krebsregisterdaten, Z.f., *Krebs in Deutschland 2011/2012*, 2015, Robert Koch Institut: Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
3. Klinger, J.M., *Entzündungshemmende Effekte von ionisierender Strahlung, untersucht in Co-Kultur Systemen humander Endothelzellen und Leukozyten*. Technische Universität Darmstadt, 2012. **Dissertation**.
4. Faderl, S., et al., *The Biology of Chronic Myeloid Leukemia*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(3): p. 164-172.
5. Jagannathan-Bogdan, M. and L.I. Zon, *Hematopoiesis*. Development (Cambridge, England), 2013. **140**(12): p. 2463-2467.
6. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-644.
7. Wörmann, B., *Akute Myeloische Leukämie (AML)*, in *Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen 2010*, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.: Berlin.
8. Harris, N.L., et al., *The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997*. Ann Oncol, 1999. **10**(12): p. 1419-32.
9. Marschalek, R., *Genetische Grundlagen von Leukämie-Erkrankungen*. Pharmazie in unserer Zeit, 2012. **41**(3): p. 190-195.
10. Schaich, M., *Akute myeloische Leukämie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose 2008*: Ehninger, G., Link, H., Berdel, W. E.
11. Brandts C., Kim A., Serve H., *Die Akute Myeloische Leukämie (AML) des Erwachsenen*, in *Wissenswertes Informationen rund um die AML für Patienten und Angehörige*, K. Leukämie, Editor 2010, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Medizinische Klinik II: Frankfurt a. M.
12. Christ, O., et al., *Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie*. Medizinische Klinik, 2007. **102**(4): p. 290-295.
13. Deshpande, A.J. and C. Buske, *Lymphoid Progenitors as Candidate Cancer Stem Cells in AML: New Perspectives*. Cell Cycle, 2007. **6**(5): p. 543-545.
14. Matthews, W., et al., *A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations*. Cell, 1991. **65**(7): p. 1143-52.
15. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1110-1119.
16. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. Leukemia, 1996. **10**(2): p. 238-48.
17. Stirewalt, D.L. and J.P. Radich, *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(9): p. 650-665.
18. Rosnet, O., et al., *Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene*. Genomics, 1991. **9**(2): p. 380-5.
19. Grafone, T., et al., *An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment*. Oncology Reviews, 2012. **6**(1): p. e8.
20. Kottaridis, P.D., R.E. Gale, and D.C. Linch, *Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(6): p. 905-13.
21. Annesley, C. and P. Brown, *The biology and targeting of FLT3 in pediatric leukemia*. Frontiers in Oncology, 2014. **4**.
22. Griffith, J., et al., *The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain*. Molecular Cell, 2004. **13**(2): p. 169-178.
23. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-474.
24. Kindler, T., D.B. Lipka, and T. Fischer, *FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years*. Blood, 2010. **116**(24): p. 5089-5102.
25. Fröhling, S., et al., *Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenetic and Clinical Implications*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(26): p. 6285-6295.
26. Naoe, T. and H. Kiyoi, *Normal and oncogenic FLT3*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(23): p. 2932-8.

27. Reindl, C. and K. Spiekermann, *From kinases to cancer: leakiness, loss of autoinhibition and leukemia*. Cell Cycle, 2006. **5**(6): p. 599-602.
28. Heidel, F., et al., *Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain*. Blood, 2006. **107**(1): p. 293-300.
29. Abu-Duhier, F.M., et al., *Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 983-8.
30. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
31. Thiede, C., et al., *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4326-35.
32. Kindler, T., et al., *Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2005. **105**(1): p. 335-340
33. Grundler, R., et al., *FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4792-9.
34. Spiekermann, K., et al., *Overexpression and Constitutive Activation of FLT3 Induces STAT5 Activation in Primary Acute Myeloid Leukemia Blast Cells*. Clinical Cancer Research, 2003. **9**(6): p. 2140-2150.
35. Choudhary, C., et al., *AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations*. Blood, 2005. **106**(1): p. 265-273
36. Reindl, C., et al., *Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3700-3707
37. Breitenbuecher, F., et al., *Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor*. Blood, 2009. **113**(17): p. 4074-4077
38. <http://www.krankheiten.de/Krebs/index.php>.
39. Mutschler, E., et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Pharmakologie, klinische Pharmakologie und Toxikologie 2012*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
40. <https://www.krebsgesellschaft.de/basis-informationen-krebs/therapieformen.html>.
41. Larson, R.A. *Patient information: Acute myeloid leukemia (AML) treatment in adults (Beyond the Basics)*. 2005.
42. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1154-63.
43. Appelbaum, F.R., et al., *Acute myeloid leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2001: p. 62-86.
44. Appelbaum, F.R., et al., *Age and acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3481-3485
45. Farag, S.S., et al., *Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461*. Blood, 2006. **108**(1): p. 63-73.
46. Estey, E.H., *How I treat older patients with AML*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1670-1673.
47. Mizuki, M., et al., *Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3907-14.
48. Kiyoi, H., et al., *A novel FLT3 inhibitor FI-700 selectively suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4575-82.
49. Fathi, A. and M. Levis, *FLT3 Inhibitors: A story of the old and the new*. Current Opinion in Hematology, 2011. **18**: p. 71-76.
50. Grunwald, M. and M. Levis, *FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance*. International Journal of Hematology, 2013. **97**(6): p. 683-694.
51. Schittenhelm, M.M., et al., *The FLT3 inhibitor tandutinib (formerly MLN518) has sequence-independent synergistic effects with cytarabine and daunorubicin*. Cell Cycle, 2009. **8**: p. 2621-2630.
52. Chao, Q., et al., *Identification of N-(5-tert-butyl-isoxazol-3-yl)-N'-{4-[7-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)imidazo[2,1-b][1,3]benzothiazol-2-yl]phenyl}urea dihydrochloride (AC220), a uniquely potent, selective, and efficacious FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitor*. J Med Chem, 2009. **52**(23): p. 7808-16.
53. Shiotsu, Y., et al., *KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1607-17.

54. Pratz, K.W., et al., *A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response*. Blood, 2009. **113**(17): p. 3938-3946.
55. Smith, J. *FDA gives breakthrough status to midostaurin for AML*. 2016.
56. FDA Commissioner. *Office of the "Press Announcements – FDA approves new combination treatment for acute myeloid leukemia*. 2017 [cited 2017 September 28].
57. Smith, B.D., et al., *Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3669-3676
58. Knapper, S., et al., *A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3262-3270
59. Metzelder, S., et al., *Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6567-71.
60. <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/28700>. 2007.
61. http://www.eurekalert.org/pub_releases/2007-06/i-id-nti060407.php.
62. Wick-Urban, B., *Renal cell cancer. Clearly better prognosis due to new drugs*. Pharm. Ztg., 2008. **153**(Copyright (C) 2016 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 14-21.
63. Choudhary, C., et al., *Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions*. Science, 2009. **325**(5942): p. 834-840
64. Engen, C.B.N., et al., *Targeted Therapy of FLT3 in Treatment of AML—Current Status and Future Directions*. Journal of Clinical Medicine, 2014. **3**(4): p. 1466-1489.
65. Giles, F.J., et al., *SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes*. Blood, 2003. **102**(3): p. 795-801
66. O'Farrell, A.-M., et al., *An Innovative Phase I Clinical Study Demonstrates Inhibition of FLT3 Phosphorylation by SU11248 in Acute Myeloid Leukemia Patients*. Clinical Cancer Research, 2003. **9**(15): p. 5465-5476.
67. <http://www.medknowledge.de/neu/2005/IV-2005-48-sunitinib.htm>.
68. Zorn, J.A., et al., *Crystal structure of the FLT3 kinase domain bound to the inhibitor Quizartinib (AC220)*. PLoS One, 2015. **10**(4).
69. Lewis, N.L., et al., *Phase I Study of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Oral CP-868,596, a Highly Specific Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor in Patients With Advanced Cancers*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(31): p. 5262-5269.
70. Zimmerman, E.I., et al., *Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **122**(22): p. 3607-15.
71. Galanis, A., et al., *Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants*. Blood, 2014. **123**(1): p. 94-100.
72. Smith, C.C., et al., *Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(14): p. 5319-24.
73. Liu Yin, J.A., et al., *Comparison of 'sequential' versus 'standard' chemotherapy as re-induction treatment, with or without cyclosporine, in refractory/relapsed acute myeloid leukaemia (AML): results of the UK Medical Research Council AML-R trial*. Br J Haematol, 2001. **113**(3): p. 713-26.
74. Smith, C.C., et al., *Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 260-263.
75. Opatz, S., et al., *Exome sequencing identifies recurring FLT3 N676K mutations in core-binding factor leukemia*. Blood, 2013. **122**(10): p. 1761-9.
76. Smith, C.C., et al., *FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors*. Leukemia, 2015. **25**(10): p. 165.
77. Smith, C.C., et al., *Characterizing and Overriding the Structural Mechanism of the Quizartinib-Resistant FLT3 "Gatekeeper" F691L Mutation with PLX3397*. Cancer Discov, 2015. **5**(6): p. 668-79.
78. Zhang, W., et al., *Reversal of acquired drug resistance in FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells via distinct drug combination strategies*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(9): p. 2363-74.
79. Lee, H.K., et al., *G-749, a novel FLT3 kinase inhibitor, can overcome drug resistance for the treatment of acute myeloid leukemia*. Blood, 2014. **123**(14): p. 2209-19.

80. Ma, H.S., et al., *FLT3 Kinase Inhibitor TTT-3002 Overcomes Both Activating and Drug Resistance Mutations in FLT3 in Acute Myeloid Leukemia*. *Cancer Research*, 2014. **74**(18): p. 5206-5217.
81. Moore, A.S., et al., *Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD+ acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a model for emerging clinical resistance patterns*. *Leukemia*, 2012. **26**(7): p. 1462-70.
82. Liu, Y. and N.S. Gray, *Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations*. *Nat Chem Biol*, 2006. **2**(7): p. 358-64.
83. Wissner, A. and Mansour, T.S; *The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer*. *Arch Pharm*, 2008. **341**(8): p. 465-77.
84. Liu, Q., et al., *Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome*. *Chem Biol*, 2013. **20**(2): p. 146-59.
85. Smaill, J.B., et al., *Tyrosine kinase inhibitors. 18. 6-Substituted 4-anilinoquinazolines and 4-anilinopyrido[3,4-d]pyrimidines as soluble, irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor*. *J Med Chem*, 2001. **44**(3): p. 429-40.
86. Nordigarden, A., et al., *Irreversible pan-ERBB inhibitor canertinib elicits anti-leukaemic effects and induces the regression of FLT3-ITD transformed cells in mice*. *Br J Haematol*, 2011. **155**(2): p. 198-208.
87. Li, D., et al., *BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models*. *Oncogene*, 2008. **27**(34): p. 4702-4711.
88. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm360574.htm>.
89. Mahboobi, S., et al., *Bis(1H-2-indolyl)methanones as a Novel Class of Inhibitors of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor Kinase*. *J. Med. Chem.*, 2002. **45**(5): p. 1002-1018.
90. Mahboobi, S., et al., *Inhibition of FLT3 and PDGFR tyrosine kinase activity by bis(benzo[b]furan-2-yl)methanones*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007. **15**: p. 2187-2197.
91. Mahboobi, S., et al., *Novel Bis(1H-indol-2-yl)methanones as Potent Inhibitors of FLT3 and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase*. *J. Med. Chem.*, 2006. **49**: p. 3101-3115.
92. Siebert, C.D., *Das Bioisosterie-Konzept: Arzneistoffentwicklung*. *Chemie in unserer Zeit*, 2004. **38**(5): p. 320-324.
93. Levis, M., *Quizartinib for the treatment of FLT3/ITD acute myeloid leukemia*. *Future Oncol*, 2014. **10**(9): p. 1571-9.
94. Streifinger, B., *Neue Indolderivate: Synthese und biologische Testung*, in *Masterarbeit 2010: Universität Regensburg*.
95. Dumas, J., et al., *Preparation of substituted heterocyclic ureas as p38 kinase inhibitors*, 2012, Bayer HealthCare LLC, USA . p. 70 pp., Division of U.S. Ser. No. 458,014.
96. Lambert, J.B. and E. Mazzola, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications and Experimental Methods*. Vol. 2. 2004: Pearson Education,.
97. Pretsch, E., P. Bühlmann, and M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds*. Vol. 3. 2000: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
98. Pinho e Melo, T.M.V.D. and A.M.d.A. Rocha Gonsales, *Recent Research Developments in Heterocyclic Chemistry 2007: Research Signpost*.
99. Gilchrist, T.L., *Heterocyclic Chemistry*. Vol. 3. 1997: A Pearson Education Print on Demand Edition.
100. Green, L., B. Chauder, and V. Snieckus, *The directed ortho metalation — Cross-coupling symbiosis in heteroaromatic synthesis*. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1999. **36**(6): p. 1453-1468.
101. Pearson, S.E. and S. Nandan, *A practical, efficient synthesis of 5-amino-7-azaindole*. *Synthesis*, 2005(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 2503-2506.
102. Terent'ev, A.P., et al., *Introduction of substituents into the benzene ring of indole*. *Zhurnal Obshchei Khimii*, 1959. **26**: p. 2541-51.
103. Russell, H.F., et al., *5-SUBSTITUTED INDOLES via SODIUM INDOLINE-2-SULFONATE. A REEXAMINATION*. *Organic Preparations and Procedures International*, 1985. **17**(6): p. 391-399.
104. Li, J.J., *Name Reactions: A Collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications* 2006: Springer
105. Mahboobi, S., et al., *2-Aroylindoles and 2-Aroylbenzofurans with N-Hydroxyacrylamide Substructures as a Novel Series of Rationally Designed Histone Deacetylase Inhibitors†*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007. **50**(18): p. 4405-4418.

106. Jiang, J. and G.W. Gribble, *A direct lithiation route to 2-acyl-1-(phenylsulfonyl)indoles*. Synth. Commun., 2002. **32**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 2035-2040.
107. Wagle, D., et al., *Preparation of heterocyclthiazolium salts for reversing advanced glycosylation cross-links*, 2000, Alteon, Inc., USA . p. 33 pp.
108. Debray, J., et al., *Inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: Design, synthesis, kinetics, biomineralization and cellular tests*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013. **21**(24): p. 7981-7987.
109. Lapointe, D., et al., *Predictable and Site-Selective Functionalization of Poly(hetero)arene Compounds by Palladium Catalysis*. J. Org. Chem., 2011. **76**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 749-759.
110. Commons, T.J., et al., *Oxazolidinone derivatives as PR modulators and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of hormone-related cancer*, 2008, Wyeth, USA . p. 144 pp.
111. Bhagwat, S., et al., *Imidazolothiazole compounds for the treatment of disease*, 2007, US8557810 B2.
112. Hackler, R.E., et al., *The syntheses of 5-amino-3-t-butylisothiazole and 3-amino-5-t-butylisothiazole*. Journal of Heterocyclic Chemistry, 1989. **26**(6): p. 1575-1578.
113. Bhagwat, S., et al., *Method of using imidazolothiazole compounds for the treatment of disease*, 2010, US 8129374 B2.
114. Barf, T. and A. Kaptein, *Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks*. J Med Chem, 2012. **55**(14): p. 6243-62.
115. Arndt, J., et al., *Heterocyclic compounds useful as pdk1 inhibitors*, 2011, Google Patents.
116. Kobus, D., et al., *A fully automated two-step synthesis of an 18F-labelled tyrosine kinase inhibitor for EGFR kinase activity imaging in tumors*. Appl. Radiat. Isot., 2009. **67**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 1977-1984.
117. Drummond, D.C., et al., *CLINICAL DEVELOPMENT OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS AS ANTICANCER AGENTS*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2005. **45**(1): p. 495-528.
118. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8[thinsp]Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-260.
119. Wolffe, A.P. and J.J. Hayes, *Chromatin disruption and modification*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(3): p. 711-20.
120. Kamakaka, R.T. and S. Biggins, *Histone variants: deviants?* Genes & Development, 2005. **19**(3): p. 295-316.
121. Das, C., J.K. Tyler, and M.E.A. Churchill, *The histone shuffle: histone chaperones in an energetic dance*. Trends in Biochemical Sciences, 2010. **35**(9): p. 476-489.
122. Dasso, M., S. Dimitrov, and A.P. Wolffe, *Nuclear assembly is independent of linker histones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12477-81.
123. Peterson, C.L. and M.-A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Current Biology, 2004. **14**(14): p. R546-R551.
124. Boyle, G.M., A.C. Martyn, and P.G. Parsons, *Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma*. Pigment Cell Research, 2005. **18**(3): p. 160-166.
125. Morales, V. and H. Richard-Foy, *Role of Histone N-Terminal Tails and Their Acetylation in Nucleosome Dynamics*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(19): p. 7230-7237.
126. Biel, M., V. Wascholowski, and A. Giannis, *Epigenetics—An Epicenter of Gene Regulation: Histones and Histone-Modifying Enzymes*. Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(21): p. 3186-3216.
127. Kuo, M.-H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. BioEssays, 1998. **20**(8): p. 615-626.
128. Heinke, R. and W. Sippl, *Entwicklung von Histon-Desacetylaseinhibitoren. Potente Wirkstoffe vor allem bei Krebserkrankungen*. Pharmazie in unserer Zeit, 2010. **39**(3): p. 183-189.
129. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 769-784.
130. Johnstone, R.W., *Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(4): p. 287-299.
131. Spange, S., et al., *Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2009. **41**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 185-198.

132. Grozinger, C.M., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(9): p. 4868-4873.
133. Yang, X.-J. and S. Grégoire, *Class II Histone Deacetylases: from Sequence to Function, Regulation, and Clinical Implication*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(8): p. 2873-2884.
134. Marks, P.A., T. Miller, and V.M. Richon, *Histone deacetylases*. Current Opinion in Pharmacology, 2003. **3**(4): p. 344-351.
135. Villar-Garea, A. and M. Esteller, *Histone deacetylase inhibitors: Understanding a new wave of anticancer agents*. International Journal of Cancer, 2004. **112**(2): p. 171-178.
136. Johnstone, R.W. and J.D. Licht, *Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: Is transcription the primary target?* Cancer Cell, 2003. **4**(1): p. 13-18.
137. de Ruijter, A.J.M., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochemical Journal, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-749.
138. Dokmanovic, M. and P.A. Marks, *Prospects: histone deacetylase inhibitors*. J Cell Biochem, 2005. **96**(2): p. 293-304.
139. Mariadason, J.M., *HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer*. Epigenetics, 2008. **3**(1): p. 28-37.
140. Kim, I.A., et al., *Histone Deacetylase Inhibitor-Mediated Radiosensitization of Human Cancer Cells: Class Differences and the Potential Influence of p53*. Clinical Cancer Research, 2006. **12**(3): p. 940-949.
141. Haigis, M.C. and L.P. Guarente, *Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction*. Genes & Development, 2006. **20**(21): p. 2913-2921.
142. Gao, L., et al., *Cloning and Functional Characterization of HDAC11, a Novel Member of the Human Histone Deacetylase Family*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(28): p. 25748-25755
143. Gregoret, I., Y.-M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis* Journal of Molecular Biology, 2004. **338**(1): p. 17- 31.
144. Villagra, A., et al., *The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 92-100.
145. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nature reviews. Genetics, 2009. **10**(1): p. 32-42.
146. Huang, Y., et al., *Histone Deacetylase 5 Is Not a p53 Target Gene, But Its Overexpression Inhibits Tumor Cell Growth and Induces Apoptosis*. Cancer Research, 2002. **62**(10): p. 2913-2922.
147. Buchwald, M., O.H. Kraemer, and T. Heinzel, *HDACi - Targets beyond chromatin*. Cancer Lett. (Shannon, Irel.), 2009. **280**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 160-167.
148. Wagner, M., et al., *Histone deacetylases in replicative senescence: evidence for a senescence-specific form of HDAC-2*. FEBS Lett, 2001. **499**(1-2): p. 101-6.
149. Ropero, S. and M. Esteller, *The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer*. Molecular Oncology, 2007. **1**(1): p. 19-25.
150. Quintas-Cardama, A., F.P.S. Santos, and G. Garcia-Manero, *Histone deacetylase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2011. **25**(2): p. 226-235.
151. Pietschmann, K., et al., *Breakdown of the FLT3-ITD/STAT5 Axis and Synergistic Apoptosis Induction by the Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat and FLT3-Specific Inhibitors*. Molecular Cancer Therapeutics, 2012. **11**(11): p. 2373-2383.
152. Schneider, G., et al., *Targeting histone deacetylases in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2010. **14**(6a): p. 1255-1263.
153. Suzuki, T., *Explorative study on isoform-selective histone deacetylase inhibitors*. Chem Pharm Bull, 2009. **57**(9): p. 897-906.
154. Mann, B.S., et al., *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. Oncologist, 2007. **12**(10): p. 1247-52.
155. Nimmanapalli, R., et al., *Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3236-3239.
156. Krämer, O.H., *HDAC2: a critical factor in health and disease*. Trends Pharmacol. Sci., 2009. **30**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 647-655.

157. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. Nature, 1999. **401**(6749): p. 188-193.
158. Siebenand, S., *Histon-Deacetylase: Neuer Angriffspunkt in der Krebstherapie*. Pharmazeutische Zeitung, 2008. **17**.
159. Wang, D., et al., *LBH589 Enhances T Cell Activation In Vivo and Accelerates Graft-versus-Host Disease in Mice*. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2012. **18**(8): p. 1182-1190.e1.
160. <http://arznei-news.de/panobinostat/>.
161. Suzuki, T., et al., *Synthesis and Histone Deacetylase Inhibitory Activity of New Benzamide Derivatives*. Journal of Medicinal Chemistry 1999. **42**(15): p. 3001-3003.
162. Eyüpoglu, I.Y., et al., *Experimental therapy of malignant gliomas using the inhibitor of histone deacetylase MS-275*. Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(5): p. 1248-1255
163. Hess-Stumpp, H., et al., *MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases—The development of an anticancer agent*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(7–8): p. 1388-1405.
164. Kramer, O.H. and T. Heinzl, *Phosphorylation-acetylation switch in the regulation of STAT1 signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **315**(1-2): p. 40-8.
165. Bali, P., et al., *Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90: A NOVEL BASIS FOR ANTILEUKEMIA ACTIVITY OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(29): p. 26729-26734.
166. Schaefer, E.W., et al., *A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2009. **94**(10): p. 1375-1382.
167. West, A.C. and R.W. Johnstone, *New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment*. The Journal of Clinical Investigation. **124**(1): p. 30-39.
168. Masetti, R., et al., *The role of HDACs inhibitors in childhood and adolescence acute leukemias*. J Biomed Biotechnol, 2011. **148046**(10): p. 13.
169. Richon, V.M., J. Garcia-Vargas, and J.S. Hardwick, *Development of vorinostat: current applications and future perspectives for cancer therapy*. Cancer Lett, 2009. **280**(2): p. 201-10.
170. Fiedler, W., et al., *A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease*. Blood, 2005. **105**(3): p. 986-93.
171. Illmer, T. and G. Ehninger, *FLT3 kinase inhibitors in the management of acute myeloid leukemia*. Clin Lymphoma Myeloma, 2007. **8**(1): p. S24-34.
172. Fischer, T., et al., *Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3*. J Clin Oncol, 2010. **28**(28): p. 4339-45.
173. von Bubnoff, N., et al., *FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication tyrosine kinase inhibitors display a nonoverlapping profile of resistance mutations in vitro*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3032-41.
174. Weisberg, E., et al., *FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML*. Drug Resist Updat, 2009. **12**(3): p. 81-9.
175. Metzelder, S.K., et al., *[Sorafenib in relapsed and refractory FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia: a novel treatment option]*. Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**(38): p. 1852-6.
176. Ravandi, F., et al., *Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2010. **28**(11): p. 1856-62.
177. Zhu, X., Y. Ma, and D. Liu, *Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights*. J Hematol Oncol, 2010. **3**(17): p. 1756-8722.
178. Buchwald, M., et al., *Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation*. Leukemia, 2010. **24**(8): p. 1412-21.
179. Zhou, J., et al., *PRL-3, a metastasis associated tyrosine phosphatase, is involved in FLT3-ITD signaling and implicated in anti-AML therapy*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. 0019798.
180. Lai, C.-J., et al., *CUDC-101, a Multitargeted Inhibitor of Histone Deacetylase, Epidermal Growth Factor Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, Exerts Potent Anticancer Activity*. Cancer Res., 2010. **70**(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 3647-3656.
181. Wang, J., et al., *Potential Advantages of CUDC-101, a Multitargeted HDAC, EGFR, and HER2 Inhibitor, in Treating Drug Resistance and Preventing Cancer Cell Migration and Invasion*. American Association for Cancer Research, 2013. **12**(6): p. 925-936.

182. Morphy, R., *Selectively Nonselective Kinase Inhibition: Striking the Right Balance*. Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **53**(4): p. 1413-1437.
183. Warrener, R.N. and Cain E.N., *Synthese von 1-Hydroxy-2-thiouracil*. Angewandte Chemie, 1966. **78**(9): p. 491-492.
184. Bär, T., et al., *Novel bifunctional compounds which inhibit protein kinases and histone deacetylases*, 2009, WO2009 063054 A1..
185. Marom, E., M. Mizhiritskii, and S. Rubnov, *Preparation of benzofurans and use thereof as synthetic intermediates*, 2011, WO 2011 099010 A1..
186. Clayden, J. et al., *Organic Chemistry*, ed. O.U. Press 2007.
187. Bull, S.D. et al., *Asymmetric synthesis of homochiral differentially protected bis- β -amino acid scaffolds*. Tetrahedron, 2002. **58**(23): p. 4629-4642.
188. Beckers, T., et al., *Chimerically designed HDAC- and tyrosine kinase inhibitors. A series of erlotinib hybrids as dual-selective inhibitors of EGFR, HER2 and histone deacetylases*. MedChemComm, 2012. **3**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 829-835.
189. Drube, S., et al., *C-Kit controls IL-1 β -induced effector functions in HMC-cells*. European Journal of Pharmacology, 2012. **675**(1-3): p. 57-62.
190. Linnekin, D., *Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999. **31**(10): p. 1053-1074.
191. Choudhary, C., et al., *Signal transduction of oncogenic Flt3*. Int J Hematol, 2005. **82**(2): p. 93-9.
192. Kosan, C., et al., *STAT5 acetylation: Mechanisms and consequences for immunological control and leukemogenesis*. Jakstat, 2013. **2**(4): p. 19.
193. Yuan, T.L. and L.C. Cantley, *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5497-510.
194. Medard, G., et al., *Optimized chemical proteomics assay for kinase inhibitor profiling*. J Proteome Res, 2015. **14**(3): p. 1574-86.
195. Honma, Y., et al., *Axonal projections of mechanoreceptive dorsal root ganglion neurons depend on Ret*. Development, 2010. **137**(14): p. 2319-2328.
196. Yang, J.-J., *A novel zinc finger protein, ZZaPK, interacts with ZAK and stimulates the ZAK-expressing cells re-entering the cell cycle*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **301**(1): p. 71-77.
197. Megarity, C.F., et al., *The two common polymorphic forms of human NRH-quinone oxidoreductase 2 (NQO2) have different biochemical properties*. FEBS Letters, 2014. **588**(9): p. 1666-1672.
198. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5127>.
199. Mosher, G.L. and D.O. Thompson, *Formulations containing propofol and a sulfoalkyl ether cyclodextrin*, 2002, WO/2002/074200.
200. Klüter, S., et al., *Characterization of Irreversible Kinase Inhibitors by Directly Detecting Covalent Bond Formation: A Tool for Dissecting Kinase Drug Resistance*. ChemBioChem, 2010. **11**(18): p. 2557-2566.
201. 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.
202. George, P., et al., *Cotreatment with 17-allylamino-demethoxygeldanamycin and FLT-3 kinase inhibitor PKC412 is highly effective against human acute myelogenous leukemia cells with mutant FLT-3*. Cancer Res, 2004. **64**(10): p. 3645-52.
203. Ikan, R., et al., *Synthesis of 5- and 6-haloindoles from indoline*. Isr. J. Chem., 1964. **2**(Copyright (C) 2016 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 37-42.
204. Jin, N., et al., *Rhodium-Catalyzed Direct C7 Alkynylation of Indolines*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2015. **357**(6): p. 1149-1153.
205. Frissen, A.E., A.T.M. Marcelis, and H.C. van der Plas, *Novel intramolecular Diels-Alder reactions of pyrimidines. Synthesis of heterocyclic annelated pyridines*. Tetrahedron Letters, 1987. **28**(14): p. 1589-1592.
206. Trost, B.M. and A. McClory, *Rhodium-catalyzed cycloisomerization: formation of indoles, benzofurans, and enol lactones*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(12): p. 2074-7.
207. Barawkar, D., et al., *Preparation of substituted fused tricyclic compounds as JAK kinase inhibitors, compositions and medicinal applications thereof*, 2012, Advinus Therapeutics Limited, India . p. 268pp.; Chemical Indexing Equivalent to 161:419519 (IN).
208. Wagner, E., et al., *Mepyramine–JNJ7777120-hybrid compounds show high affinity to hH1R, but low affinity to hH4R*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011. **21**(21): p. 6274-6280.

209. Che, Z., et al., *Synthesis and Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of Novel N-Arylsulfonyl-3-acylindole Arylcarbonyl Hydrazone Derivatives as Nematicidal Agents*. J. Agric. Food Chem., 2013. **61**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 5696-5705.
210. Berthel, S.J., et al., *Azaindole derivatives as glucokinase activators and their preparation and use in the treatment of metabolic disorders*, 2011, Hoffmann-La Roche Inc., USA . p. 108 pp.
211. Maya, A.B.S., et al., *Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety*. Journal of Medicinal Chemistry, 2005. **48**(2): p. 556-568.
212. Vanotti, E., et al., *Pyrrolopyridines as kinase inhibitors and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of diseases linked to dysregulated cell proliferation or dysregulated protein kinase*, 2007, Pfizer Italia Srl, Italy . p. 118pp.
213. Wu, G., et al., *Preparation of phenylpyrrolopyridinylheteroarylcarboxamide derivatives and analogs for use as c-kit protein kinases or mutant c-kit protein kinases modulators*, 2014, Plexxikon Inc., USA . p. 226pp.
214. Lougiakis, N., et al., *Synthesis and antiviral activity evaluation of some novel acyclic C-nucleosides*. Chem Pharm Bull, 2008. **56**(6): p. 775-80.
215. Filla, S.A., et al., *Novel Potent 5-HT_{1F} Receptor Agonists: Structure-Activity Studies of a Series of Substituted N-[3-(1-Methyl-4-piperidinyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-5-yl]amides*. Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **46**(14): p. 3060-3071.
216. Andaloussi, M., et al., *A convenient synthesis of linear pyridinoimidazo[1,2-a]pyridine and pyrroloimidazo[1,2-a]pyridine cores*. Tetrahedron Letters, 2007. **48**(47): p. 8392-8395.
217. Schmeck, C., et al., *Benzofuran-Derivate*, 2002, Google Patents.
218. Whalley, W.B., *Organic fluoro compounds. VII. Some 2-(trihaloacylor-alkyl)coumarones*. J. Chem. Soc., 1953(Copyright (C) 2016 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 3479-83.
219. Beckers, T., et al., *Preparation of 2-acylindoles as tubulin polymerization inhibitors for the treatment of metastatic tumors*, 2003, Baxter Healthcare SA, Switz. . p. 110 pp.
220. Smart, B.P., et al., *The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A₂: elucidation of sites for enhanced binding*. J Med Chem, 2006. **49**(10): p. 2858-60.
221. Komoto, I. and S. Kobayashi, *Lewis acid catalysis in supercritical carbon dioxide. Use of poly(ethylene glycol) derivatives and perfluoroalkylbenzenes as surfactant molecules which enable efficient catalysis in ScCO₂*. J Org Chem, 2004. **69**(3): p. 680-8.
222. Adachi, J. and M. Ishida, *2,3-diphenyl-5-(pyrrolyl)furan antiinflammatory, antiallergic and plate-aggregation inhibiting agents*, 1994, Nihon Iyakuin Kogyo Co., Ltd., Japan . p. 26 pp.
223. Shoji, K., et al., *Synthesis of Bromoacetyl Derivatives by Use of Tetrabutylammonium Tribromide*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1987. **60**(3): p. 1159-1160.
224. Roman, G., et al., *Heme oxygenase inhibition by 1-aryl-2-(1h-imidazol-1-yl/1h-1,2,4-triazol-1-yl)ethanones and their derivatives*. ChemMedChem, 2010. **5**(9): p. 1541-55.
225. Hong, B.T., et al., *Oseltamivir hydroxamate and acyl sulfonamide derivatives as influenza neuraminidase inhibitors*. Bioorg Med Chem, 2014. **22**(23): p. 6647-54.
226. Yu, W., X.-H. Xu, and F.-L. Qing, *Visible light-induced monofluoromethylenation of heteroarenes with ethyl bromofluoroacetate*. New Journal of Chemistry, 2016. **40**(8): p. 6564-6567.
227. Spicer, J.A., et al., *Exploration of a series of 5-arylidene-2-thioxoimidazolidin-4-ones as inhibitors of the cytolytic protein perforin*. J Med Chem, 2013. **56**(23): p. 9542-55.
228. Ketcha, D.M., *The manganese(III) acetate oxidation of N-protected indolines*. Tetrahedron Letters, 1988. **29**(18): p. 2151-2154.
229. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Regensburg, im September 2019

Bernadette PilsI