

**Entwicklung und Synthese von
Protein-Tyrosin-Phosphatase-
Inhibitoren sowie Synthese und
Validierung von SHP-2-Inhibitoren
in vitro und *in vivo***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefanie Grosskopf
aus Berlin, Deutschland

Oktober 2010

Die Arbeit wurde in der Zeit von März 2006 bis August 2010 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Rademann angefertigt.



1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann
2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

Disputationstermin: 14.01.2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel verwendet wurden.

Stefanie Grosskopf 1. Oktober 2010

Für meine Eltern

HOLZHACKEN IST DESHALB SO BELIEBT, WEIL MAN BEI DIESER TÄTIGKEIT
DEN ERFOLG SOFORT SIEHT.

Albert Einstein

Teile dieser Arbeit sind patentrechtlich geschützt [**WO06128909**].

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
DANKSAGUNG	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABSTRACT	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1 Einleitung	1
2 Allgemeiner Teil	2
2.1 Enzyme	2
2.1.1 <i>Enzymhemmung</i>	4
2.2 Protein-Tyrosin-Phosphatasen	4
2.2.1 <i>Der Katalysemechanismus der PTPs</i>	7
2.3 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2.....	8
2.3.1 <i>Die Rolle von SHP-2 im Met-und Ras/MAPK-Signalweg</i>	11
2.3.2 <i>SHP-2 und Krankheiten</i>	14
2.3.2.1 SHP-2-Mutationen im Noonan-Syndrom.....	14
2.3.2.2 SHP-2-Mutationen im LEOPARD Syndrom.....	15
2.3.2.3 SHP-2-Mutationen bei verschiedenen Krebsarten.....	15
2.3.3 <i>Das Anwendungspotential von SHP-2 Inhibitoren</i>	16
2.4 Weitere therapeutisch relevante Protein-Tyrosin-Phosphatasen	18
2.4.1 <i>Die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1</i>	18
2.4.2 <i>Die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP1B</i>	20
2.4.3 <i>Die Protein-Tyrosin-Phosphatase MptpA</i>	21
2.5 Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren.....	23
2.5.1 <i>Bisher bekannte SHP-2 Inhibitoren</i>	24
2.5.2 <i>Unspezifische, anorganische PTP-Inhibitoren</i>	30
2.5.3 <i>Naturstoff-basierte PTP-Inhibitoren</i>	31
2.5.4 <i>pTyr-Mimetika zur Entwicklung von niedermolekularen PTP-Inhibitoren</i> 31	
2.5.5 <i>Peptidische PTP-Inhibitoren</i>	34
2.5.6 <i>Inhibitoren als Zweizentrenbinder am Beispiel von PTP1B</i>	34
2.5.7 <i>Alternative Methoden für die Inhibition von PTPs</i>	34
2.5.8 <i>Entwicklung von PTK-Inhibitoren im Vergleich</i>	35
2.6 Methoden zur Wirkstoffentwicklung.....	36

3	Zielstellungen der Arbeit	42
4	Entwicklung und Untersuchung für Inhibitoren der Proten-Tyrosin-Phosphatase SHP-2	44
4.1	Entwicklung eines Homologiemodells für SHP-2 und anschließende Identifizierung einer Leitstruktur	44
4.2	Synthese und Syntheseoptimierung von SHP-2-Inhibitoren.....	48
4.2.1	<i>Darstellung der Ketophosphoranylide 3</i>	49
4.2.2	<i>Darstellung der 2,3-Diketoester 4</i>	50
4.2.3	<i>Darstellung der 3-Aryl-4-Hydrazonopyrazol-5-onen 1 via der 2-Hydrazonderivate</i>	51
4.3	Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung von SHP-2-Inhibitoren	53
4.3.1	<i>Derivate mit Modifikation des R¹-Restes</i>	57
4.3.2	<i>Derivate mit Modifikation des R²-Restes</i>	58
4.3.3	<i>Derivate mit Modifikation des R³-Restes</i>	59
4.4	Selektivität der SHP-2-Inhibitoren gegenüber anderen Protein-Tyrosin-Phosphatasen	65
4.5	Untersuchung der SHP-2-Inhibitoren mit Hilfe von Dockingexperimenten ..	67
4.6	Untersuchung der biologischen Wirksamkeit der SHP-2-Inhibitoren mittels in vitro und in vivo Experimenten.....	70
4.6.1	<i>Experimente zur HGF/SF-stimulierten Zelldissoziation</i>	71
4.6.2	<i>Wirkung der SHP-2-Inhibitoren auf die Proliferation von verschiedenen humanen Tumorzelllinien</i>	78
4.6.3	<i>Identifizierung einer SHP-2-abhängigen humanen Tumorzelllinie mit Hilfe von siRNA-Experimenten</i>	79
4.6.4	<i>Verträglichkeitsstudie von SHP-2-Inhibitoren in der Nacktmaus</i>	81
4.6.5	<i>Antitumorale Wirkung der Verbindung 39 im Tierexperiment</i>	83
4.7	Zusammenfassung und Potential der entwickelten SHP-2-Inhibitoren	84
5	Entwicklung und Validierung von PTP-Inhibitoren	87
5.1	Bekannte pTyr-Mimetika als Strukturvorlage.....	87
5.2	Synthese und Validierung der Fragmentbibliothek.....	92
5.2.1	<i>Synthese und Validierung von zyklische Fragmenten</i>	93
5.2.2	<i>Fragmente mit einer Trifluormethylsulfonyl- oder Trifluormethylsulfonamido-Gruppe</i>	96
5.2.3	<i>Bewertung der Verwendung als pTyr-Mimetikum</i>	101

5.3	Synthese und Untersuchung des Aldehydes	102
5.3.1	<i>Aldehydsynthese</i>	102
5.3.2	<i>pK_S-Wert-Bestimmung des Aldehyds</i>	103
5.3.3	<i>Im Caco-2-Assay</i>	104
5.3.4	<i>Anwendung des Aldehydes</i>	106
5.4	Untersuchung der Aminbibliothek gegen MptpA, SHP-2 und SHP-1	107
5.5	Synthese einer Verbindungsbibliothek mit einem pTyr-Mimetikum	110
5.5.1	<i>Roboterunterstützte Synthese der Substanzbibliothek</i>	111
5.5.2	<i>Enzymassay und Hitidentifizierung</i>	112
5.5.3	<i>Einbau des Triflats in Peptidsequenzen</i>	116
5.6	Zusammenfassung	118
6	Experimenteller Teil	121
6.1	Materialien und Methoden.....	121
6.1.1	<i>Chemikalien und Lösungsmittel</i>	121
6.1.2	<i>Analytische Methoden und Geräte</i>	121
6.2	Synthesen	124
6.2.1	<i>Synthese der SHP-2-Inhibitoren</i>	124
6.2.2	<i>Fragmentsynthese</i>	141
6.2.3	<i>Synthese des Aldehyds 103</i>	147
6.2.4	<i>Roboterunterstützte Synthese einer Verbindungsbibliothek</i>	149
6.2.5	<i>Triflatsynthese</i>	149
6.2.6	<i>Synthese des Bausteins für die die Festphasensynthese</i>	152
6.2.7	<i>Festphasensynthese</i>	153
6.3	Biologische Methoden	154
6.3.1	<i>Verwendete Protein-Tyrosin-Phosphatasen beim Phosphatase-Assay</i>	154
6.3.2	<i>Bestimmung der IC₅₀-Werte mittels Phosphatase-Assay</i>	155
6.3.3	<i>Zell-Experimente</i>	157
	Literaturverzeichnis	163

DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. Jörg Rademann für die Bereitstellung dieser interessanten Projekte und deren Betreuung.

Prof. Dr. Walter Birchmeier danke ich für seine hilfreiche Diskussionsbereitschaft und sein Vertrauen in mich als Kooperationspartnerin.

Prof. Dr. Udo Heinemann danke ich für die Übernahme des Zweigutachtens.

Mein besonderer Dank geht an Chris Eckert, der durch seine Mitarbeit das SHP-2-Projekt vorangetrieben und geprägt hat. Dabei ist seine biologische Unterstützung besonders hilfreich für mich gewesen und ich konnte durch seine fortwährende Bereitschaft zum Erklären viel lernen. An dieser Stelle möchte ich mich für sein Vertrauen und die gute Zusammenarbeit beim SHP-2-Projekt bedanken.

Meinem vorherigen Kooperationspartner Dr. Klaus Hellmuth danke ich für die frühere Zusammenarbeit beim SHP-2-Projekt.

Dr. Jens von Kries danke ich für seine persönliche und von Seiten der Screening Unit mir entgegengebrachte Unterstützung.

Bei meiner Arbeitsgruppe, inklusive aller Ehemaligen, möchte ich mich für die lehrreiche Zeit, für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Dabei geht mein besonderer Dank an Sina Meyer, Katharina Koschek und Franziska Gottschalk, die mir durch ihre Freundschaft im und außerhalb des Laboralltages, in guten wie in schwierigen Zeiten, beiseite standen.

Richard Raz möchte ich für seine motivierenden Sprüche und seine Diskussionsbereitschaft und die variierenden Musikauswahl im Labor danken.

Dr. Liudmila Perepelittchenko möchte ich für die vielen tröstenden und helfenden Worte und Ratschläge, die Süßigkeiten, die Synthesehilfe und ihr gutes Herz danken

André Horatscheck, Johannes Preidl, Gesa Schäfer, Dr. Adeb El-Dahshan, Dr. Vera Martos Riaño, Dr. Kai Holland-Nell, Dr. Isabel Fernández Bachiller danke ich für ihre Unterstützung während meiner Arbeit.

Richard Raz und Sina Meyer danke ich für die Turbo-Einführung in die Festphasensynthese, Stefan Wagner für die Bereitstellung der Peptidsequenz,

Keven Mallow für seine Hilfe bei Synthesen, Dr. Boo Geun Kim für die Zusammenarbeit bei der Robotersynthese.

Für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Assayentwicklung möchte ich mich besonders bei Carola Seyffarth und Andreas Oder bedanken; desweiteren möchte ich Dr. Simone Gräber, Dr. Martin Neuenschwander, Dr. Silke Radetzki, sowie Dr. Edgar Specker und Katy Franke danken.

Für das Molecular Modelling und die interessanten Diskussionen möchte ich mich bei Dr. Michael Lisurek (AG Kühne) bedanken.

Bei Dr. Yvette Roske und Dr. Kerstin Böhm (AG Heinemann) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des SHP-2-Projekt bedanken.

Bei Marianne Dreißigacker und Irmgard Wiznerowicz möchte ich mich für ihre administrative Arbeit und für die lieben Worte bedanken.

Bei der Hilfe für die Entstehung dieser Arbeit mittels zahlreicher Diskussionen und Korrekturen trotz Stress' und Urlaubs möchte ich mich besonders bei Katharina Koschek, Dr. Vera Martos Riaño, Sina Meyer, Chris Eckert, Julian Heuberger, André Horatscheck, Johannes Preidl, Dr. Alexandra Grosskopf und Nils Leidel bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Familie und Freunde, die immer wieder interessiert waren an meiner Arbeit in der Forschung. Für das entgegengebrachte Verständnis und für die Motivation dieser lieben Menschen in meinem Umfeld möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Für die nie endende Unterstützung und Liebe danke ich Nils Leidel, der immer für mich da war und mir bei meinen Computerproblemen stets zur Seite stand.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meiner großen Schwester Alexandra, sowie unseren Katzen, die mich während meines Studiums und besonders bei dieser Arbeit immer unterstützt haben, meine Entscheidungen mitgetragen haben, mir Kraft, Liebe und Geborgenheit gegeben haben und immer für mich da waren!

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund fehlerhafter Mechanismen von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) können humane Krankheiten wie Krebs, Diabetes, kardiovaskuläre und neurobiologische Krankheiten entstehen. Kleine Moleküle können in diesem Zusammenhang als Therapeutika verwendet werden. PTPs sind anspruchsvolle Zielstrukturen, insbesondere die Spezifität von Inhibitoren gegenüber anderen PTPs und ihre häufig fehlende Zellpermeabilität stellen bei der Entwicklung eine Herausforderungen dar.

Ausgehend von einem virtuellen Screening mit einem Homologiemodell von SHP-2 wurde die Leitstruktur PHS1 **1** als SHP-2-Inhibitor identifiziert. Es wurde eine Bibliothek von Derivaten synthetisiert, die durch *in vitro* und *in vivo* Experimente auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht wurde. Die SHP-2-Inhibitoren **39**, **49** und **50** waren im Enzymassay im nanomolaren Bereich aktiv und selektiv gegenüber SHP-1, PTP1B und MptpA. Sie hemmten zusätzlich die HGF/SF-stimulierte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) von caninen MDCK-C Zellen und von humanen Pankreastumorzellen im niedrigen mikromolaren bzw. nanomolaren Bereich. Die Verbindung **50** zeigte im Softagar-Assay eine signifikante Hemmung der Koloniebildung von zwei verschiedenen humanen Lungentumorzelllinien von bis zu 40 %. Darüber hinaus weisen Tierversuche mit humanen Tumorxenografts daraufhin, dass eine antitumorale Wirkung des Inhibitors **39** *in vivo* besteht. Insbesondere Verbindung **39** besitzt, durch gute Verträglichkeit im Tierversuch und sehr gute inhibitorische sowie selektive Wirksamkeit, ein hohes Potenzial für die Weiterentwicklung als Krebstherapeutikum.

Weiterhin wurde die Entwicklung von PTP-Inhibitoren unter Verwendung von pTyr-Mimetika verfolgt. Der fehlende adäquate Ersatz von pTyr in Leitstrukturen bei der Inhibitorentwicklung stellt immer noch einen limitierenden Faktor dar. Die entwickelten pTyr-Mimetika sollten deswegen ungeladene Strukturen sein, die trotzdem eine starke Wechselwirkung mit der positiv geladenen Aktivtasche der Phosphatasen besitzen.

Eine synthetisierte Bibliothek von Fragmenten wurde auf potenzielle pTyr-Mimetika untersucht und anschließend in ein geeignetes Fragment, ein Aldehyd, umgewandelt. Dieses Aldehyd bietet einen einfachen synthetischen Zugang zu neuen potenziellen PTP-Inhibitoren. Dafür wurde eine Aminbibliothek auf ihre Hemmung gegen drei verschiedene PTPs hin untersucht. Zusätzlich wurde die Aminbibliothek durch roboterunterstützte Synthese mit Trifluormethylsulfonamidgruppen versehen und darüber hinaus ein Analogon dieser Gruppe in eine Peptidsequenz eingebaut und validiert.

Untersuchungen der synthetisierten Bibliothek von potentiellen pTyr-Mimetika gegenüber MptpA identifizierten Strukturen mit moderater inhibitorischer Hemmung. Die Verbindung **84** wurde folgend in ein Aldehyd umgewandelt und analysiert. Der pK_s-Wert der Verbindung **103** von 7,2 und der Wert im Caco-2-Assay von $P_{app} = 24,5 (10^{-6} \text{ cm/s})$ bestätigen, dass dieses Fragment ein geeigneter Kandidat für die Entwicklung von pTyr-Mimetika ist. Durch das Screenen der Aminbibliothek gegenüber MptpA, SHP-2 und SHP-1 wurden 13 Amine mit einem IC₅₀-Werte von 4-19 μM gefunden. Durch roboterunterstützte Synthese der Trifluormethylsulfonamidverbindungen und deren Validierung, konnten drei Verbindungen, **117_isoliert** mit einem IC₅₀-Wert von 86 μM , **118_isoliert** und **122_isoliert** mit IC₅₀-Werten im Bereich von 500 μM identifiziert werden. Das Trifluormethylsulfonamid-Analogon zeigte in einer Peptidsequenz **136** einen IC₅₀-Wert von 1 mM, der Aminosäurebaustein **134** liegt vergleichsweise bei 40 μM . Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sowohl neue, geeignete Verbindungen zur pTyr-Mimetika-Entwicklung als auch Verbindungen für die PTP-Inhibitorentwicklung identifiziert werden konnten.

ABSTRACT

Aberrant mechanisms of Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs) are implicated in a growing number of diseases, ranging from cancer to cardiovascular, immunological, infectious, neurological, and metabolic diseases. Small molecules as PTP inhibitors may provide a solution to this problem as therapeutic agents. PTPs are challenging targets, particularly the specificity of inhibitors against related PTPs and the lack of cell permeability are major challenges.

Starting from a virtual screening with a homology model of SHP-2, the lead structure PHPS1 **1** was identified as a SHP-2 inhibitor. A library of derivatives was synthesized and evaluated by SAR and *in vitro* and *in vivo* experiments for their inhibitory activity. The SHP-2 inhibitors **39**, **49** and **50** were most active in the enzyme assay with a nanomolar affinity range and were selective against SHP-1, PTP1B and MptpA. They also inhibit the HGF-stimulated EMT of canine MDCK-C cells as well as human pancreatic tumor cells in the low micromolar and nanomolar range. The compound **50** showed inhibition of the soft agar assay of colony formation of two different human lung tumor cell lines of up to 40 %. Furthermore, *in vivo* testing with human tumor xenografts showed an anti-tumor effect for the inhibitor **39**. This compound in particular, showed well-tolerated behavior in animal studies and very good and selective inhibitory activity. It is therefore considered as a high potential inhibitor for further development as a cancer treatment agent.

Furthermore, the development of PTP inhibitors using pTyr mimetics was investigated. The lack of replacement of pTyr in lead structures in the inhibitor development is still a limiting factor. New developed pTyr mimetics should therefore be uncharged structures that still strongly interact with the positively charged active site of phosphatases.

A synthesized library of fragments was examined for their potential pTyr mimetic function. The best hit was converted to a suitable aldehyde fragment, which allows easy synthetic access, leading to a potential new inhibitor of PTP. Investigations of the synthesized library of potential pTyr mimetics with MptpA

identified structures showed moderate inhibition. Compound **84** was converted into an aldehyde analogue and was evaluated. The pKa of the compound **103** is 7.2 and the value in Caco-2 assay of $P_{app} = 24.5$ (10^{-6} cm/s) confirming this fragment as a suitable candidate for the development of pTyr mimetics. Moreover, a library of amines was examined for their inhibition against three different PTPs. Screening of the amine library against MptpA, SHP-2 and SHP-1 yielded 13 amines with IC_{50} values of 4-19 μ M.

In addition, a robot-supported-synthetic trifluoromethylsulfonamide library was evaluated. The library screen yielded compound **117_isolated** with an IC_{50} value of 86 μ M, and **118_isolated** and **122_isolated** with IC_{50} values in the range of 500 μ M.

The trifluoromethylsulfonamide group was synthesized as an amino acid analogue. This amino acid building block was incorporated into a peptide that was also evaluated for its inhibitory activity. The analogue of the trifluoromethylsulfonamide in a peptide sequence **136** showed an IC_{50} value of 1 mM, whereas the amino acid building block **134** yielded 40 μ M.

In summary, it was shown that new and suitable compounds were identified as pTyr mimetics as well as for the development of PTP inhibitors.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström, 10^{-10} m
Abb.	Abbildung
abs.	Wasserfrei
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
arom.	Aromatisch
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovines Serumalbumin
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dest.	Destilliert
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridine
DMDO	Dimethyldioxiran
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (standard. Nährmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
E	Enzym
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
EA	Ethylacetat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
eq	Äquivalente

ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI/MS	Electrospray ionisation/ massspectrometry
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Einheit für die Masse in Gramm
HPAF II	Humane Pankreastumorzelllinie
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCl	Salzsäure
HGF/SF	Hepatozyten-Wachstums-Faktor/Scatter-Faktor
H ₂ O	Wasser
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-performance-liquid-chromatographie
Hz	Hertz
I	Inhibitor
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante (NMR)
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
<i>k_x</i>	Geschwindigkeitskonstante
<i>K_I</i>	Michaelis-Konstante
Λ	Wellenlänge
LC/MS	Liquid Chromatography/ Massspectrometry
M	Molarität
MDCK-C	Madin Darby Canine Kidney, Nierenepithelzellen
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
μ M	Mikromolar (Einheit)
ml	Einheit für das Volumen in Milliliter
mol	Einheit für die molare Masse
MptpA	Protein-Tyrosin-Phosphatase MptpA
m/z	Masse/Ladung-Verhältnis
N	Normalität

N ₂	Stickstoff (Schutzgas)
NaCO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NS	Noonan-Syndrom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
ppm	Parts per million
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
R	Rest
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
S	Substrat
SDS Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHP-2	Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2
SHP-1	Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1
SiO ₂	Siliciumdioxid (Kieselgel)
SPPS	Solid phase peptide synthesis
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett

Die Nomenklatur der gezeigten Verbindungen richtet sich nach den IUPAC-Regeln.

Bei der Bezeichnung von Aminosäuren wird der Einbuchstabencode verwendet.

1 EINLEITUNG

Die Medizinische Chemie ist ein modernes und interdisziplinäres Forschungsgebiet, das die Entwicklung und Synthese von potentiellen Wirkstoffen, die Analyse von chemischen und biochemischen Eigenschaften dieser Stoffe und ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehungen beinhaltet. Durch diese Verknüpfung der Organischen Chemie mit der Biochemie und mit Unterstützung der Computerchemie hat sich ein neuer und leistungsstarker Forschungszweig gebildet. Mit Hilfe der Medizinischen Chemie ist es möglich neue Therapieansätze für Krankheiten zu entwickeln, bekannte Behandlungen zu optimieren und Resistenzen zu überwinden.

Im besonderen Fokus stehen hierbei kleine Moleküle, d.h. Verbindungen mit einem Molgewicht von < 800 g/mol. Wirkstoffe in diesem Größenbereich sind tendenziell dazu in der Lage Barrieren im Körper aufgrund ihrer geringen Größe leichter zu überwinden, um z.B. an ihren Wirkungsort zu gelangen. Weiterhin können kleine Moleküle dazu verwendet werden, um Wirkmechanismen zu identifizieren und zu untersuchen.

Anhand dieser Arbeit lässt sich die interdisziplinäre Zusammenarbeit der verschiedenen Forschungsgebiete, die die Medizinische Chemie vereint, sehr gut erkennen. Die Entwicklung des Homologiemodells mit Hilfe von strukturellen Informationen über die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 durch die Strukturbiologie und die Computerchemie bilden die Grundlage dieses Projektes. Die anschließende Synthese der Substanzbibliothek, basierend auf der identifizierten Leitstruktur, durch die Organische Chemie und die nachfolgende Evaluierung in biochemischen und biologischen Systemen *in vitro* bis hin zum *in vivo* Experiment in der Maus, zeigen die erfolgreiche Zusammenarbeit dieser vielen Teilgebiete.

2 ALLGEMEINER TEIL

2.1 Enzyme

Enzyme sind Biokatalysatoren, d.h. sie beschleunigen oder ermöglichen biochemische Vorgänge, indem sie die Aktivierungsenergie dieser Reaktionen senken. Im Regelfall muss bei einer Reaktion eine bestimmte Energie, die sogenannte freie Aktivierungsenergie aufgebracht werden. Das Enzym stabilisiert den Übergangszustand eines Substrates und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, dass die Reaktion abläuft.

Zur Charakterisierung enzymatischer Aktivität bietet sich die Messung der Geschwindigkeit der Reaktion an. Oft lässt sich durch kinetische Untersuchungen der Reaktionsmechanismus herleiten. Die dadurch gewonnenen Daten und zusätzliche Informationen wie die Enzymstruktur (z.B. durch Kristallstrukturanalyse) und der Katalysemechanismus führen zu wichtigen Hinweisen über die biologische Funktion des Enzyms.

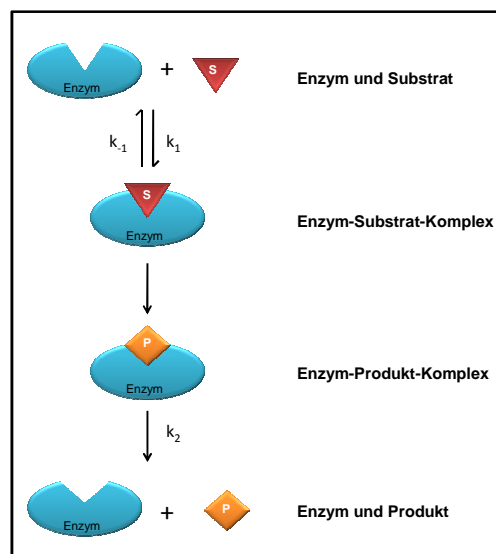


Abb. 1: Schematischer Ablauf einer Enzymreaktion

In Abbildung 1 wird der schematische Ablauf einer Enzymreaktion dargestellt, dabei stehen E, S, ES und P für Enzym, Substrat, Enzym-Substrat-Komplex und Produkte. Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} charakterisieren die Hin- und Rückreaktion der Bildung des ES-Komplexes. Der Zerfall des Enzym-

Substrat-Komplexes in die Produkte wird durch k_2 beschrieben und als irreversible Reaktion angenommen.

Die Michaelis-Menten-Gleichung (Formel 1, Abb. 2) ist die Grundgleichung der Enzymkinetik. Sie gibt die Beziehung zwischen Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion und Substratkonzentration im Fließgleichgewicht an. Die Auftragung v gegen $[S]$ nach der Michaelis-Menten-Gleichung gibt eine hyperbole Sättigungskurve (Abb. 2, rechts).

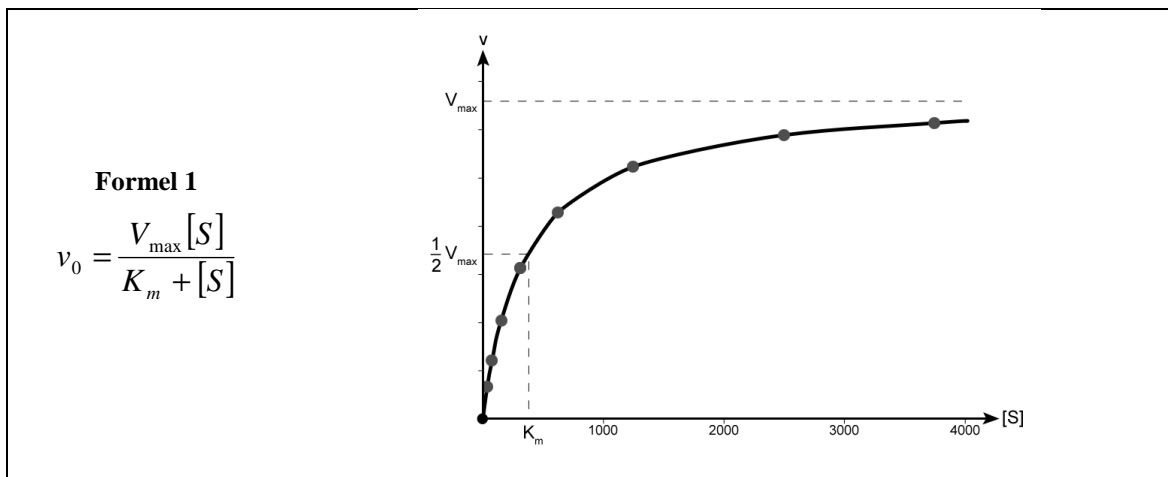


Abb. 2: Michaelis-Menten-Gleichung mit Darstellung einer Substratsättigungskurve

Zur Bestimmung der Werte V_{\max} und K_m verwendete man früher die Lineweaver-Burk-Auftragung. Die Lineweaver-Burk-Auftragung stellt die doppelt-reziproke Form der Michaelis-Menten-Gleichung dar. Man trägt dafür $1/v_0$ gegen $1/[S]$ auf. Hierbei ist V_{\max} der reziproke y-Achsenabschnitt und K_m der negativ reziproke Wert des x-Achsenabschnitts (Abb. 3).

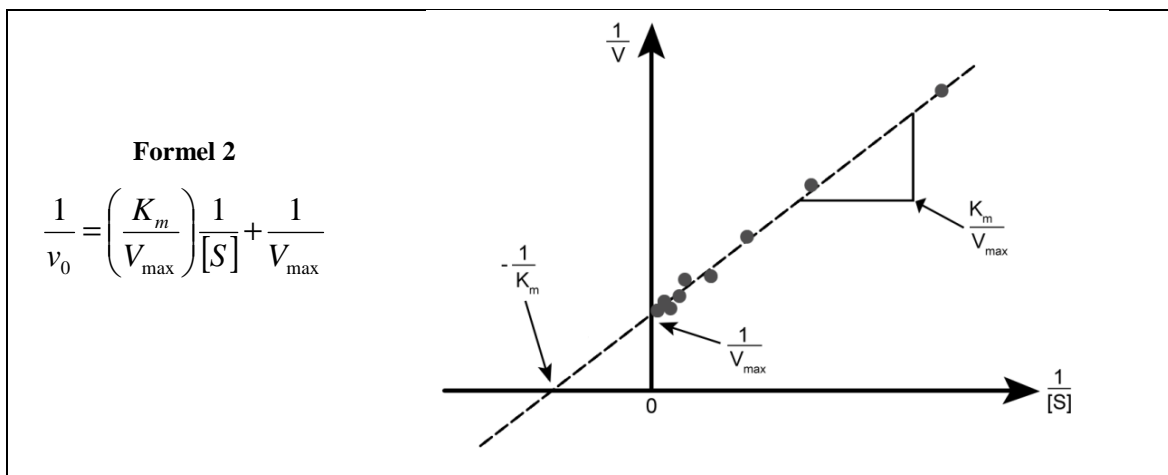


Abb. 3: Formel und Darstellung einer Lineweaver-Burk-Auftragung

2.1.1 Enzymhemmung

Als Enzymhemmung (auch Inhibition) bezeichnet man die Herabsetzung der katalytischen Aktivität eines Enzyms durch einen bestimmten Hemmstoff, den Inhibitor. Die verschiedenen Arten der Enzymhemmung werden nach ihrem Wirkmechanismus unterschieden und in die zwei großen Gruppen der irreversiblen und der reversiblen Inhibition unterteilt.

Die irreversible Hemmung eines Enzyms ist in der Regel die Folge einer kovalent-reversiblen Verknüpfung des Inhibitors mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Ein Beispiel dafür ist das Insektizid Parathion, dessen Metabolit Paraoxon ein Acetylcholinesterase-Hemmer und somit stark toxisch ist. Die reversible Hemmung wird in weitere Untergruppen geteilt, der kompetitiven Hemmung, der nicht-kompetitiven Hemmung und der unkompetitiven Hemmung (Abb. 4).

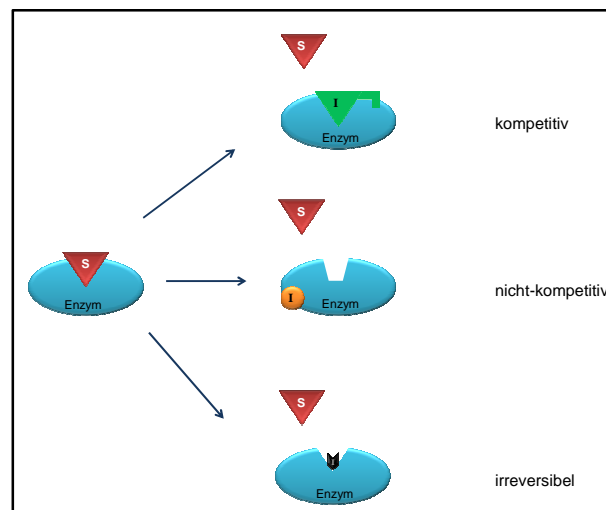


Abb. 4: Schematische Darstellung der drei verschiedenen Inhibitionstypen

2.2 Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Die Grundlage der Entwicklung und Physiologie von multizellulären Organismen liegt in der dynamischen Interaktion und Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen im Körper. Die Übermittlung von Informationen in eine Zelle geschieht mittels Signaltransduktionsprozessen. Die Signaltransduktion beschreibt biochemische Prozesse, mit Hilfe derer Zellen extrazelluläre Signale zu ihren zellulären Effektorstrukturen weiterleiten. In multizellulären Organismen werden extrazelluläre Informationen beispielsweise durch Ionen,

Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone übermittelt. Diese Abläufe ermöglichen einer Zelle, sich an aktuelle Bedingungen und Bedürfnisse durch Regulation der Zellgestalt und Zellbewegung, des Metabolismus sowie der Regulation der Genexpression anzupassen. Mit Hilfe von Membranrezeptoren und Proteinen innerhalb der Zelle wird das extrazelluläre Signal aufgenommen und über eine oder mehrere Signalkaskaden weitergeleitet. Dies erfolgt durch koordinierte Protein-Protein-Wechselwirkungen und durch Signalmoleküle, die enzymatische Aktivitäten besitzen.

Die zwei gegensätzlich arbeitende Enzymfamilien, die Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) und die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), kontrollieren viele biologische Prozesse (Abb. 5). PTPs entfernen Phosphatgruppen an Tyrosinphosphorylierten Proteinen, die wichtig für die Signaltransduktion sind.

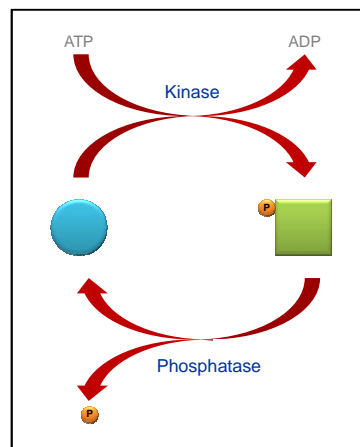


Abb. 5: Schematische Darstellung der Phosphorylierungsgleichung

Dabei können sie als „An“- oder „Aus“-Schalter fungieren und beeinflussen auch die Dauer der jeweiligen Prozesse. PTPs regulieren viele Signalwege und kontrollieren somit verschiedene Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Metabolismus, die Progression durch den Zellzyklus, Kommunikation zwischen den Zellen, Zellmigration, Gentranskription, Ionenkanal-Aktivität, die Immunantwort und Entscheidungen über das Überleben der Zellen [1]. Die Aktivität der PTPs ist durch Dimerisierung, Phosphorylierung und reversible Oxidation reguliert [2]. Die Anknüpfung und Abspaltung der Phosphoryl-Gruppe kann zu einer strukturellen und so zu einem funktionellen Wechsel des Protein-

Moleküls führen. Es wird angenommen, dass ein Drittel der zellulären Proteine phosphoryliert vorliegt.

Das menschliche Genom kodiert 518 Kinasen, davon 90 Tyrosin-Kinasen, sowie mehr als 130 Protein-Phosphatasen und 107 Tyrosin-Phosphatasen [3].

Protein-Phosphatasen (PPs) lassen sich über ihre Substrat- und Struktur-spezifität in Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen (PSTPs), Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und Dualspezifische Phosphatasen (DSPs) unterscheiden. Die PTPs und die DSPs sind verwandt und zeigen eine hohe Sequenzidentität.

Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen werden in vier Klassen unterteilt [3]:

- 1) Die klassischen Rezeptor-PTPs (RPTPs) (Abb. 6)
- 2) Die klassischen Nicht-Rezeptor-PTPs (nRPTPs) (Abb. 6)
- 3) Dualspezifische Phosphatasen (DSPs)
- 4) Die niedermolekularen PTPs (LMW PTPs)

Dabei werden RPTPs und nRPTPs noch in weitere Subtypen gegliedert, die abhängig von der Struktur ihrer nicht-katalytischen Domäne sind.

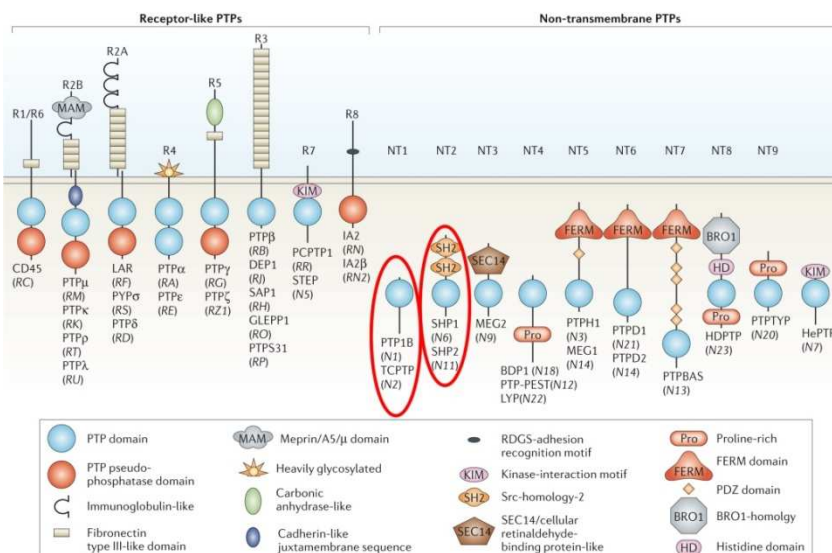


Abb. 6: Schematische Übersicht der nRPTPs und der RPTPs [4]

Die in dieser Arbeit untersuchten Protein-Tyrosin-Phosphatasen gehören zu den klassischen Nicht-Rezeptor Protein-Tyrosin-Phosphatasen (SHP-2, SHP-1 und PTP1B, siehe Markierung Abb. 6) und den niedermolekularen Protein-Tyrosin-Phosphatasen (MptpA).

2.2.1 Der Katalysemechanismus der PTPs

Protein-Tyrosin-Phosphatasen sind α/β -Proteine, d.h. sie bilden β -Barrel-Strukturen mit flankierenden α -Helices. Die Aktivtasche, das katalytische Zentrum der PTPs, befindet sich innerhalb einer Vertiefung an der Proteinoberfläche. Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen benötigen keine Metallionen und katalysieren die Phosphat-Hydrolyse über ein kovalentes Phosphocystein-Intermediat. PTPs besitzen strukturell drei wichtige, konservierte Motive: die PTP-Schleife (VHCSAGXGRTG), die WPD-Schleife (WPD_XGXP) und die pTyr-Erkennungsschleife (NXXKNRY). Der Katalysemechanismus der PTPs enthält einen nukleophilen Angriff und besteht aus zwei Schritten.

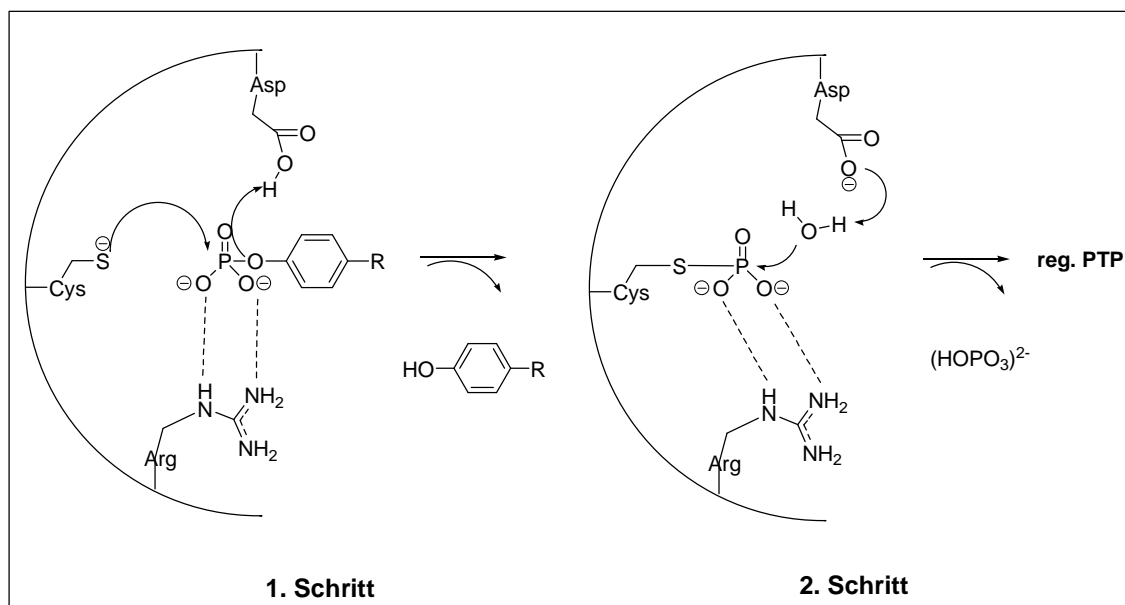


Abb. 7: Darstellung des Katalysemechanismus der PTPs

Das PTP-Motiv befindet sich am Boden der katalytischen Tasche der PTPs. Das Cystein in dieser Signatur ist das Nukleophil, das das Phosphocystein-Intermediat bildet (Abb. 7, 1. Schritt) [5]. Eine Wasserstoffbrücke vom Arginin und weitere Amidgruppen aus der Umgebung stabilisieren dabei das deprotonierte Cystein und das Intermediat [6]. Durch die Asparaginsäure wird das Intermediat protoniert und die Abgangsgruppe gebildet [7]. Im geschlossenen und gebundenen Substratzustand formt Aspartat eine Wasserstoffbrücke zum phenolischen Sauerstoff vom pTyr. Das Cystein befindet sich am N-Terminus einer langen Helix in der Mitte von der

katalytischen Domäne. Die Helix induziert einen Dipol und verändert dadurch die Eigenschaften der Cystein-Thiolat-Seitenkette. Das Phosphat wird auf das Cystein übertragen, um ein Thiophosphat zu bilden, das anschließend durch Wasser hydrolysiert wird (Abb. 7, 2. Schritt) [8]. Die WPD-Schleife schließt während der Substratbindung die Aktivtasche [9]. Der Energieaufwand der Bildung der Bindung des Nukleophils mit dem Übergangszustand ist minimal, jedoch das Brechen der Bindung zwischen der Phosphor- und der Abgangsgruppe ist beträchtlich. Phosphat-Monoester werden in einem thermodynamisch günstigen Prozess hydrolysiert, aber sind in der Abwesenheit von Enzymen unter physiologischen Bedingungen kinetisch inert [1].

Die Substratspezifität von Phosphatasen für Phosphotyrosin, -serin und -threonin resultiert aus der Tiefe der Aktivtasche, die durch die pTyr-Erkennungsschleife definiert wird. Bei den klassischen PTPs besitzt sie eine Tiefe von 9 Å, bei Dualspezifischen Phosphatasen von 6 Å. Diese Differenz erklärt die höhere Substratspezifität der klassischen PTPs, da die Ausdehnung von Serin/Threonin-Resten nicht groß genug ist, um das katalytische Cystein zu erreichen.

Trotz homologer Strukturen und konservierter Sequenzmotive in der PTP-Familie, zeigen die Enzyme unterschiedliche Substratspezifität auf, die sich durch charakteristische Aminosäurereste ergibt. Aufgrund dieser Tatsache ist eine Entwicklung von PTP-Inhibitoren möglich, die selektiv PTPs innerhalb der Familie und auch gegenüber DSP und Serin/Threonin-Phosphatasen hemmen [10] [11].

2.3 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 gehört zu der Gruppe der zytoplasmatischen Tyrosin-Phosphatasen. Sie wird ubiquitär exprimiert und besitzt ein Molekulargewicht von 68,5 kDa. Die Phosphatase SHP-2 besitzt zwei SH2-Domänen (SH2= Src-Homologie 2), die N-terminale SH2- und C-terminal SH2-Domäne, eine Phosphatase-Domäne (PTP) mit der katalytischen Tasche und einen C-terminalen Bereich, der zwei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, Y542 und Y580, enthält (Abb. 8) [12]. Weiterhin besitzt sie ein Prolin-reiches Motiv, dessen Funktion noch unbekannt ist.



Abb. 8: Schematischer Aufbau der ProteinTyrosin Phosphatase SHP-2

Die Kristallstruktur von SHP-2 wurde 1998 von Hof *et al.* beschrieben (Abb. 9) [13].

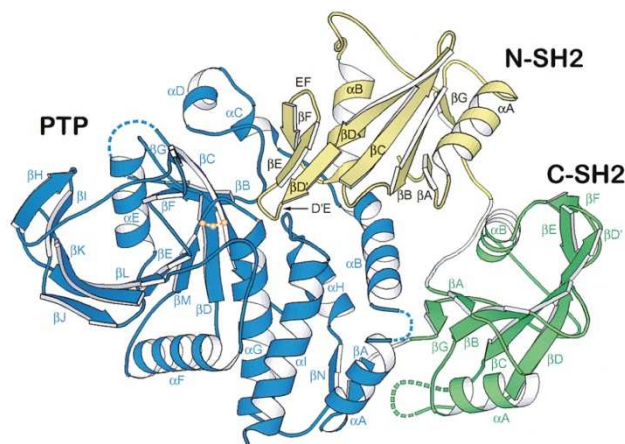


Abb. 9: Kristallstruktur der Protein Tyrosin Phosphatase SHP-2 [13]

Die Struktur verdeutlicht, wie die katalytische Aktivität des Enzyms durch die SH2-Domänen reguliert wird. Im Grundzustand, bei Abwesenheit eines Tyrosinphosphorylierten Bindungspartners, tritt eine Autoinhibition auf, d.h. die N-terminale SH2-Domäne interagiert mit Bereichen der Phosphatase-Domäne und blockiert somit das aktive Zentrum (Abb. 10) [14]. Diese Autoinhibition kann durch die Bindung der N-terminalen SH2-Domäne oder beider SH2-Domänen an spezifische Phosphotyrosinmotive aufgehoben werden. Dabei scheint die C-terminale SH2-Domäne eine geringere Rolle bei der Aktivierung zu spielen, liefert für diesen Vorgang jedoch eine gewisse Bindungsenergie und Spezifität. Somit stellt die N-SH2-Domäne einen konformativen Schalter dar. Entweder bindet die N-SH2-Domäne an die PTP-Domäne und hemmt diese oder sie interagiert mit Phosphotyrosin-Motiven von bestimmten Signalpartnern und lässt die PTP-Domäne frei und aktiv. Die zwei C-terminalen Tyrosinreste, Y542 und Y580, scheinen ebenfalls am Aktivierungsmechanismus beteiligt zu sein. Diese Tyrosinmotive können durch Janus- oder andere Tyrosinkinasen phosphoryliert werden. Dadurch können sie ebenfalls mit den SH2-Domänen interagieren und somit die intramolekulare Bindung aufheben [15].

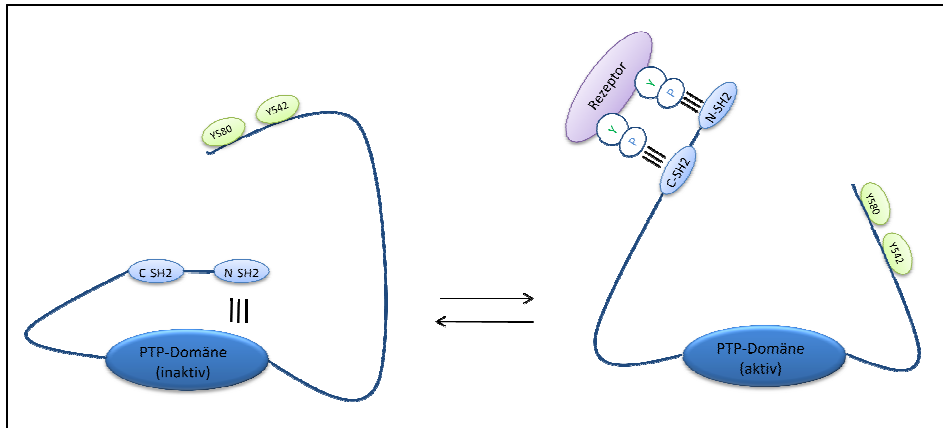


Abb. 10: Schematische Darstellung der Autoinhibition von SHP-2

In den meisten Fällen übt SHP-2 eine positive Funktion bei der Signaltransduktion über Rezeptortyrosinkinasen aus. Sie wechselwirkt über seine SH2-Domänen mit einer Vielzahl von Proteinen in PDGF- und EGF-Signalwegen. SHP-2 kontrolliert positiv die Aktivierung der RAS/MAPK-Kaskade, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Im Gegensatz dazu wird der JAK/STAT-Signalweg negativ von SHP-2 beeinflusst. Im Menschen wird SHP-2 in der Embryonalentwicklung für die Bildung von z.B. Skelettstrukturen benötigt, sowie für die Bildung der Klappentaschen (Semilunarklappe) im Herzen und die Blutbildung. Weiterhin verdeutlichen experimentelle Mutationen in Mäusen die wichtige Funktion von SHP-2 für die Stammzellendifferenzierung und für die Entwicklung der drei embryonalen Keimblätter. Die bedeutende Rolle zeigt sich ebenfalls in der anschließenden Entwicklung und Funktion von spezifischen Zelllinien im Zentralen Nervensystem, im Peripheren Nervensystem, im Herzen, in epithelen Organen und während der T-Zellen-Entwicklung.

Das PTPN11-Gen (OMIM 176876), das Gen, das SHP-2 kodiert, erstreckt sich über 90 kb und besteht aus 16 Exons. Es befindet sich auf dem Chromosom 12 (12q24).

Es gibt zwei verschiedene Gruppen von PTPN11-Mutationen, die im Menschen identifiziert wurden. Die erste Gruppe weist Keimbahn-Mutationen auf und verursacht z.B. das Noonan-Syndrom und andere nah verwandte Entwicklungsstörungen (*Kapitel 2.3.2.1 und 2.3.2.2*). Die Mutationen der zweiten Gruppe sind somatische Mutationen. Sie verursachen hematologische und leukämische Krankheiten, kommen jedoch selten in soliden Tumoren vor.

Die Mehrzahl dieser Mutationen bestehen in Änderungen von Aminosäuren, die sich in der Nähe der N-SH2- und der PTP-Domäne befinden. Untersuchungen zeigen, dass beide Arten von Mutationen, Keimbahn- und somatische Mutationen, durch Destabilisierung die Autoinhibition des Enzyms begünstigen. Das führt zu einem andauernden Signal durch den RAS/MAPK-Signalweg in Ligandenabhängiger Weise.

Zum Beispiel ist die E76K-Mutation in der N-SH2-Domäne von SHP-2 Leukämie-spezifisch (Abb. 11) [16]. In dieser Mutation ist die Autoinhibition aufgehoben und somit SHP-2 auf diese Weise aktiviert. Die Phosphatase Aktivität des mutierten Enzyms ist 100-fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp [17] [18] [19].

In *de novo*-Neuroblastomen und *de novo*-akuten myeloischen Leukämien im Kindesalter wurde die T507K Mutation gefunden, jedoch nicht im Noonan Syndrom oder der juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML), die auf der PTP-Domäne liegt (Abb. 11) [20]. Sie beeinträchtigt nur gering die Autoinhibition und führt somit zu einem zweifachen Anstieg in der Phosphatase-Aktivität.

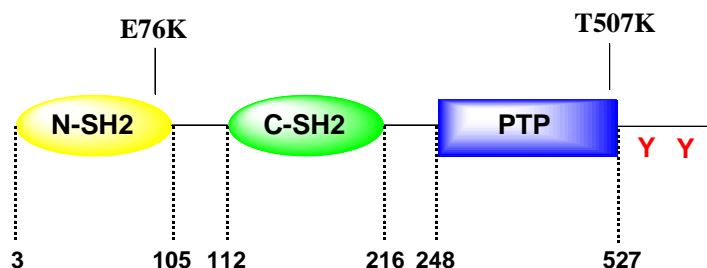


Abb. 11: Schematische Darstellung der untersuchten Mutationen von SHP-2

2.3.1 Die Rolle von SHP-2 im Met-und Ras/MAPK-Signalweg

Als direkte Substrate von SHP-2 wurden SHPS1 (*SHP substrate 1*), Gab1, der EGF-Rezeptor sowie Paxillin identifiziert [21] [22].

Das Adapterprotein Gab1 (growth-factor-receptor-bound protein 2 (Grb2)-associated binder 1) und sein Effektor SHP-2 besitzen eine große Bedeutung für die anhaltende Stimulation des ERK/MAPK-Signalweges (extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) [23]. Gab1 ist das wichtigste Substrat des Met-Rezeptors und ist zentral für die Aktivierung dessen

Signalweges [24]. In unstimulierten Zellen liegt Gab1 in der unphosphorylierten Form vor. SHP-2 ist durch die Autoinhibition im Grundzustand inaktiv (Abb. 12, links). Eine durch hepatozytische Wachstumsfaktoren/Scatterfaktoren (HGF/SF) hervorgerufene Stimulation des Met-Rezeptors führt zu einer direkten Bindung von Gab1 an die RTK Met über die Met-Bindungs-Domäne (MBD) und von Pro (Prolin-reiche Region) an Grb2 (Abb. 12, rechts). Die PH-Domäne (Pleckstrin-homologe Domäne) von Gab1 ist für eine feste Lokalisierung an der Membran verantwortlich. Die Aktivierung von Met führt zur Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 an einigen Resten, unter anderem an Bindungsmotiven, die wichtig für die Bindung der SH2-Domäne von SHP-2 sind. Die Wechselwirkungen zwischen Gab1 und der N-terminalen SH2-Domäne von SHP-2 stören die Bindung mit der PTP-Domäne und aktivieren somit die Phosphatase.

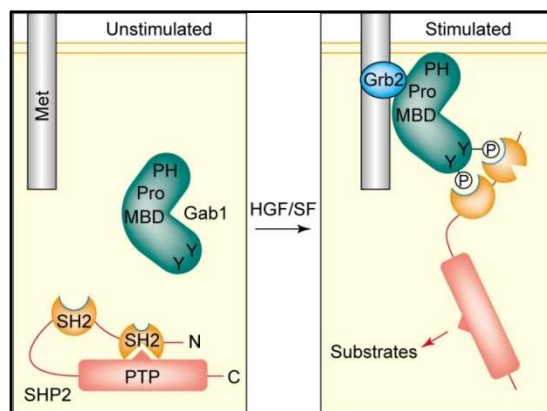


Abb. 12: Die Rolle von SHP-2 im Met-Signalweg [23]

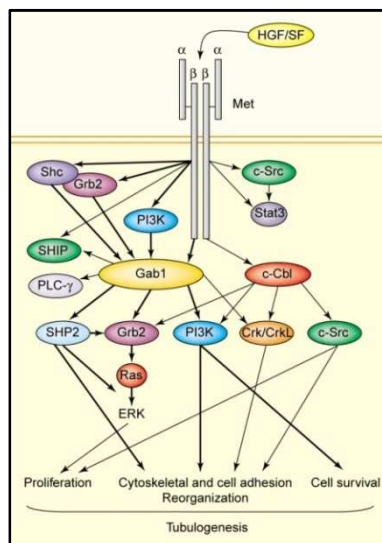


Abb. 13: Signalübertragung beim Met-Rezeptor [23]

Der Ras/ERK MAPK-Signalweg ist ein bedeutender Signalweg von RTKs und Zytokinrezeptoren, der durch SHP-2 beeinflusst wird [12] [23]. Es konnte gezeigt werden, dass SHP-2 die andauernde Aktivierung von Ras und dem signalabwärts befindenden ERK/MAPK-Signalweg begünstigt. Verschiedene Mechanismen wurden identifiziert durch die SHP-2 den Ras/ERK-Signalweg aktiviert (Abb. 14) [25] [26]. Wie anschließend die Regulierung von SHP-2 erfolgt, hängt vom Rezeptor- und/oder Zelltyp ab.

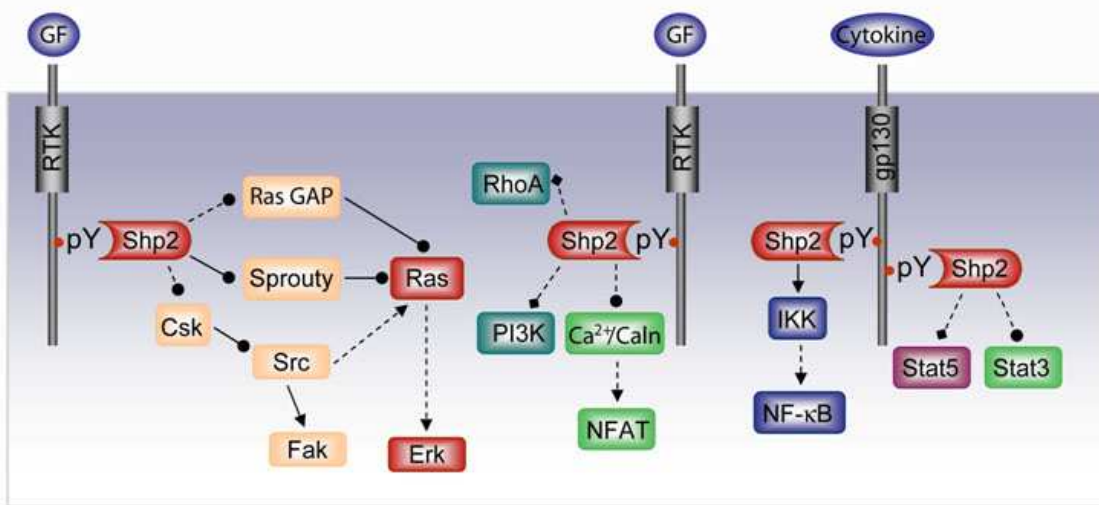


Abb. 14: SHP-2-regulierte Signalwege [26]

In Abbildung 14 wird deutlich, dass SHP-2 den Ras/ERK-Signalweg über verschiedene Mechanismen aktivieren kann, wie z.B. über die Dephosphorylierung der Ras GAP-Bindungsstelle von spezifischen Rezeptoren und Adapterproteinen. Eine weitere Möglichkeit verläuft über die Dephosphorylierung des negativen Ras/ERK-Regulators Sprouty. Alternativ führt die Regulation der Src-Kinaseaktivität durch direkte Phosphorylierung von Src oder durch indirekte Regulation des Src-Inhibitors Csk zu einer Erhöhung der Aktivität des ERK-Signalweges. SHP-2 steht ebenfalls mit der Steuerung von PI3K, Fak und RhoA sowie dem Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg in Verbindung. Weiterhin gibt es Hinweise, dass SHP-2 eine Funktion bei der Regulation des JAK/Stat-Signalweges besitzt.

2.3.2 SHP-2 und Krankheiten

2.3.2.1 SHP-2-Mutationen im Noonan-Syndrom

Das Noonan-Syndrom (NS) ist ein Fehlbildungskomplex mit genetischer Ursache. Die Bezeichnung geht auf die US-amerikanische Kinderkardiologin Jacqueline Noonan zurück, die dem Syndrom 1963 ihren Namen gab. Aufgrund der Ähnlichkeit der feststellbaren Symptome mit dem Ullrich-Turner-Syndrom, bezeichnet man das Noonan-Syndrom auch als Pseudo-Turner-Syndrom oder Male-Turner-Syndrom. Allerdings besteht beim Turner-Syndrom eine Chromosomenanomalie, die nur Mädchen betrifft. Der Chromosomensatz beim Noonan-Syndrom hingegen ist normal. Das NS wird autosomal-dominant vererbt. Jedoch muss nach heutigem Wissensstand eine genetische Heterogenität für das NS angenommen werden. Die Vererbung des Noonan-Syndroms erfolgt meist über die Mutter, da die männlichen Patienten in der Regel unfruchtbar sind.

Die Fehlbildungen können das äußere Erscheinungsbild betreffen, aber auch innere Organe. Charakteristisch sind Minderwuchs, typische Dysmorphien und angeborene Herzfehler.

Das Noonan-Syndrom ist relativ häufig. Die Angabe über die Häufigkeit liegt bei 1:500 bis 1:2500 Kinder weltweit. In Deutschland sind ca. 80.000 Menschen betroffen. Das Syndrom betrifft beide Geschlechter gleichermaßen und ist nach Trisomie 21 die zweithäufigste Ursache, die zum Auftreten eines Herzfehlers führt.

In Untersuchungen konnte die Hauptursache für diese genetische Besonderheit ermittelt werden. Bei Patienten mit NS scheint ein gestörter Aktivierungsmechanismus von SHP-2 pathogenetisch von Bedeutung zu sein. Tartaglia et al. konnten zeigen, dass Missense-Mutationen in der N-terminalen SH2-Domäne oder der Phosphatase-Domäne von SHP-2 in 50 % der betroffenen Patienten zu finden ist [16] [17]. Die Mutationen bedingen eine gesteigerte Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2. Wahrscheinlich beeinflussen alternativ eingebaute Aminosäuren die Aktivierung von SHP-2 und fördern somit die anhaltende Aktivierung der ERK/MAPK wie in Tiermodellen gezeigt werden konnte [18].

Aufgrund der identifizierten Mutation ist es möglich, durch eine molekulargenetische Untersuchung bei Verdacht auf das NS, eine exakte

Diagnose zu stellen. Allerdings wird die Diagnose von NS häufig anhand der Symptomatik gestellt. Eine ursächliche Behandlung zur Heilung gibt es gegenwärtig nicht. Es ist lediglich eine symptomatische Therapie möglich, wie z. B. eine operative Korrektur der Herzfehler.

2.3.2.2 SHP-2-Mutationen im LEOPARD Syndrom

Das LEOPARD-Syndrom oder kardiomyopathische Lentiginose ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die 1969 erstmals von Gorlin beschrieben wurde [27]. LEOPARD ist ein Akronym für die charakteristischen klinischen Symptome. LEOPARD steht für Lentiginosis, (sommersprossenartige schwarze oder dunkelbraune Flecken), Elektrokardiographische Störungen (z.B. Schenkelblock), Okulärer Hypertelorismus, Pulmonalstenose, Abnormalität der Genitalien, Retardierung des Wachstums und Deafness (Innenohrschwerhörigkeit oder Taubheit).

2002 wurden beim LEOPARD-Syndrom, wie bereits bei dem teilweise klinisch überlappenden Noonan-Syndrom, Mutationen im PTPN11-Gen als molekulare Ursache identifiziert. In mehr als 80 % der Fälle wurden heterozygote Keimbahnmutationen von PTPN11 gefunden [28] [29]. Die Mutationen befinden sich alle in der PTP-Domäne und beeinflussen somit die Katalysefunktion von SHP-2. Im Gegensatz zum Noonan-Syndrom kommt hier ein wiederkehrender Austausch von spezifischen PTPN11-Aminosäuren vor, die zum Verlust der SHP-2-Funktion führen, d.h. „Loss-of-Function“-Mutationen.

2.3.2.3 SHP-2-Mutationen bei verschiedenen Krebsarten

Somatische Gain-of-Function-Mutationen bei PTPN11 wurden in 35 % von Patienten mit sporadischer juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML) identifiziert [30]. JMML ist eine seltene myeloproliferative und myelodysplastische Fehlordnung bei Kleinkindern, die eine massive Expansion und Gewebeeinfiltration von myeloiden Zellen und makrozytischen Anämien besitzt. Die Mutationen liegen vergleichbar mit dem Noonan-Syndrom hauptsächlich in der N-SH2-Domäne von SHP-2 und beeinflussen ebenfalls die Autoinhibition. Mehrere Studien zeigen, dass Gain-of-Function-Mutationen bei JMML zu einer stärkeren Aktivierung führen als beim NS [18]. Genetische

Veränderungen bei PTPN11, Ras und Ras GAP, NF1 treten bei bis zu 85 % von JMML-Fällen auf. Das führt zu der Annahme, dass vergleichbar mit NS, die erhöhte Ras/ERK MAP-Kinase-Aktivierung wichtig bei der Entstehung von JMML ist [18].

PTPN11-Mutationen treten mit geringer Häufigkeit bei anderen myelomonozytischen Neoplasmen auf, wie bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), der chronischen myelomonozytischen Leukämie (CMML) und dem myelodysplastischen Syndrom (MDS). [18] Sowie in B-akuter lymphoblastischer Leukämie (B-ALL) [31].

Darüber hinaus wurden SHP-2 Mutationen mit geringer Häufigkeit in soliden Tumoren entdeckt, wie in Neuroblastomen, in Lungen- und Nierenkarzinomen. Zusammenfassend kann man sagen, dass fehlerhafte SHP-2-Aktivierung eine bedeutende Rolle bei der Krebspathogenese spielt.

2.3.3 Das Anwendungspotential von SHP-2 Inhibitoren

Das Potential von SHP-2-Inhibitoren zeichnet sich sowohl durch spezifische als auch breite Anwendungsmöglichkeiten aus.

a. Als Hemmer von stark wachsenden Tumoren, die von Rezeptoren der EGFR-Familie abhängen und einen großen Anteil der Krebserkrankungen (Brust und Prostata) ausmachen.

Die Behandlung mit einem spezifischen SHP-2-Inhibitor ist hier vielversprechend, da ein Zusammenhang zwischen der EGFR-familienabhängigen Brustkrebsentwicklung und der Hyperaktivierung des SHP-2-Ras-MAP-Kinase-Signalwegs nachgewiesen werden konnte [32].

b. Als spezifischer Antagonist zur Therapie von speziellen Leukämien.

Die Behandlung mit einem spezifischen SHP-2-Inhibitor ist auch hier Erfolg versprechend, da eine Korrelation zwischen Überexpression von SHP-2 und dem hyperproliferativen Phänotyp von Leukämie-Patienten nachgewiesen werden konnte [33]. Leukämie ist mit ca. 35.000 Neuerkrankungen pro Jahr in den USA relativ häufig.

- 1) Als Zweit- oder Zusatzbehandlung von chronischer myeloider Leukämie (CML).

Die Mehrzahl der CML-Patienten, die mit dem Medikament Gleevec® behandelt worden sind, erleiden oft bereits nach nur einem Jahr einen Rückfall, der häufig auf Resistenz gegen den darin enthaltenen Wirkstoff Imatinib beruht. CML-Zellen gehen durch Behandlung mit SHP-2-spezifischer siRNA in Apoptose über [34]. Basierend auf diesem Ergebnis betrachtet man seither SHP-2 als weiteres geeignetes therapeutisches Zielprotein zur Behandlung von CML. Das von Novartis entwickelte Gleevec® ist ein Medikament, das trotz relativ kleiner Patientenzahl (ca. 5000 Neuerkrankungen pro Jahr in den USA) kommerziell sehr erfolgreich ist, da es als Dauergabe verabreicht werden muss.

- 2) Als spezifischer Antagonist zur Therapie der juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML).

Wie im *Kapitel 2.3.2.3* beschrieben, kann eine Behandlung mit einem spezifischen SHP-2-Inhibitor vielversprechend sein, da der Zusammenhang zwischen Genmutation und Krankheitsursache hier klar belegt ist.

- c.** Als Hemmer von Met-abhängigen Tumoren.

Überexpression von HGF/SF sowie Mutationen von Met spielen eine gewisse Rolle bei vielen Tumoren [24]. Im Weiteren wurde postuliert, dass Met die Metastasierung von Tumoren fördert. Metastasen sind für den Tod der meisten Krebspatienten verantwortlich. Met-Antagonisten im Allgemeinen und SHP-2-Inhibitoren im Speziellen könnten die Ablösung und Migration von Epithelzellen vom Primärtumor blockieren. Zusätzlich sollten sie in der Lage sein, nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors die Invasion bereits verstreuter Zellen in das umgebende Gewebe zu verhindern und solche vereinzelter Zellen in die Apoptose zu treiben.

- d.** Als mögliches Therapeutikum beim Noonan-Syndrom (NS) und beim LEOPARD-Syndrom (LS).

Wie im *Kapitel 2.3.2.1* und *2.3.2.2* beschrieben ist, wurden in beiden Krankheiten genetische Mutationen von SHP-2 identifiziert. Beim Noonan-

Syndrom sind es ca. 50 % der Patienten und beim LEOPARD-Syndrom sind es ca. 90 % der Patienten.

e. Als mögliches Therapeutikum bei Leptin-Resistenz und Fettleibigkeit.

Zusätzlich stellt SHP-2 ein potentiell therapeutisches Ziel für die Behandlung von Leptin-Resistenz und Fettleibigkeit dar [35]. Es konnte gezeigt werden, dass SHP-2 eine wichtige Rolle beim Leptin-Signalweg spielt. Außerdem hat SHP-2 Einfluss auf die hypothalamische Kontrolle bei der Energiebalance und dem Metabolismus.

2.4 Weitere therapeutisch relevante Protein-Tyrosin-Phosphatasen

In dieser Arbeit wurden weitere therapeutisch relevante Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1, PTP1B und MtpA untersucht, um die Selektivität der entwickelten potentiellen SHP-2-Inhibitoren gegenüber verwandten PTPs zu analysieren.

2.4.1 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1

Die zytosolischen Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 weisen eine Sequenzhomologie von 58 % auf, ihre Tertiärstruktur ist jedoch nahezu identisch. SHP-1 besitzt auch zwei SH2-Tandem-Domänen am N-Terminus, gefolgt von einer katalytischen PTP-Domäne. Allerdings besitzen diese beiden Enzyme unterschiedliche biologische Funktionen *in vivo*.

Die Kristallstruktur von SHP-1 zeigt, dass das ligandenfreie Enzym ebenfalls in der autoinhibierten Form vorliegt [36]. Vergleichbar mit SHP-2 blockiert die N-SH2-Domäne die katalytische Domäne und hält die Phosphatase somit in der inaktiven Konformation. Allerdings besitzt die C-SH2-Domäne von SHP-1 eine andere Orientierung und ist flexibler verglichen mit der von SHP-2. Die PTP-Domäne, ein stark verdrehtes 10-strängiges β -Faltblatt, wird von vier Helices auf der konvexen Seite und zwei Helices und einem β -Hairpin auf der konkaven Seite flankiert. Die Architektur der drei Domänen ist insgesamt kompakt. Abbildung 15 zeigt die intermolekulare Interaktion der N-SH2-Domäne mit der PTP-Domäne. Die SH2-Domäne von SHP-1 weist die typische Faltung auf, die sich aus einem zentralen 4-strängigen β -Faltblatt mit einer α -Helix an

jeder Seite zusammensetzt. Die Überlagerung der beiden Kristallstrukturen von SHP-1 und SHP-2 verdeutlicht die strukturelle Ähnlichkeit der beiden PTPs (Abb. 15, rechts).

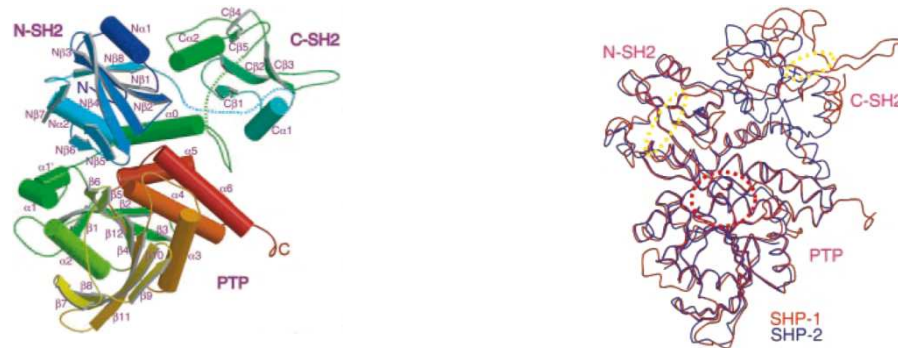


Abb. 15: (links) Kristallstruktur von SHP-1 und (rechts) Überlagerung der Kristallstruktur von SHP-1 und SHP-2 [36]

SHP-1 wird überwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert und wirkt negativ regulatorisch in Signalwegen von Zytokinrezeptoren wie IL-R, Antigenrezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie dem EGF-Rezeptor. Fehlfunktionen dieser Phosphatase im Lymphozyten wurden mit Lymphomen und Leukämien in Verbindung gebracht. Weiterhin wirkt SHP-1 als Tumorsuppressor.

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 ist ein potentielles Ziel für die Krebstherapie, da sie die Aktivierung der Immunzellen, die essentiell für die Antitumor-Immunität ist, negativ reguliert. Der selektive SHP-1-Inhibitor Natrium-Stibogluconat (SSG, Abb. 16) führt zu einer antitumoralen Aktivität von $\text{IFN-}\gamma^+$ Zellen [37]. Darüber hinaus reguliert SSG das Signal der antitumoralen Zytokine herunter. Aufgrund der guten präklinischen Befunde befindet sich SSG in der klinischen Phase.

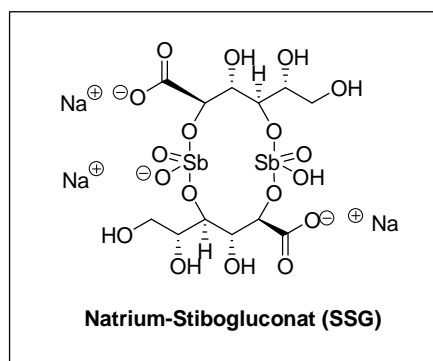


Abb. 16: Chemische Struktur von Natrium-Stibogluconat (SSG)

2.4.2 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP1B

PTP1B ist die erste gereinigte und charakterisierte Säuger-Protein-Tyrosin-Phosphatase [38]. Sie besteht aus insgesamt 435 Aminosäuren, von denen AS30-AS278 die katalytische Domäne bilden. Neben der katalytischen PTP-Domäne besitzt PTP1B eine prolinreiche Sequenz und eine Ankerdomäne, die die Phosphatase an das endoplasmatische Retikulum fixiert. Nach enzymatischer Abspaltung kann das Enzym zu seinen zytosolischen Substraten migrieren.

Die Kristallstruktur von PTP1B ist die erste Kristallstruktur einer Protein-Tyrosin-Phosphatase (Abb. 17) [39]. Das Enzym setzt sich aus einer einzelnen Domäne mit der katalytischen Tasche zusammen, die sich am Boden einer flachen Spalte befindet. Die Phosphaterkennungstasche wird durch ein Schleife gebildet, die am Aminoterminal einer α -Helix lokalisiert ist (11 AS-Motiv).

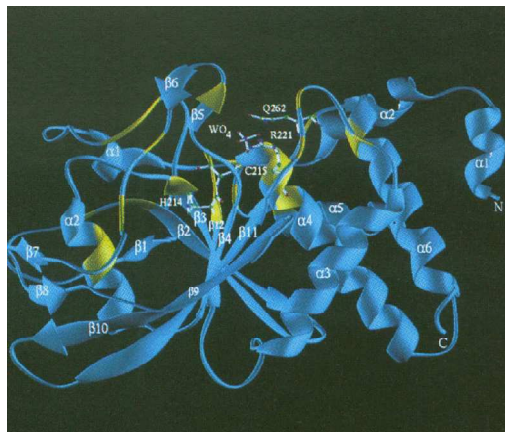


Abb. 17: Kristallstruktur von PTP1B [39]

Das Gen PTPN1 kodiert die Phosphatase PTP1B und liegt auf dem Chromosom 20. PTP1B spielt eine wichtige Rolle in der insulinabhängigen Signalkaskade. PTP1B wurde als ein Negativregulator von Insulin- und Leptin-Rezeptor-Signalwegen entdeckt [40] [41] [42]. Tierstudien zeigen, dass die Inaktivierung des PTP1B-Gens in Mäusen eine verbesserte Insulinempfindlichkeit ohne negative Nebenwirkungen, verbesserte glykämische Kontrolle und Resistenz gegen fettreiche Diät induzierte Adipositas haben. Die Wirkung von PTP1B als Insulin-Antagonist wurde durch viele Experimente bestätigt. Diese Ergebnisse machen das Enzym zu einem attraktiven und erfolgversprechenden Wirkstoffziel bei der Therapie von Diabetes Typ 2 und

Fettleibigkeit. PTP1B wird in der Embryonalentwicklung nicht benötigt, so dass die Mutation nicht letal ist.

2004 wurde die potentielle Rolle von PTP1B in onkogenen Signalwegen untersucht [43]. Im Jahre 2007 wurde es dann als therapeutisches Ziel in Brust- und Eierstockkrebs identifiziert [44] [45].

Zusätzlich gilt die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP1B als Prototyp für die Inhibitorentwicklung gegen PTPs.

2.4.3 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase MptpA

In der Vergangenheit ging man davon aus, dass Protein-Tyrosin-Phosphatasen nur in Eukaryonten vorkommen. Mit der Zeit wurden jedoch auch verschiedene PTPs in Bakterienstämmen identifiziert. Die Protein-Tyrosin-Phosphatase MptpA gehört zu der Klasse der niedermolekularen Phosphatasen (LMW PTPs), dessen Mitglieder eine katalytische Domäne von 18 kDa besitzen. Sie zeigen außerhalb des Signaturmotivs keine offensichtliche Sequenzhomologie mit den höher molekulargewichtigen PTPs. MptpA ist hochspezifisch für Substrate, die pTyr-Reste besitzen und zeigt Aktivität bei Myelin-basierten Proteinen.

Die Kristallstruktur wurde 2005 von Madhurantakam *et al.* veröffentlicht (Abb. 18) [46]. Sie setzt sich aus einer einzelnen α/β -Domäne zusammen, die durch ein zentrales, paralleles, 4-strängiges, verdrehtes β -Faltblatt charakterisiert wird. Flankiert wird sie auf beiden Seiten von einer α -Helix. Die typische Phosphatbindungsschleife befindet sich am C-Terminus des β 1-Faltblattes und am N-Terminus der α 1-Helix. Die Bindung des Phosphotyrosinringes des Substrats und die Substratselektivität des Enzyms gehen zurück auf die Tatsache, dass die katalytische Aktivtasche tief ist und die Reste, die die Wand der Tasche bilden, hauptsächlich aromatischer und hydrophober Natur sind.

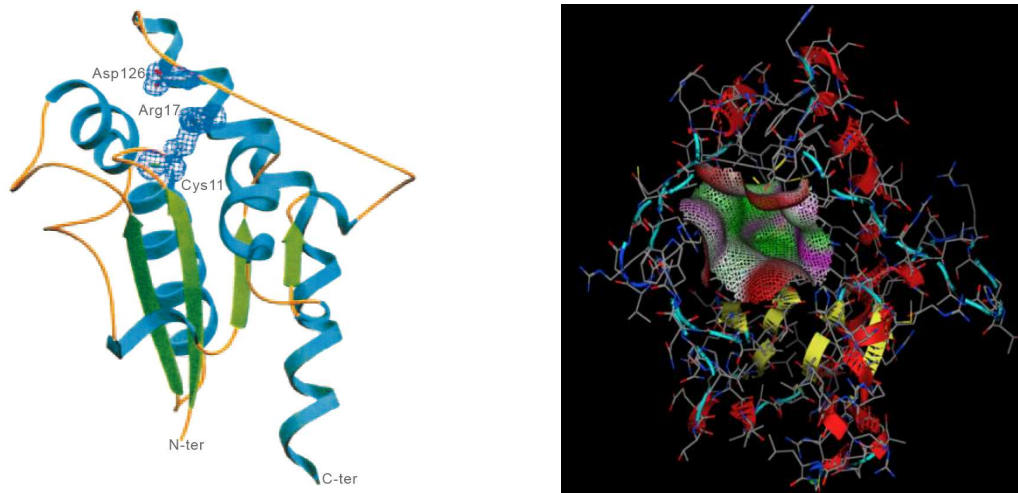


Abb. 18: Kristallstruktur von MptpA [46], Kristallstruktur mit Aktivtasche von MptpA generiert durch MOE

Diese Phosphatase kommt in pathogenen Mikroorganismen, den Tuberkulose-Bakterien vor. Tuberkulose (kurz: Tbc) ist eine chronisch verlaufende Infektionskrankheit, die durch *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ausgelöst und durch Tröpfcheninfektion übertragen wird. Tbc führt die weltweite Statistik der tödlichen Infektionskrankheiten an. 2008 forderte Tbc nach einer Schätzung des WHO 1.3 Millionen Menschenleben [47]. Der wichtigste Krankheitserreger ist das *Mycobacterium tuberculosis*, ein aerobes gram-positives Bakterium. Seltenerer Auslöser, aber vom gleichen Bakterienstamm sind *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* oder *Mycobacterium microti*. Die Tuberkulose betrifft in erster Linie die Lunge, über die Blutbahn streuend kann sie aber auch alle anderen Organe im Körper befallen, wie z.B. das Lungenfell, die Hirnhäute, die Knochen, die Harnwege, den Verdauungstrakt und die Haut. Besonders für Immungeschwächte (z.B. HIV-Patienten) ist Tbc eine oft tödliche Krankheit. Ein großes Problem ist die Resistenzentwicklung, die die Wirksamkeit der Medikamente hemmt und somit eine lange und vor allem konsequente Therapie notwendig macht.

Die Analyse des Mtb-Genoms gab Hinweise auf Gene, die die zwei Protein-Tyrosin-Phosphatasen MptpA und MptpB kodieren. Sie gelten als vielversprechende Wirkstoffziele für die Therapieentwicklung gegen Tbc. Sie werden durch Mykobakterien sekretiert und spielen eine Rolle beim Überleben in den Wirtsmakrophagen. MptpA inhibiert die Reifung des frühen Phagosoms, in dem sich das Mykobakterium befindet, zu dem späten Phagosom, indem es

ein Protein, das VPS33B, dephosphoryliert [48]. Dabei ist die höchste Konzentration dieser Phosphatasen im Zytosol. Es gibt Hinweise darauf, dass MptpA insbesondere bei der intrazellulären Infektion von Makrophagen exprimiert wird.

2.5 Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren

Wie vorher erläutert, wird defekte oder fehlerhafte PTP-Aktivität mit der Entstehung von einigen humanen Krankheiten wie z.B. Krebs und Diabetes in Verbindung gebracht [49]. Demnach könnten selektive PTP-Inhibitoren als mögliche Therapeutika entwickelt und eingesetzt werden.

Onkogene PTPs spielen kausale Rollen in der Krebsentstehung oder der Metastasierung und könnten somit als Zielstruktur dienen, um die pathogene Aktivität zu blockieren. Die bisherigen Untersuchungen weisen alle daraufhin, dass dieser Ansatz eine effektive und sichere Anti-Krebs-Strategie sein könnte. Eine große Anzahl von unterschiedlichen Ansätzen, die zur Identifikation und Entwicklung von verschiedenen Klassen von Protein-Phosphatasen-Inhibitoren führen, wird derzeit untersucht (*Kapitel 2.6*). Das Ergebnis ist eine Vielzahl von unterschiedlichen PTP-Inhibitoren. Fehlende Selektivität und ungünstige pharmakologische Eigenschaften dieser Inhibitoren sind weiterhin die limitierenden Faktoren für weiterführende klinische Studien. Das führt dazu, dass nur wenige Verbindungen als PTP-Inhibitoren in klinischen Studien sind. Trotz der großen Zahl von bisher charakterisierten PTPs und ihrer erkennbaren Rolle bei Krankheiten, konnte aufgrund der fehlenden PTP-spezifischen Wirkstoffe bisher keine detaillierte Aufklärung der Funktion und der Signalwege erfolgen [6].

In dieser Arbeit werden kleine Moleküle als potentielle Inhibitoren von Protein-Tyrosin-Phosphatasen verwendet.

Die aktive Form der katalytischen Tasche von PTPs beinhaltet eine hochpolare Phosphotyrosin-Bindungsstelle, die an eine flache Peptid-Substrat-Bindungsregion angrenzt. Zur Zeit besitzen alle potenten und kompetitiven Inhibitoren von PTPs häufig geladene pTyr-Mimetika, um eine starke Bindung mit der Phosphat-Bindungsstelle zu erhalten. Leider limitieren diese geladenen pTyr-Mimetika die Zellpermeabilität und die orale Bioverfügbarkeit [50].

Ein geeigneter Inhibitor für Protein-Tyrosin-Phosphatasen sollte daher folgende Bedingungen erfüllen (Abb. 19) [6]:

1. Gruppen, die die pTyr-Phosphatgruppe ersetzen oder imitieren und in Wechselwirkung treten (pTyr-Mimetikum).
2. Funktionalitäten, die binden und die katalytische Tasche füllen, um so den Arylring des pTyr-Rests darzustellen (z. B. eine Ringstruktur).
3. Zusätzliche Funktionalitäten, die aus der katalytischen Tasche herausragen und zu weiteren Wechselwirkungen mit dem Enzym führen und somit die Affinität und die Spezifität erhöhen könnten.

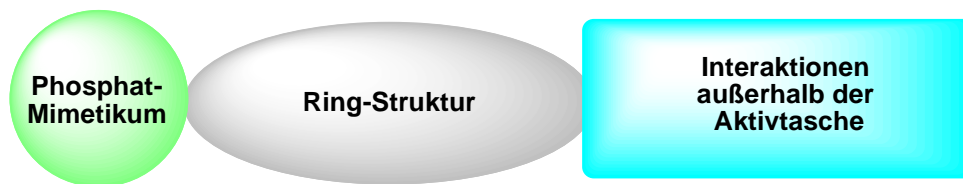


Abb. 19: Schematische Darstellung des Aufbaus eines PTP-Inhibitors

Die meisten bislang veröffentlichten PTP-Inhibitoren, die die Aktivtasche adressieren, enthalten nicht-hydrolysierbare pTyr-Mimetika, die den Vorteil dieser positiv geladenen Tasche nutzen. Um PTP-Inhibitoren mit hoher Spezifität und Selektivität zu entwickeln, ist es sehr wichtig, die strukturellen Besonderheiten des Wirkstoffziels zu kennen.

Bisher wurden verschiedene Arten von PTP-Inhibitoren beschrieben, hauptsächlich Inhibitoren der Prototyp Phosphatase PTP1B. Im Folgenden sollen zunächst einige veröffentlichte SHP-2-Inhibitoren und anschließend weitere Inhibitorclassen für PTPs allgemein vorgestellt werden.

2.5.1 Bisher bekannte SHP-2 Inhibitoren

Seit der Entdeckung der Verknüpfung von SHP-2 mit Krebs und anderen Krankheiten ist das Interesse an der Entwicklung von spezifischen SHP-2-Inhibitoren für Therapiezwecke gestiegen. Trotz der schwierigen Entwicklung von neuen PTP-Inhibitoren, konnten Strukturen identifiziert werden, die aktive und selektive SHP-2-Inhibitoren sind.

Nören-Müller *et al.* identifizierten im Jahr 2006 mit Hilfe der Biologie-orientierten Synthese und durch Screening von Bibliotheken, die auf Naturstoffen basieren, die Verbindungsklasse der Furanodictine als PTP-Inhibitoren (Abb. 20) [51]. Ein darauf basierendes Derivat ist ein selektiver Inhibitor von SHP-2 und mit einem IC_{50} -Wert von $2,47 \mu\text{M}$ im Enzymassay. Bei der "Biologie-orientierten Synthese" (BIOS) dienen Naturstoffe als Startpunkte für die Suche nach neuen Wirkstoffen. Um die Naturstoffe an das jeweilige Enzym anzupassen, werden chemische Reste nach dem Abbild der Natur entweder in Bereichen biologischer Relevanz eingeführt (Naturstoff-abgeleitete Synthese), oder man nutzt in der "Naturstoff-inspirierten Synthese" nicht den Naturstoff selbst, sondern nur einige seiner relevanten Kernstrukturen.

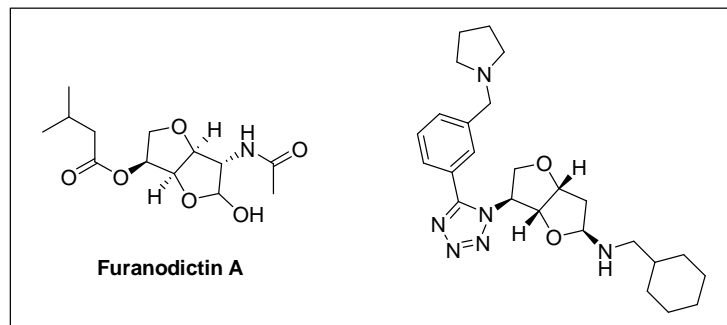


Abb. 20: Chemische Strukturen des Furanodictins A und einem Derivat [51]

Die Untersuchung der am NCI (Nationales Krebsinstitut, USA) vorhandenen diversen Substanzbibliothek (1981 Verbindungen) führte zu der Verbindung NSC-87877, die 8-Hydroxy-7-(6-sulfonaphthalen-2-yl)diazenyl-quinolin-5-sulfonsäure (Abb. 21). Der Inhibitor besitzt für SHP-2 einen IC_{50} -Wert von $0,318 \mu\text{M}$. Mit einem IC_{50} -Wert von $0,355 \mu\text{M}$ ist er jedoch nicht selektiv gegenüber SHP-1. Die Verbindung inhibiert die SHP-2-abhängige Erk1/2-Aktivierung in Zellen [52].

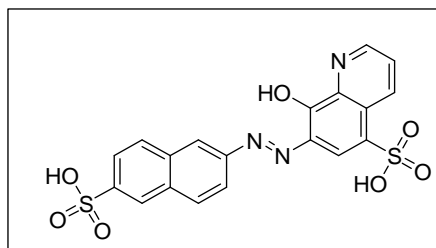


Abb. 21: Chemische Struktur von NSC-87877 [52]

Basierend auf einem virtuellen Screening von 2.7 Millionen Verbindungen, die in ein SHP-2-Homologiemodell gedockt wurden, konnte die Verbindung Phenylhydazonopyrazolonsulfonat (PHPS1) im Labor von Prof. Birchmeier (MDC Berlin) in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe (AG Rademann, FMP Berlin) identifiziert werden (Abb. 22) [53]. Es handelt sich um einen zu gewissen Grade spezifischen Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von $2,1 \mu\text{M}$, der zellpermeabel und nicht toxisch ist. PHPS1 hemmt SHP-2-abhängige zelluläre Vorgänge wie HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation und „Branching Morphogenesis“ von Epithelzellen. Des Weiteren inhibiert PHPS1 signalabwärts HGF/SF-induzierte anhaltende Phosphorylierung von Erk1/2 MAPK und Dephosphorylierung von Paxillin.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Leitstruktur von PHPS1 optimiert und mit *in vitro* und *in vivo* Experimenten untersucht (Kapitel 4).

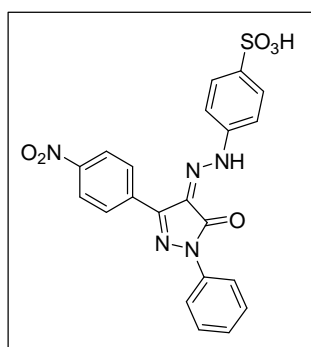
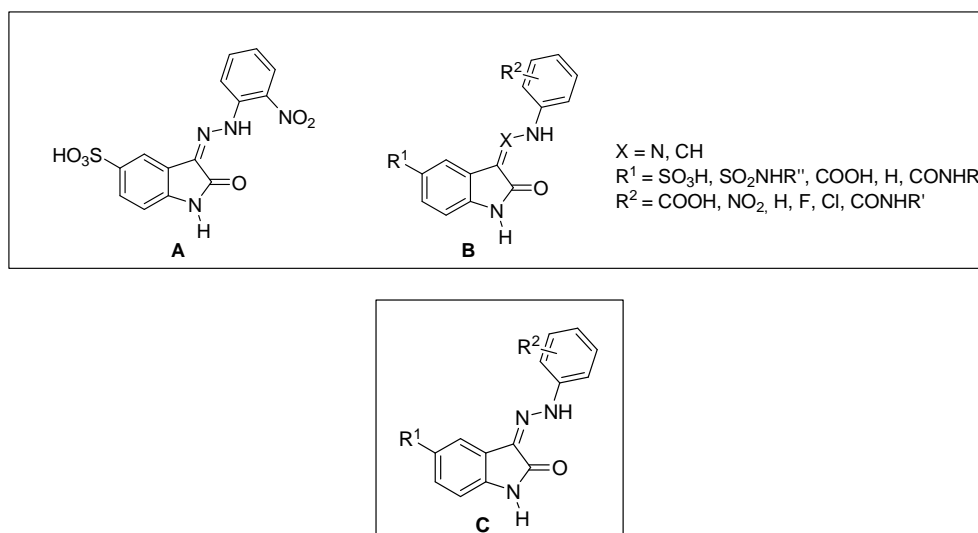


Abb. 22: Chemische Struktur von PHPS1 [53]

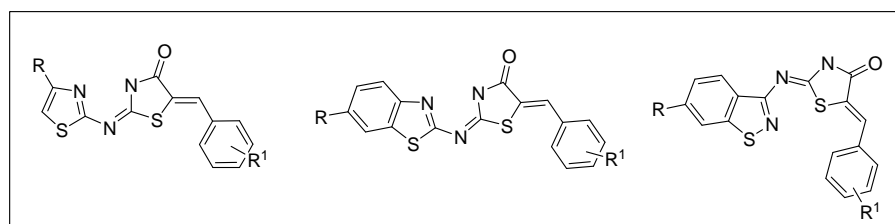
Im Jahr 2008 führte ein weiteres Screening der NCI-Substanzbibliothek zur Identifizierung der Verbindung, dem NSC-117199, einen Oxindol mit einem IC_{50} -Wert von $47 \mu\text{M}$ (Abb. 23A). Daraufhin wurde eine auf das Isatingerüst basierte Bibliothek synthetisiert (Abb. 23B). Es konnten mehrere Verbindungen mit einem IC_{50} -Wert im submikromolaren Bereich gefunden werden [54]. Die Verbindungen 10a-r (Abb. 23C) zeigen IC_{50} -Werte von $1\text{-}10 \mu\text{M}$ mit einer fünffachen Selektivität von SHP-2 gegenüber SHP-1. Die Verbindungen 14a und b (Abb. 23) zeigen eine inhibitorische Aktivität von $0,8 \mu\text{M}$ bzw. $15 \mu\text{M}$ mit einer Selektivität von SHP-2 gegenüber SHP-1 von 20- bzw. 4-facher Stärke.



compd	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM) ^a		
			Shp2	Shp1	PTP1B
5	SO ₃ H	2-NO ₂	46.8 ± 10.2	68 ± 17.1	96.7 ± 29.9
14a	CO ₂ H	2-CO ₂ H	0.8 ± 0.2	15.4 ± 2.1	1.5 ± 0.6
14b	CO ₂ H	3-CO ₂ H	15.8 ± 6.6	72.5 ± 19.3	38.2 ± 13.9
16	CONHCH ₂ (4-Cl-C ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	22.3 ± 5.2	19.4 ± 1.8	> 300
10a	SO ₂ NH ^t Pr	3-CO ₂ H	4.5 ± 1.7	15.7 ± 1.7	37.1 ± 4.9
10b	SO ₂ NH ^t Pr	4-CO ₂ H	4.5 ± 1.0	27.7 ± 9.0	9.3 ± 1.6
10c	SO ₂ NH ₂	2-NO ₂	11.9 ± 1.5	103.7 ± 17.4	156.6 ± 14.1
10d	SO ₂ NHCH ₂ (4-Cl-C ₆ H ₄)	2-NO ₂	4.4 ± 2.4	40.9 ± 15.3	9.8 ± 2.6
10e	SO ₂ NHCH ₂ (4-Me-C ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	5.0 ± 1.9	32.6 ± 8.5	11.3 ± 4.1
10f	SO ₂ NHCH ₂ C ₆ H ₅	4-CO ₂ H	1.3 ± 0.9	7.1 ± 1.1	2.5 ± 1.5
10g	SO ₂ NHCH ₂ (3-Cl-C ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	3.8 ± 0.2	42.5 ± 7.2	15.4 ± 6.2
10h	SO ₂ NHCH ₂ (4-Cl-C ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	1.4 ± 0.6	18.0 ± 7.2	18.8 ± 5.1
10i	SO ₂ NHCH ₂ (4-Cl-C ₆ H ₄)	4-CO ₂ H	5.9 ± 1.4	18.1 ± 3.7	7.5 ± 1.1
10j	SO ₂ NHCH ₂ (2-Cl-C ₆ H ₄)	4-CO ₂ H	7.4 ± 2.4	60.8 ± 26.1	11.7 ± 2.4
10k	SO ₂ NHCH ₂ (2-Cl-C ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	5.5 ± 0.4	15.9 ± 1.7	19.4 ± 10.2
10l	SO ₂ NHCH ₂ (3-CF ₃ -4-Cl-C ₆ H ₄)	2-CO ₂ H	22.9 ± 7.0	32.4 ± 17.9	25.7 ± 6.6
10m	SO ₂ NHCH ₂ (4-FC ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	1.0 ± 0.2	18.3 ± 5.2	14.5 ± 1.5
10n	SO ₂ NHCH ₂ (4-FC ₆ H ₄)	4-CO ₂ H	6.3 ± 2.3	10.8 ± 4.1	11.4 ± 0.4
10o	SO ₂ NHCH ₂ (3-Cl-4-F-C ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	4.8 ± 0.6	122.8 ± 74.5	54.9 ± 13.3
10p	SO ₂ NH(CH ₂) ₂ (2-Cl-4-Cl-C ₆ H ₃)	3-CO ₂ H	5.2 ± 1.7	73.4 ± 36.9	19.3 ± 13.8
10q	SO ₂ NHCH ₂ (3-CF ₃ -4-Cl-C ₆ H ₄)	4-CO ₂ H	8.3 ± 1.7	43.1 ± 7.2	32.8 ± 8.0
10r	SO ₂ NHCH ₂ (3-CF ₃ -4-Cl-C ₆ H ₄)	3-CO ₂ H	10.6 ± 1.5	74.2 ± 8.0	63.1 ± 24.7

Abb. 23: Chemische Struktur von NSC-117199 (A), die Grundstruktur der entwickelten Substanzbibliothek (B) und IC₅₀-Werte einiger Verbindungen basierend auf dem Oxindolgerüst (C) [54]

Im Jahr 2008 beschrieben Geronikaki *et al.* Thiazole als eine weitere geeignete Verbindungsklasse für SHP-2-Inhibitoren (Abb. 24). Die synthetisierte Substanzbibliothek besteht aus Verbindungen wie Thiazol-, Benzo[d]thiazol- und Benzo[d]isothiazol-Gruppen. Die beiden besten Substanzen (Verbindung 3 und 11, Abb. 24) zeigen Aktivitäten von 11,7 μM [55].



compd	ring	R	R ₁	K _i ^a (μM)
1	thiazole	H	4-OH	388.0
2	thiazole	H	3-OCH ₃ , 4-OH	25.6
3	thiazole	H	4-OCH ₃	11.7
4	thiazole	H	4-NO ₂	473.6
5	thiazole	H	3-NO ₂	547.5
6	thiazole	H	4-Cl	54.5
7	thiazole	H	3-Cl	1088.2
8	thiazole	H	2-Cl	32.3
9	thiazole	4-phenyl	3-OCH ₃ , 4-OH	103.2
10	thiazole	4-adamantanyl	3-OCH ₃ , 4-OH	12.3
11	benzothiazole	H	4-OCH ₃	11.7
12	benzothiazole	H	3,5-OCH ₃ , 4-OH	18.1
13	benzothiazole	6-NO ₂	3,5-OCH ₃ , 4-OH	12.9
14	benzothiazole	H	4-NO ₂	16.2
15	benzothiazole	H	3-NO ₂	28.7
16	benzothiazole	H	4-OCH ₃	22.8
17	benzothiazole	H	3-OCH ₃ , 4-OH	90.8

Abb. 24: IC₅₀-Werte und Strukturen einiger Verbindungen von Thiazol-Derivaten [55]

Durch virtuelles Screening von 1,3 Millionen Verbindungen mit anschließenden biologischen Experimenten wurden neun Verbindungen mit inhibitorischer Aktivität gegen SHP-2 identifiziert (Abb. 25). Dabei fanden Yu *et al.* zwei Verbindungen, die bei einer Konzentration von 100 μM eine 50 %ige Hemmung der SHP-2 Aktivität zeigen [56].

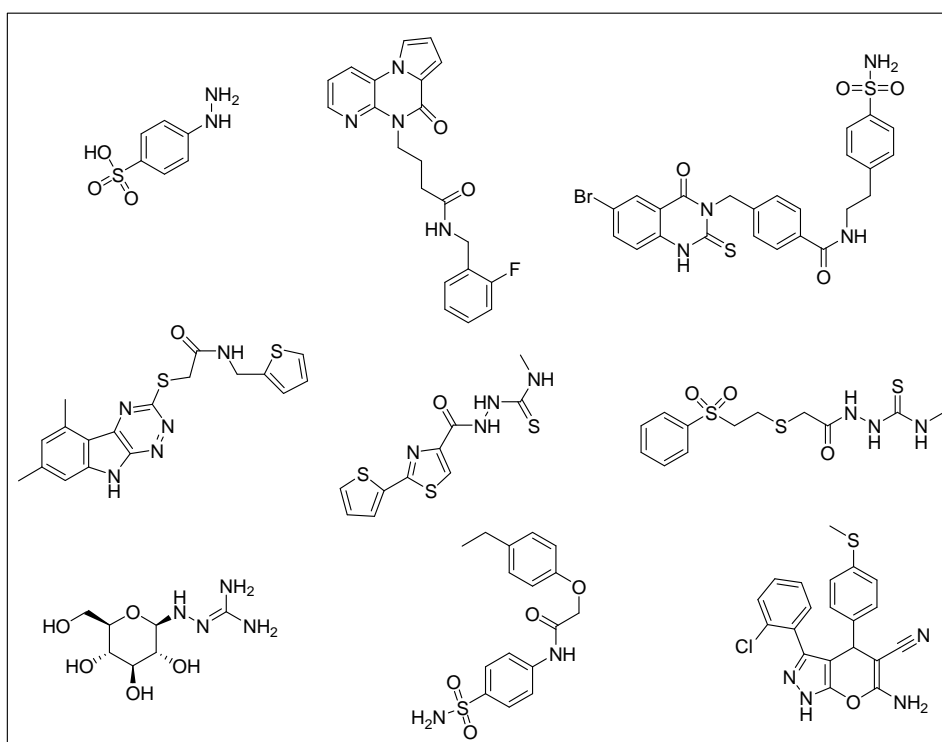


Abb. 25: Übersicht der gefundenen neun Hits [56]

Die Gruppe von Wu *et al.* fand durch das Screening der LopacTM- und SpectrumTM-Bibliothek (Microsource Corporation) 56 Verbindungen, die einen potenten, hemmenden Effekt auf SHP-2 aufweisen [57]. Dabei waren drei der Verbindungen selektiv gegen SHP-2. Die Verbindung 7-Deshydroxypyrogallin-4-carbonsäure (DCA) besitzt einen IC₅₀-Wert von 2,1 µM gegen SHP-2, zeigt jedoch gegen SHP-1 ebenfalls eine inhibitorische Aktivität mit einem Wert von 2,3 µM (Abb. 26). Der Mechanismus der Enzymreaktion ist eine Mischung aus kompetitiver und unkompetitiver Inhibition. Die Verbindung hemmt die Erk1/2-Aktivierung. Bei Zellproliferations-Experimenten konnte ebenfalls eine Hemmung beobachtet werden.

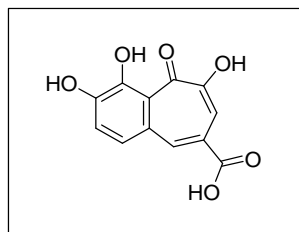
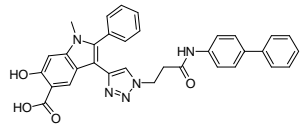
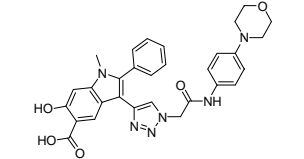
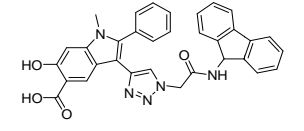
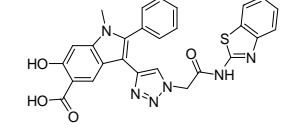
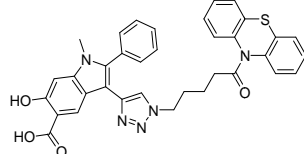


Abb. 26: Chemische Struktur von DCA [57]

Die Gruppe von Zhang *et al.* entwickelte einen SHP-2-Inhibitor, der eine Salicylsäure-basierte Struktur als pTyr-Mimetik beinhaltet (Abb. 27, links). Die Verbindungen der Bibliothek sollen die Aktivtasche mit anliegenden Nebentaschen adressieren, um eine Erhöhung der Affinität und Selektivität zu erzielen. Die Verbindung II-B08 (Verbindung 9, Abb. 27, links) besitzt einen IC₅₀-Wert von 5,5 µM und zeigt eine hohe zelluläre Aktivität. Sie hemmt stimulierte Erk 1/2-Aktivierung und Zellproliferation. Es handelt sich um einen reversiblen, nicht-kompetitiven Inhibitor, der SHP-2 bevorzugt inhibiert. Darüber hinaus konnte eine Kristallstruktur von SHP-2 mit diesem Inhibitor als Liganden gelöst werden (Abb. 27, rechts, RCS PDB-Datenbank: 3JRL) [58].

Verbindung	Struktur	IC ₅₀ [μM]
II-B08 (9)		5,5 ± 0,4
II-A09 (10)		7,8 ± 0,8
II-A12 (11)		10,4 ± 0,6
II-A15 (12)		9,1 ± 0,4
II-D50 (13)		8 ± 1

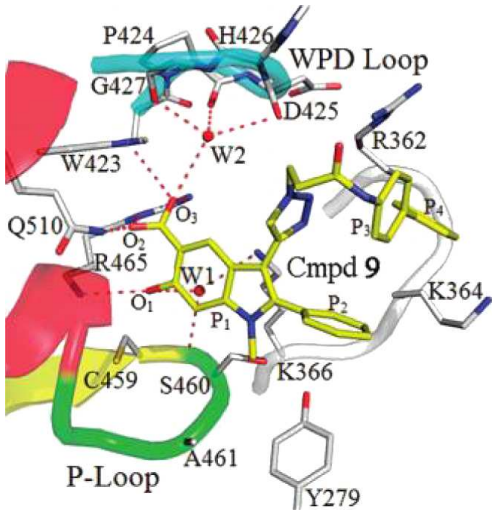


Abb. 27: Chemische Struktur mit IC₅₀-Werte der auf Salicylsäure-basierenden Inhibitoren und Kristallstruktur des identifizierten Inhibitors Verbindung II-B08 (9) mit SHP-2 [58]

Alle acht gezeigten SHP-2-Inhibitoren weisen gute Startpunkte für eine weitere Optimierung auf. Allerdings gibt es bisher noch keinen Hinweis auf klinische Studien mit einer dieser Verbindungen.

2.5.2 Unspezifische, anorganische PTP-Inhibitoren

Zu den unspezifischen, anorganischen PTP-Inhibitoren gehören z.B. Vanadate. Sie imitieren die Phosphatgruppe der natürlichen Enzymsubstrate. Vanadiumderivate wirken als Insulin-Mimetika und haben antimetastatische Eigenschaften. Allerdings hemmen sie auch andere Arten von Enzymen, wie ATPasen und Nukleasen. Weitere unspezifische Inhibitoren sind Phenylarsenoxid und Galliumnitrat [6].

2.5.3 Naturstoff-basierte PTP-Inhibitoren

Verschiedene PTP-Inhibitoren, die auf Naturstoffen basieren, wurden entwickelt. In den meisten Fällen ist die genaue Wirkungsweise unklar, da strukturbasiertes Design von neuen Analoga schwierig ist. Als Beispiel inhibiert das Alkaloid Nornuciferin die Phosphatase CD45 mit einem IC_{50} -Wert $5,5 \mu\text{M}$ und besitzt u.a. eine Wirkung gegen Leishmaniose [59] [60]. Weiterhin zeigen die Abbildungen 20 und 26 Beispiele für naturstoff-basierte PTP-Inhibitoren speziell bei SHP-2.

2.5.4 pTyr-Mimetika zur Entwicklung von niedermolekularen PTP-Inhibitoren

Ein wichtiger Teil der Inhibitorentwicklung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen besteht in der Identifizierung von sogenannten pTyr-Mimetika und die Einbindung dieser in größere Strukturen, die die Affinität erhöhen. Der pTyr-Rest selber ist aufgrund der enzymatischen Instabilität des Phosphatesters und der schlechten Bioverfügbarkeit nicht geeignet für das Inhibitor-Design.

Mit großen Bemühungen wird versucht, pTyr-Mimetika mit weniger Ladung zu entwickeln. Bislang gab es jedoch wenig Erfolg, die Ladung im Rahmen einer Leitstrukturoptimierung komplett zu entfernen. Einige der ersten Versuche zur Entwicklung von PTP1B-Inhibitoren, fokussierten sich auf nicht-hydrolysierbare pTyr-Mimetika basierend auf dem natürlichen PTP Substrat. Dadurch wurden Isostere wie z.B. das Phosphonomethylphenylalanin (PMP), Monofluorphosphanomethylphenylalanin (MFPMP), Difluorphosphanomethylphenylalanin (DFMP), Difluorphosphanomethylsulfonylphenylalanin (DFMSP) entwickelt (Abb. 28 und 29). Das Difluorphosphanomethylphenylalanin (DFMP, Abb. 28) ist deutlich der beste Kandidat in Bezug auf die inhibitorische Aktivität [61]. Die Fluoratome bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit NH-Bindungen in der Aktivtasche der PTPs aus. Trotzdem stellt die di-anionische Natur des Mimetikums weiterhin eine große Hürde dar.

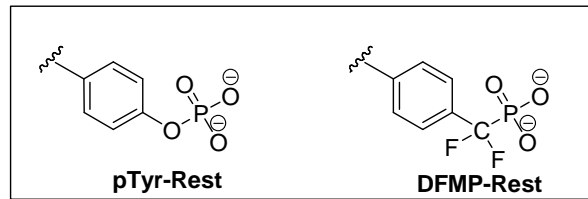


Abb. 28: Chemische Struktur von pTyr und DFMP

Der ausführliche Review von Blaskovich zeigt über fünfzig pTyr-Mimetika, die entwickelt wurden [62]. Dabei handelt es sich um phosphorhaltige und nicht-phosphorhaltige Verbindungen, die sich außerdem in ihren Ladungszuständen unterscheiden (nicht-, mono-, di-anionisch). Einige dieser Beispiele wurden in eine bekannte Peptidsequenz eingebaut und als PTP-Inhibitoren untersucht (Abb. 29).

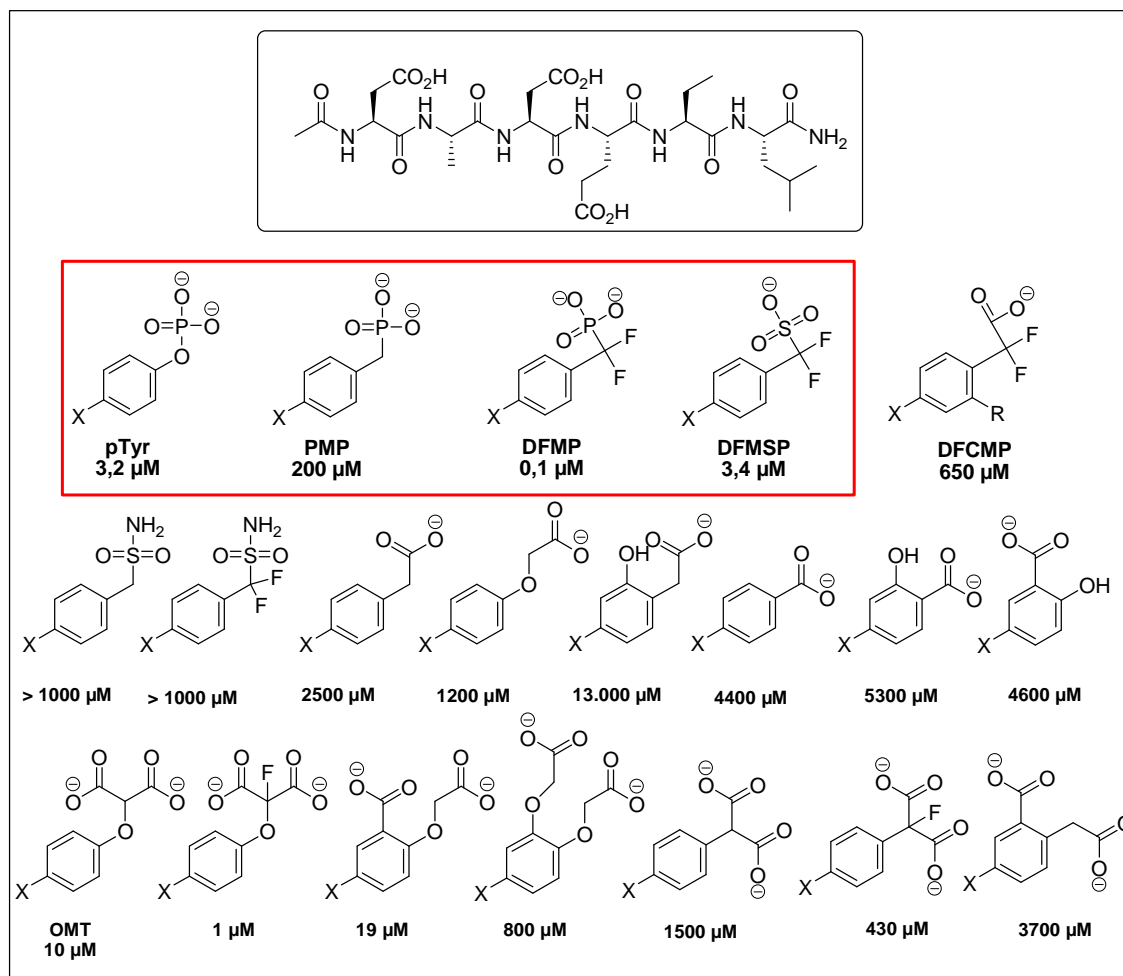


Abb. 29: Übersicht verschiedener pTyr Mimetika, die im Hexapeptid Ac-DADE-X-L-NH₂ getestet wurden [62]

Dieser Review fasst die bekanntesten Strukturen, die als pTyr-Mimetika gefunden worden sind, zusammen (Abb. 30) [62]. Neben den bereits erwähnten phosphorhaltigen Strukturen gibt es weitere Verbindungen wie das Aryloxymethylphosphonat, die monoanionische Aryl- α -Ketocarbonsäure, die Aryl-substituierten Quadratsäuren [63], die Aryloxalamide, ungeladene Aryl-Trifluormethylsulfonyl und Aryltrifluormethylsulfonamido (Sugen), O-Malonyltyrosin (OMT), O-Carboxymethyl-3'-carboxytyrosin, 2-Hydroxy-2-aryl-2-trifluormethylelessigsäure-Derivate, Arylsulfaminsäure (Procter & Gamble), 1,2,5-Thiadiazolidin-3-on-1,1-dioxid-Derivate (Astra Zeneca, Incyte Corporation) und S-Isouthiazolidinon-Derivate (Incyte Corporation).

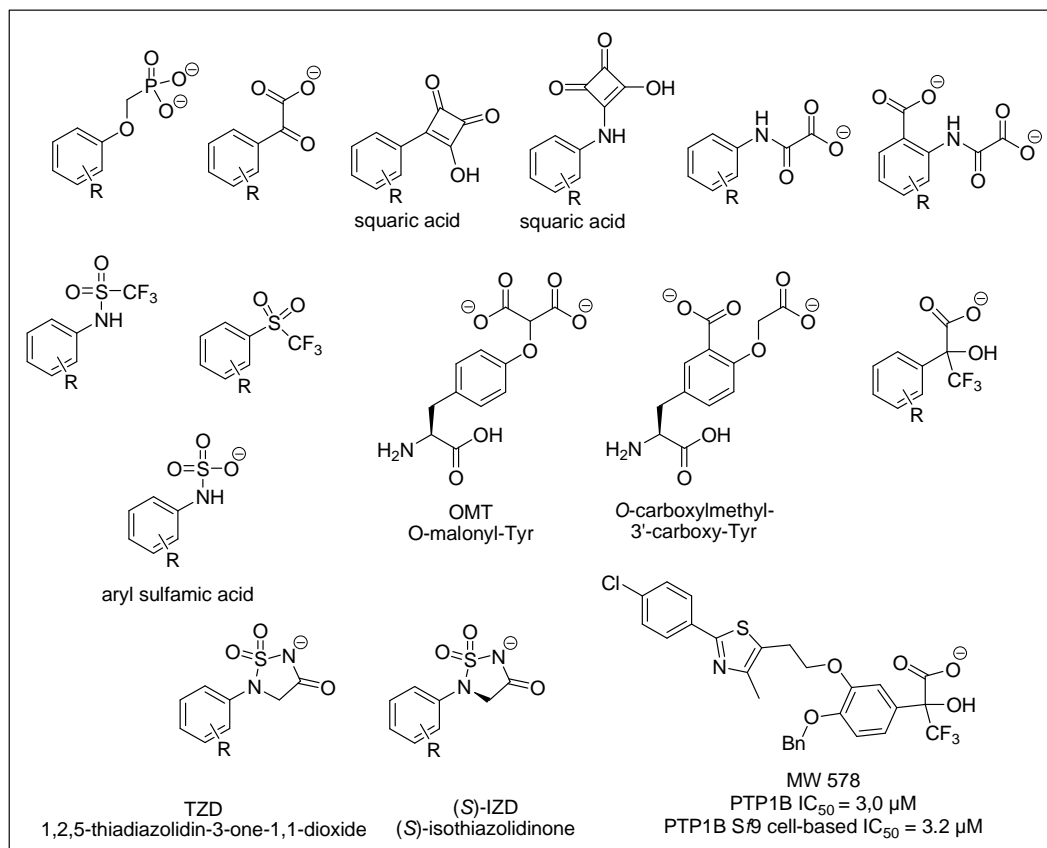


Abb. 30: Weitere pTyr Mimetika [62]

Da pTyr-Isostere alleine nur eine geringe Aktivität besitzen, werden sie z.B. in bekannte Peptidsequenzen wie das Hexapeptid Ac-DADE-X-L-NH₂ eingesetzt [61].

2.5.5 Peptidische PTP-Inhibitoren

Im Jahr 1994 zeigte Burke *et al.* die inhibitorische Aktivität eines Hexapeptids Asp-Ala-Asp-Glu-DFMP-Leu-NH₂ mit dem pTyr-Mimetikum DFMP [61]. Dieser Inhibitor besitzt einen IC₅₀-Wert von 0,2 µM gegen PTP1B.

Jedoch sind PTP-Inhibitoren, die auf peptidischen Strukturen beruhen, in der Regel schlechte Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung. Zum Einen wegen ihrem möglichen Abbau durch Proteasen und zum Anderen wegen ihrer schlechten Zellmembranpermeabilität.

2.5.6 Inhibitoren als Zweizentrenbinder am Beispiel von PTP1B

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der katalytischen Aktivtaschen der unterschiedlichen Protein-Tyrosin-Phosphatasen, stellt die Selektivität der PTP-Inhibitoren eine große Herausforderung dar. Als neuer Ansatz gilt hier die Entwicklung von sogenannten Zweizentrenbindern, die auf Arbeiten von Zhang *et al.* zurückgeht [64]. Sie entdeckten in der Nähe des katalytischen Zentrums von PTP1B eine zweite, nicht-katalytische Tasche, welches zusätzlich noch eine geringere Sequenzidentität innerhalb der Enzymklasse aufweist. Basierend auf den strukturbioologischen Untersuchungen kann man in diesem Fall annehmen, dass ein Inhibitor mit divalenten pTyr-Isosteren einen selektiveren Inhibitor darstellt, als vergleichsweise ein monovalenter Inhibitor.

2.5.7 Alternative Methoden für die Inhibition von PTPs

Weitere Möglichkeiten für die Inhibition von PTPs sind z.B. die Verwendung von zellpermeablen Peptiden, die Einführung von lipophilen Fettsäuren und die Entwicklung von sogenannten Prodrugs, die erst nach der Zellpenetration, also an ihrem Wirkungsort z.B. durch Abspaltung einer Schutzgruppe, die demaskierte, bindende Gruppe freisetzen. Boutselis *et al.* entwickelten eine Prodrug-Strategie für die intrazelluläre Freisetzung von pTyr-Mimetika (Abb. 31, links) [65]. Die Aktivierung der Prodrug generiert ein Difluoromethylphosphonamidat-Anion (Abb. 31 rechts, Verbindung A), das eine sofortige Zyklisierung und Hydrolyse eingeht (Abb. 31 rechts, Verbindung C und D). Die Halbwertszeit beträgt $t_{1/2} = 44$ min. Untersuchungen mit bekannten PTP1B-

Inhibitoren unter Verwendung dieser Strategie zeigten eine nanomolare Inhibition von PTP1B in zellulären Assays.

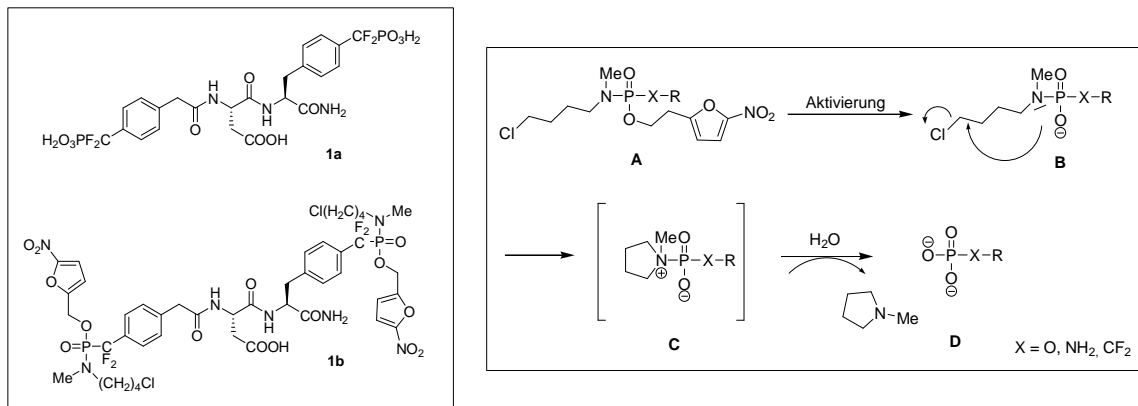


Abb. 31: Darstellung der Prodrug-Strategie mit Mechanismus [65]

2.5.8 Entwicklung von PTK-Inhibitoren im Vergleich

Im Vergleich zu den PTPs besitzen PTKs eine tiefe hydrophobe Tasche, die besser geeignet ist für die Entwicklung von bioverfügbaren, niedermolekularen Wirkstoffen. Daher ist die ATP-Bindungsstelle der Protein-Tyrosin-Kinasen weit aus besser erforscht und verstanden als die der Phosphatasen [66]. Vor dem Hintergrund des komplementären Verhaltens von PTKs und PTPs und dem Umstand, dass PTKs etablierte Angriffspunkte, sogenannte Targets, in der Wirkstoffsuche sind, erstaunt es, dass mit einer intensiveren Suche nach niedermolekularen Inhibitoren von PTPs erst seit einiger Zeit begonnen wurde [60]. Das Arzneimittel Glivec® (Abb. 32) von Novartis-Pharma, dessen Wirkstoff das Imatinib-Mesilat (STI-571) beinhaltet, ist seit Oktober 2001 für chronisch-myeloische Leukämie (CML) und seit Mai 2002 für Gastrointestinale Stromatumore (GIST) zugelassen. Diese Verbindung wurde der erste Signaltransduktions-Inhibitor, der hervorragende Effizienz für frühe CML in klinischen Studien zeigte [67] [68]. In 85 % der Fälle von CML ist die Ursache die Bcr-Abl-Tyrosinkinase, die wiederum durch ein mutiertes Chromosom, dem Philadelphia-Chromosom, entsteht. Dieses Chromosom ist ein Fusionsgen, das durch reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 gebildet wird. Imatinib hemmt selektiv diese Tyrosinkinase.

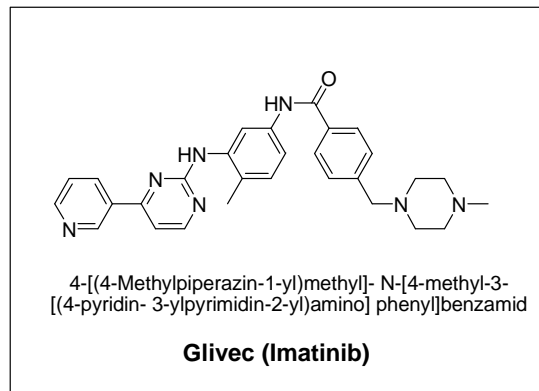


Abb. 32: Chemische Struktur von Glivec®

2.6 Methoden zur Wirkstoffentwicklung

Eine Möglichkeit zur Gewinnung von Wirkstoffen ist die Extraktion aus Naturstoffen. Zusätzlich wird diese Quelle durch synthetische Methoden unterstützt und erweitert. Durch die gestiegenen Ansprüche und Kosten in der Wirkstoffentwicklung haben sich im Bereich der Medizinischen Chemie verschiedene Methoden entwickelt, die Identifizierung von potentiellen Wirkstoff-Kandidaten ermöglichen [69].

Beim sogenannten Hochdurchsatz Screening (HTS) werden ganze Verbindungsbibliotheken auf ihre Eigenschaften untersucht (Abb. 33). Somit ist es möglich, durch ein etabliertes Assay-System schnell Informationen über die Verbindungen zu erzielen. Die Nachteile dieser Methode sind, dass die verwendete Bibliothek optimal für den Assay definiert sein muss und genügend diverse Grundstrukturen enthalten sein sollten. Zusätzlich kann die Verwendung von großen Substanzbibliotheken sowie deren Lagerung ein Problem darstellen.

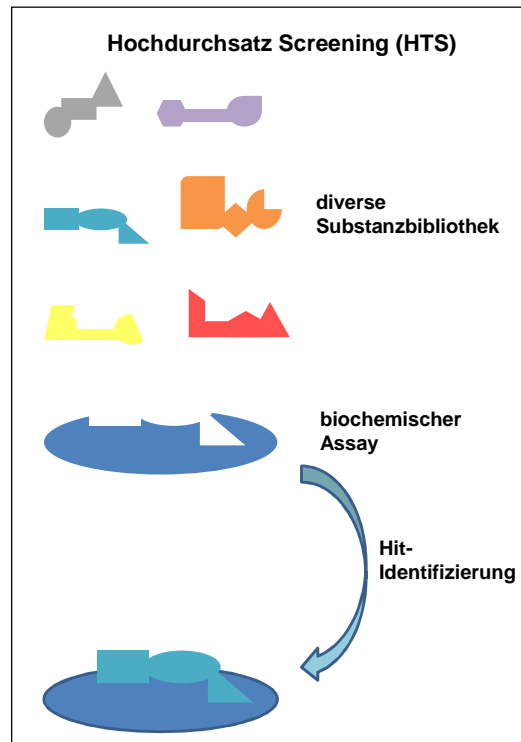


Abb. 33: Schematische Darstellung des Hochdurchsatz Screenings (HTS)

Ein alternativer Ansatz ist die fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung (Abb. 34). Sie arbeitet mit einer geringeren Anzahl von Verbindungen. Dabei wird zunächst ein niederaffiner Binder des zu untersuchenden Proteins identifiziert. Dieses Fragment wird nun chemisch optimiert bis man von einer Leitstruktur sprechen kann. Auftretende Schwierigkeiten hierbei sind die Bestimmung dieser niederaffinen Fragmente durch geeignete Messmethoden und die optimale Verknüpfung der einzelnen Teilverbindungen, um einen aktiven Wirkstoffkandidat zu generieren. Die verwendeten Methoden zur Identifizierung sind dabei die NMR-Spektroskopie, die Röntgenstrukturanalyse, die Oberflächenplasmonenresonanz und die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC). Allerdings führen diese Methoden zu einem hohen Proteinverbrauch, teure Ausstattung der Messgeräte und einen limitierten Durchsatz von Verbindungen.

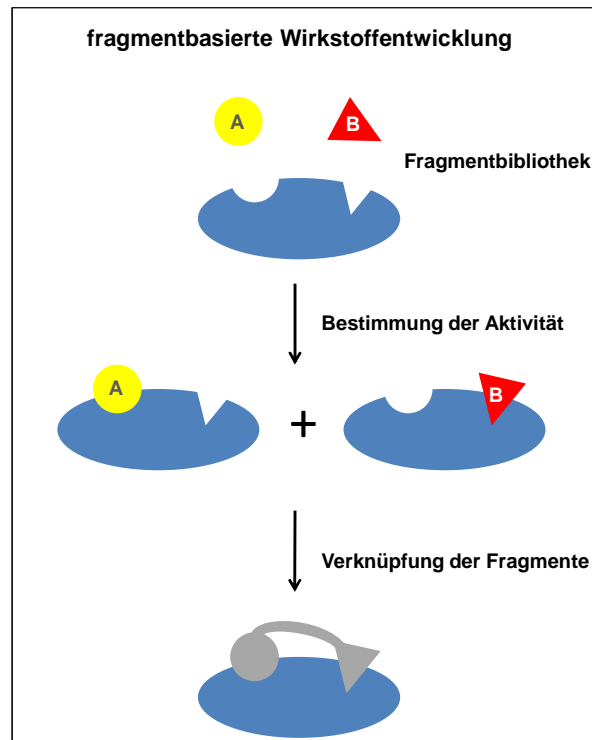
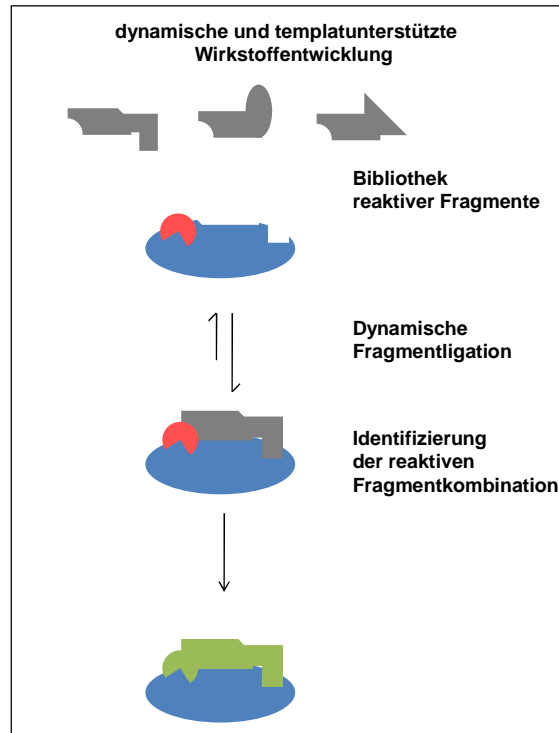


Abb. 34: Schematische Darstellung der fragmentbasierten Wirkstoffentwicklung

Eine Weiterentwicklung dieser fragmentbasierten Methode findet sich in den dynamischen und templatunterstützten Strategien wieder. Mit diesen neuen Ansätzen ist es möglich, die beste Zusammensetzung der einzelnen Fragmente durch Einsatz des Proteins als Templat zu identifizieren. Dabei spielen zwei Kriterien eine große Rolle. Die Menge des benötigten Proteins, d.h. stöchiometrisch oder katalytisch und die analytische Ausstattung, die für die Detektion erforderlich ist.

Einige der dynamischen- und templatunterstützten Strategien eignen sich für ein breites Feld von Proteinen, andere nur für Klassen oder sogar nur für spezifische Enzyme (Abb. 35).



**Abb. 35: Schematische Darstellung der dynamischen und templatunterstützten
Wirkstoffentwicklung**

Die dynamischen und templatunterstützten Strategien kann man noch in weitere Kategorien einteilen.

a) Dynamisch-kombinatorische Chemie (DCC)

Das chemische Gleichgewicht einer Reaktion soll durch die Anwesenheit des Proteins mittels des Templateffektes auf die Produktseite verschoben werden. Beim sogenannten Tethering, eine Spezialform von DCC, wird eine kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Protein eingegangen. Anschließend findet eine Entschützung einer reaktiven Gruppe am Inhibitor statt. Eine Bibliothek kann nun damit gescreent werden.

b) Dynamisch-kombinatorische Resolution (DCR)

Das katalytisch verwendete Protein wirkt als Selektor, d.h. nur bestimmte Kombinationen der Bibliothek werden irreversibel zum Produkt umgesetzt.

c) Pseudo-dynamisch-kombinatorische Chemie (pDCC)

Bei dieser Methode macht man sich den Effekt zu nutze, dass ein Abbau der Verbindungen durch die Stabilisierung des Templats, geschützt ist. Eine

Bibliothek wird mit einem Protein inkubiert und wird zusätzlich mit einem weiteren versetzt, welches die Moleküle spalten kann. Anschließend werden per LCMS die Spaltprodukte untersucht.

d) Rezeptor-vermittelte Synthese (TGS)

Hierbei wird die verwendete chemische Reaktion durch das templatkatalysiert. Es können reaktive Fragmente miteinander reagieren, die sich räumlich nah sind.

e) Substrataktivitätsscreen (SAS)

Diese Methode basiert auf einer Substratentwicklung. Die für ein Protein optimierten Substrate werden in entsprechende Derivate überführt, deren Wirkung als Inhibitoren anschließend untersucht wird.

f) Dynamischer Ligationsscreen (DLS)

Die zu untersuchenden Fragmente werden in Anwesenheit des Proteins mit Hilfe von klassischen Bioassays während der Reaktion beobachtet und ihre inhibitorische Aktivität bestimmt. Dabei handelt es sich um reaktive Spezies, die Kupplungsreaktionen eingehen können. Nach Bestimmung einer optimalen Kombination von Fragmenten wird dieser Hit chemisch synthetisiert und erneut getestet. Diese Methode wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Rademann entwickelt und erfolgreich am Beispiel bei der Entwicklung von Protease-Inhibitoren angewendet [70].

Desweiteren gibt es computerunterstützte Techniken in der Wirkstoffentwicklung, wie z.B. das sogenannte Virtual Screening. Bei diesem Ansatz ist eine relativ schnelle Untersuchung und Bewertung einer Bibliothek von Verbindungen *in silico* möglich, z.B. ob ein kleines Molekül an einen Proteinrezeptor bindet. Man unterscheidet hierbei zwischen einer Pharmakophor-Suche, bei denen Daten von bekannten Untersuchungen einfließen und daraus ein Modell entwickelt wird und der strukturbasierten Suche, bei dem z.B. ein kleines Molekül gedockt und anschließend die Ergebnisse bewertet werden, um eine Leitstruktur zu erhalten.

Für eine mögliche Hitoptimierung und anschließender Validierung bietet sich der Ansatz der kombinatorischen Chemie an. Mit ihrer Hilfe wird durch die Kombination und Variation verschiedener Reste an einem Grundgerüst eine Vielzahl von Derivaten des Grundgerüsts chemisch hergestellt.

3 ZIELSTELLUNGEN DER ARBEIT

Defekte oder fehlerhafte PTP-Aktivität wird mit der Entstehung von einigen humanen Krankheiten wie z.B. Krebs und Diabetes in Verbindung gebracht [49]. Demnach könnten selektive PTP-Inhibitoren als mögliche Therapeutika entwickelt und eingesetzt werden. Onkogene PTPs spielen eine kausale Rolle in der Krebsentstehung oder in der Metastasierung und könnten somit als Zielstruktur dienen, um die pathogene Aktivität zu blockieren [19]. Die bisherigen Untersuchungen weisen daraufhin, dass dieser Ansatz eine effektive und sichere Anti-Krebs-Therapie sein könnte.

Eine große Anzahl von Strategien zur Identifikation und Entwicklung von verschiedenen Klassen von Protein-Phosphatasen-Inhibitoren werden derzeit untersucht. Das Ergebnis ist eine Vielzahl von unterschiedlichen PTP-Inhibitoren. Aus Sicht der Medizinischen Chemie sind PTPs anspruchsvolle Targets, insbesondere stellen die Spezifität von Inhibitoren gegenüber anderen PTPs und ungünstige pharmakologische Eigenschaften, wie z.B. fehlende Zellpermeabilität, große Herausforderungen bei der Inhibitorentwicklung dar und sind somit ein Grund für fehlende weiterführende klinische Studien.

Aufgrund des Zusammenhangs von fehlerhaften Mechanismen der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 in der Signaltransduktion bei humanen Krankheiten wie Noonan- und LEOPARD-Syndrom, sowie JMML stellen aktive und selektive SHP-2-Inhibitoren einen guten Ansatz zur Therapie und Erforschung dieser Krankheiten dar. In dieser Arbeit sollen kleine Moleküle als aktive und selektive Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren entwickelt werden.

Eine durch virtuelles Screening mit Hilfe eines Homologiemodells der Kristallstruktur von SHP-2 identifizierte Hit war Ausgangspunkt für einen SHP-2-Inhibitor. Die Synthese dieser Leitstruktur sollte optimiert werden, um eine Bibliothek von Derivaten zu synthetisieren und darüber hinaus es zu ermöglichen, diese Verbindungen im Gramm-Maßstab herzustellen. Die synthetisierte Substanzbibliothek soll anschließend im Enzymassay und in verschiedenen Experimenten *in vitro* und *in vivo* auf ihre Aktivität und Selektivität in Bezug auf SHP-2 untersucht werden.

Zusätzlich stellt der fehlende adäquate Ersatz von pTyr in Leitstrukturen bei der Inhibitorentwicklung für PTPs gegenwärtig immer noch einen limitierenden Faktor dar. Daher sollten pTyr-Mimetika idealerweise ungeladene Strukturen sein, die trotzdem eine starke Wechselwirkung mit der positiv geladenen Aktivtasche der PTPs besitzen. In dieser Arbeit sollte durch eine fragmentbasierte Methode, dem Screening und der Synthese von Verbindungsbibliotheken geeignete Kandidaten für die Entwicklung von potentiellen PTP-Inhibitoren identifiziert werden. Dabei wird ein besonderer Fokus auf die Identifizierung von neuen pTyr-Mimetika gelegt. Darüber hinaus könnten Fragmente mit moderater Affinität gegenüber PTPs in entsprechende Derivate mit einer reaktiven Gruppe umgewandelt werden, um diese mit anderen reaktiven Fragmenten zu kombinieren. Auf diese Weise könnten zusätzlich neue Grundstrukturen für PTP-Inhibitoren entwickelt werden. Diese Entwicklungen sollten durch Dockingexperimente unterstützt werden.

Zusätzlich könnten Ergebnisse von den Untersuchungen der pTyr-Mimetika in das Projekt der SHP-2-Inhibitoren einfließen und geeignete Fragmente als pTyr-Mimetika in der entwickelten Grundstruktur des SHP-2-Inhibitors PHPS1 verwendet werden.

4 ENTWICKLUNG UND UNTERSUCHUNG FÜR INHIBITOREN DER PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASE SHP-2

4.1 Entwicklung eines Homologiemodells für SHP-2 und anschließende Identifizierung einer Leitstruktur

Zu Beginn des Projektes wurden aufgrund der fehlenden Kristallstruktur der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 in der aktiven Form Homologie-Modelle angefertigt und verfeinert. Das von Klaus Hellmuth (AG Prof. W. Birchmeier) in Zusammenarbeit mit Jens von Kries entwickelte Homologiemodell für die PTP-Domäne von SHP-2 basiert auf der Sequenzähnlichkeit zu PTP1B. Als Templat wurde die Kristallstruktur von PTP1B mit einem kompetitiven Inhibitor verwendet (RCSB Proteindatenbank: 1N6W) [71]. Eine virtuelle Substanzbibliothek mit 2,7 Millionen kommerziell erhältlichen Verbindungen wurde mit dem Programm MOE (Chemical Computing Group) von Klaus Hellmuth angelegt. Diese Verbindungen wurden mit Hilfe der speziellen Docking-Software GOLD (Cambridge Crystallographic Data Center) in die Substratbindetasche des Homologie-Modells gedockt. Für 2271 Verbindungen wurde eine Wechselwirkung mit der katalytischen Tasche vorhergesagt. Ausgehend von diesen virtuellen Hits wurden 60 kommerziell erhältliche Moleküle ausgewählt, um deren Aktivität *in vitro* zu testen. Mit Hilfe eines enzymatischen Assays wurden 20 Verbindungen gefunden, die bei einer Konzentration von 50 μM eine Hemmung der Enzymaktivität von mindestens 50 % zeigten. Die Verbindung Phenylhydrazonopyrazolonsulfonat **1** (PHPS1) (Abb. 36) wurde für weitere chemische Optimierungen ausgewählt [53].

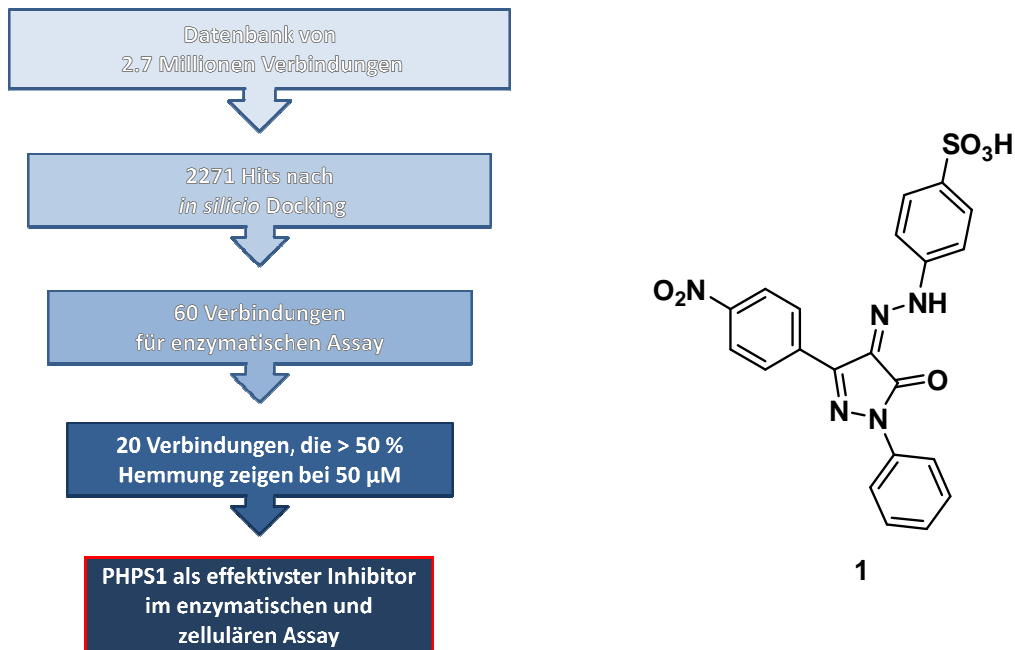


Abb. 36: Fließdiagramm: Identifizierung der Verbindung PHPS1 durch K. Hellmuth [53]

Das danach für diese Substanzklasse von mir entwickelte Synthesekonzept ermöglichte es, den im virtuellen Screening identifizierten Hit zu synthetisieren und zu validieren [72].

Das Homologiemodell von SHP-2 zeigt das Aktivzentrum als tiefe und enge Tasche in der nachfolgenden Darstellung.

Die Abbildung 37 illustriert die Oberfläche des Enzymmodells, dabei entspricht die Färbung dem elektrostatischen Potential, die positiv geladenen Bereiche sind blau gefärbt, die negativ geladenen rot. Auf der rechten Seite ist das Ergebnis des Dockingexperimentes dargestellt. Der Inhibitor PHPS1 ragt mit einem Rest in die katalytische Tasche des SHP-2-Modells.

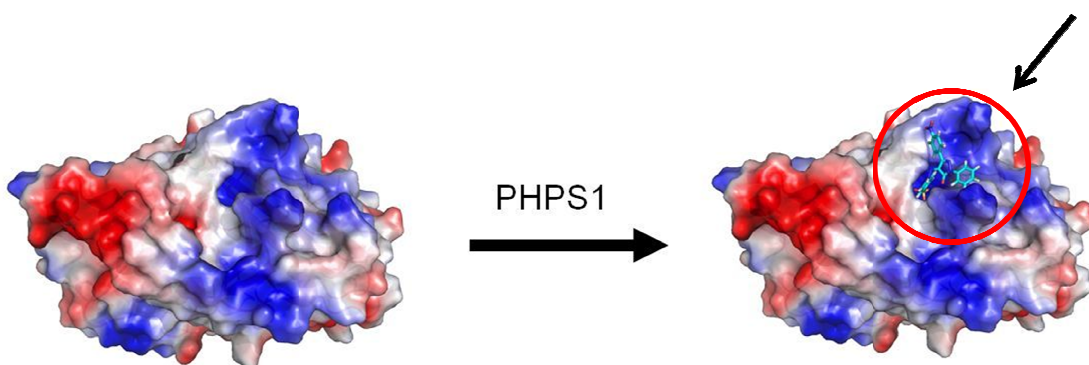


Abb. 37: Modellstruktur von SHP-2 ohne und mit dem Inhibitor PHPS1 1
(Oberflächendarstellung durch Pymol)

In der Abbildung 38 auf der linken Seite sieht man die Modellstruktur von SHP-2 in der Cartoon-Darstellung. Diese Darstellung von Enzymen verzichtet auf Detailinformationen und führt zu einer besseren Übersicht über die tatsächliche Struktur. Dabei steht die Farbe türkis für die α -Helices, rosa für die β -Faltblätter und braun für die β -Schleifen, die zumeist β -Faltblätter verbinden. Die Pfeile der β -Faltblätter zeigen die Parallelität bzw. Antiparallelität an. Die gefundene Verbindung PHPS1 zeigt auch hier in die katalytische Tasche und wechselwirkt dort mit den wichtigen Aminosäureresten. Dabei sind die Kohlenstoffatome grün, die Wasserstoffatome weiß, die Stickstoffatome blau, die Sauerstoffatome rot und die Schwefelatome gelb dargestellt.

Die genauere Wechselwirkung des Moleküls in der katalytischen Tasche kann man visualisieren, indem man den Inhibitor PHPS1 **1** in die katalytische Tasche des Modells dockt und die Ligandeninteraktion mit Hilfe des Programmes MOE anzeigen lässt (Abb. 38, rechts). Man sieht mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit der PTP-Schleife (Signaturschleife). Der aromatische Phenylring der Verbindung wechselwirkt mit der aromatischen Seitenkette vom Tyrosin 279 und Histidin 426 (π -Stacking). Wichtige Wasserstoffbrückenbindungen sind die von Asparagin 281 und Arginin 362 in der Peripherie der Bindungstasche. Die Sulfonsäuregruppe repräsentiert in diesem Fall das pTyr-Mimetikum, das die Aktivtasche adressiert und das auch als solches in der Literatur bekannt ist [11] [73]. Trotz der negativen Ladung der Gruppe gibt es Beispiele, die zeigen, dass eine Zellgängigkeit wie z.B. beim Suramin mit sechs Arylsulfonsäuregruppen durch einen aktiven Prozess gegeben ist [74].

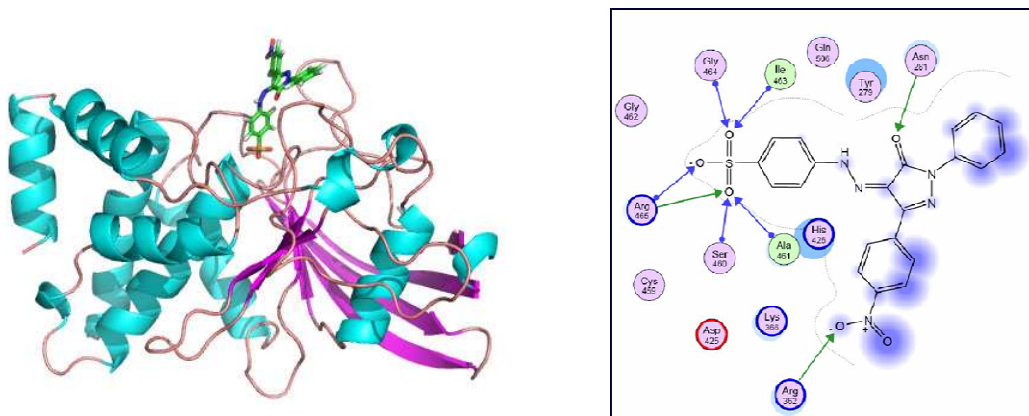


Abb. 38: Modellstruktur mit Inhibitor PHPS1 **1 (Cartoondarstellung) generiert durch Pymol und Ligandeninteraktion von PHPS1 **1** mit SHP-2 generiert durch MOE**

2009 gelang es der Gruppe um Stefan Knapp in Oxford, die Struktur von SHP-2 mit einem Malation in der Tasche zu lösen [75]. Die Kristallstruktur von SHP-2 in der aktiven Form wurde mit dem hier entwickelten Homologiemodell von SHP-2 verglichen (Abb. 39).

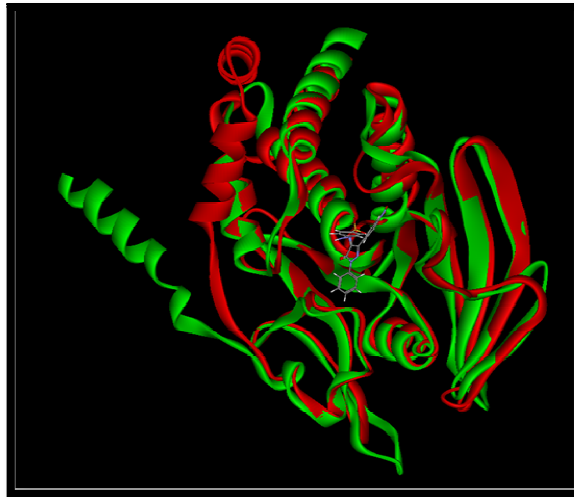


Abb. 39: Überlagerung Kristallstruktur und Modellstruktur von SHP-2

Die Überlagerung der gelösten Kristallstruktur mit der von Klaus Hellmuth entwickelten Modellstruktur von SHP-2, basierend auf PTP1B, zeigten weitgehend eine gute Übereinstimmung (Abb. 39). Dabei stellt die rote Struktur das Homologiemodell und grün die gelöste Kristallstruktur dar.

Es existieren jedoch drei Abweichungen. Als erstes fällt die unterschiedliche Orientierung der Helix auf der linken Seite auf. Die beruht darauf, dass bei der Modellstruktur von SHP-2 weitere Aminosäuren folgen, die die Konformation der Helix beeinflussen können. Der zweite Unterschied ist die Größe der Schleife im unteren Teil der Struktur. Bei der Modellstruktur fehlen hier einige Aminosäuren, da sich das Modell an PTP1B anlehnt, jedoch PTP1B an dieser Stelle weniger Aminosäuren besitzt. Die dritte Abweichung zeigt sich bei der WPD-Schleife. Die Kristallstruktur von SHP-2 zeigt die offene Form, da sich nur ein sehr kleines Molekül in der Tasche befindet. Für das Homologiemodell wurde jedoch PTP1B mit einem Inhibitor in der katalytischen Tasche verwendet und zeigt daher die geschlossene Konformation. Die WPD-Schleife nähert sich dabei der katalytischen Tasche.

4.2 Synthese und Syntheseoptimierung von SHP-2-Inhibitoren

Es konnte eine Strukturähnlichkeit mit dem künstlichen Lebensmittelfarbstoff Tartrazin (E 102) festgestellt werden (Abb. 40). Die zu den Azofarbstoffen gehörende Verbindung wird durch Diazotierung von Sulfanilsäure und Kupplung mit dem Pyrazolonderivat dargestellt. In der Regel wird Tartrazin als Natriumsalz verwendet. Der zitronengelbe bis orangefarbene Feststoff löst sich wenig in Wasser. Die Verbindung gilt als unbedenklich, jedoch kann es bei entsprechend veranlagten Menschen allergische Symptome auslösen (Pseudoallergie).

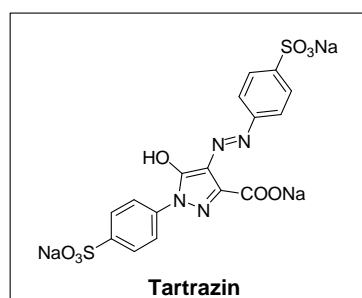


Abbildung 40: Chemische Struktur von Tartrazin

Bei der Synthese für die SHP-2-Inhibitoren wurde jedoch eine andere Methode verwendet. Die Synthesemethode für die identifizierte Leitstruktur **1** ermöglicht die Darstellung verschiedener Derivate auch im großen Maßstab [53] [72].

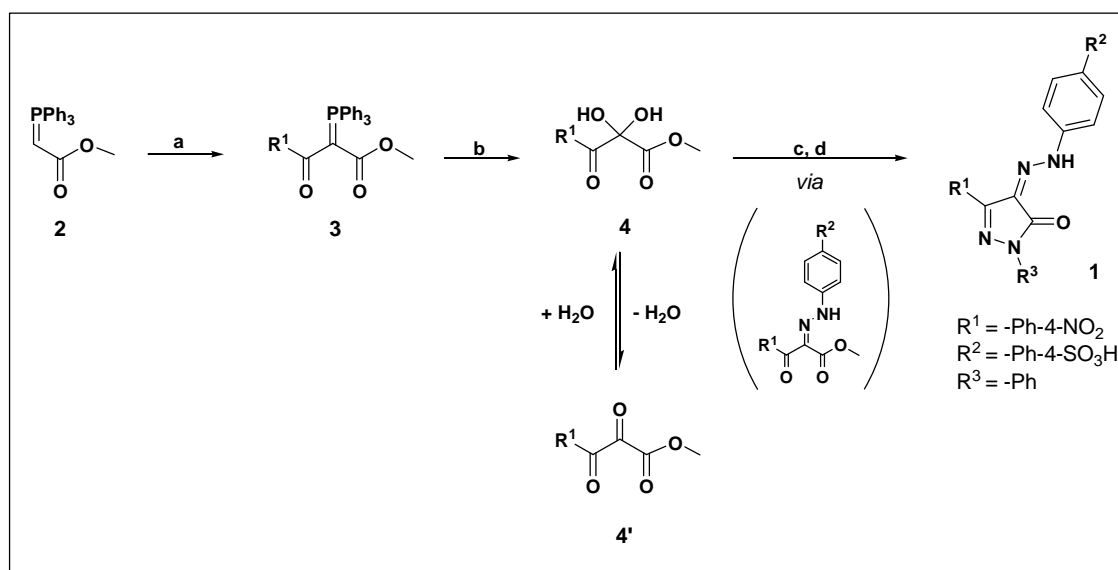


Abb. 41: Synthesekonzept zur Darstellung von PHPS1-Derivaten [72] [53]

(a): R¹COOH (1,2 eq), MSNT (1,2 eq), Lutidin (1,4 eq), DCM, RT, 16 h oder R¹COOCl (1,2 eq), Lutidin (1,4 eq), DCM, RT, 16 h. (b): DMDO in Aceton (3 eq), DCM, RT, 1h. (c): R²NHNH₂, HCl (kat.), 85 °C, 16 h. (d): R³NHNH₂, 85 °C, 16 h.

Die optimierte Synthese beinhaltet vier Schritte (Abb. 41): Der erste Schritt ist eine Acylierung unter basischen Bedingungen zum Ketophosphoranylid **3** (Schritt **a**). Der zweite Schritt ist eine oxidative Spaltung zur Darstellung vom 2,3-Diketoester **4** (Schritt **b**). Der dritte und vierte Schritt verlaufen in einer sogenannten Eintopf-Synthese. Zunächst wird unter Verwendung eines Hydrazinderivates das 2-Hydrason gebildet (Schritt **c**), welches anschließend ohne weitere Aufarbeitung *in situ* mit einem zweiten Hydrazinderivat unter Ringschluß zum 3-Aryl-4-Hydrasonopyrazol-5-on **1** reagiert (Schritt **d**). Mit Hilfe dieser Synthese wurde eine kleine Bibliothek von über 70 potentiellen Inhibitoren synthetisiert. Aufgrund des Synthesekonzeptes ergaben sich drei plausible Änderungen am Molekül. Auf diese Weise lassen sich unter Verwendung von verschiedenen Derivaten neue Reste einfügen, die mit der Aktivität des Startmoleküls verglichen werden können, um so eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) aufstellen zu können. Nachfolgend werden die einzelnen Reaktionsschritte der Synthese und deren Optimierung vorgestellt.

4.2.1 Darstellung der Ketophosphoranylide **3**

In der vorangegangenen Arbeit wurde die Acylierung nach Arbeiten von Weik *et al.* [76] und Wasserman *et al.* [77] modifiziert und durchgeführt. Hierbei diente Lutidin als Base, als Aktivierungsmittel wurde 1-(2-Mesitylenesulfonyl)-3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol (MSNT) verwendet. Als Edukt wurde die jeweilige Carbonsäure eingesetzt. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur bei einer Reaktionszeit von bis zu 16 Stunden statt. Die Ausbeuten lagen zwischen 50-90 %. Aufgrund des teuren Aktivierungsmittels und fehlender Reaktivität bei anderen, günstigeren Reagenzien, kann auch anstelle der Carbonsäure das entsprechende Säurechlorid verwendet werden. Hierbei waren keine Einbußen der Ausbeuten oder Reinheiten festzustellen, die Ausbeuten lagen hier zwischen 60-90 %.

Tabelle 1: Übersicht der Ketophosphoranylde mit einer Modifikation in der R¹-Position

Verbindung	R ¹
3a	-PH-4-NO ₂
3b	-Ph-3-NO ₂
3c	-Ph-4-Cl
3d	-Ph-4-CF ₃
3e	-Ph-4-SO ₂ F
3f	-Ph-4-SO ₂ NH ₂

4.2.2 Darstellung der 2,3-Diketoester 4

Für die oxidative Abspaltung wurde Dimethyldioxiran verwendet, welches ein effektives Reagenz für die selektive Umwandlung von Phosphoranyliden-Intermediaten zu den entsprechenden vicinalen Tricarbonylverbindungen darstellt und in der Arbeitsgruppe Rademann etabliert war [78] [79] [80]. Weitere bekannte Oxidationsmittel wie Singulett-Sauerstoff, Ozon oder Oxon benötigen viel härtere Reaktionsbedingungen [81] [82] [83] [84]. Im Vergleich dazu läuft die Reaktion mit DMDO bei geringeren Temperaturen, unter neutralen Bedingungen und ohne wässrige Aufarbeitung ab. Die Erzeugung von DMDO ist auch im größeren Maßstab möglich. Das jeweilige Ketoylid wird mit 3 Äquivalenten frischdestilliertem DMDO in Aceton bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktionszeit betrug eine bis wenige Stunden. Anschließend wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt, um das entstandene Triphenylphosphanoxid abzutrennen.

Aufgrund des hohen Synthesaufwands und der Anzahl der zu verwendenden drei Äquivalente vom DMDO wurden auch Untersuchungen zur *in situ* DMDO-Erzeugung durchgeführt. Das zu spaltende Edukt wird zusammen mit einem Gemisch aus Acetonitril und wässriger NaHCO₃ gelöst [85]. Dazu werden Aceton und eine EDTA-Lösung mit Oxon getropft. Es konnte bei dieser Variante jedoch kein Produkt identifiziert werden.

Tabelle 2: Übersicht der 2,3-Diketoester mit einer Modifikation in der R¹-Position

Verbindung	R ¹
4a	-Ph-4-NO ₂
4b	-Ph-3-NO ₂
4c	-Ph-4-Cl
4d	-Ph-4-CF ₃
4e	-Ph-4-SO ₂ F
4f	-Ph-4-SO ₂ NH ₂

4.2.3 Darstellung der 3-Aryl-4-Hydrasonopyrazol-5-onen **1** via der 2-Hydrasonderivate

Die Synthese der 2-Hydrasonderivate basiert auf den Arbeiten von Svenstrup *et al.* [86]. Die entsprechende Tricarbonylverbindung wurde in Ethanol gelöst, mit einer katalytischen Menge an Salzsäure versetzt und anschließend mit dem jeweiligen Hydrazin über Nacht bei 80 °C Rückfluß erhitzt. Untersuchungen dieser Reaktion zeigten, dass bei einem geringen Überschuß (1,2 eq) des eingesetzten Hydrazinderivates die Produktbildung des gewünschten Hydrasonderivates eindeutig favorisiert war und nicht weiter zum entsprechenden Pyrazolon reagierte bzw. nicht zuerst der Ringschluß zum Pyrazolon erfolgte. Außerdem wird vorwiegend das Z-Isomer gebildet. Die Anordnung dieses Strukturisomers wird durch die Wechselwirkung des Wasserstoffatoms des Hydrason-Linkers mit dem Sauerstoffatom des Esters (Vorstufe) bzw. dem Sauerstoffatom des Pyrazolons begünstigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Hydrazinderivate für die R²-Position waren alle kommerziell erwerblich.

Um die Anwesenheit der Salzsäure zu vermeiden und die Reaktionszeit zu erhöhen, wurde die Synthese in Anwesenheit von Molsieb durchgeführt, jedoch mit schlechteren Ausbeuten.

Im weiteren Verlauf der Syntheseentwicklung wurde dieser Reaktionsschritt nicht mehr aufgearbeitet, sondern direkt in einer Eintopf-Synthese zum entsprechenden Pyrazolon umgesetzt. Nach Untersuchung der vollständigen Umsetzung der Tricarbonylverbindung zum entsprechenden Hydrason durch

LC/MS-Kontrolle wurde das benötigte zweite Hydrazin für die R³-Position ohne weitere Reagenzien zur Reaktionsmischung dazugegeben. Nach Beendigung der Reaktionszeit fiel das gewünschte Produkt überwiegend aus der Ethanol-Lösung aus.

Tabelle 3: Übersicht der 3-Aryl-4-Hydrazonopyrazol-5-onen mit einer Modifikation in der R¹- und R²-Position

Verbindung	R ¹	R ²	R ³
1	-Ph-4-NO ₂	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
5	-Ph-3-NO ₂	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
6	-Ph-4-Cl	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
7	-Ph-4-CF ₃	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
8	-Ph-4-SO ₂ F	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
9	-Ph-4-SO ₂ NH ₂	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
10	-PH-4-NO ₂	-Ph-4-OCF ₃	-Ph
11	-PH-4-NO ₂	-Ph-4-SO ₂ CF ₃	-Ph

Zusätzlich zu den kommerziell erhältlichen Hydrazinen wurden für die Verwendung in der R³-Position Hydrazinderivate synthetisiert. Nachfolgend wird exemplarisch die Synthese des Hydrazinderivates **16** vorgestellt, das anschließend zur Synthese des Pyrazolonderivates **18** verwendet wurde (Abb. 42).

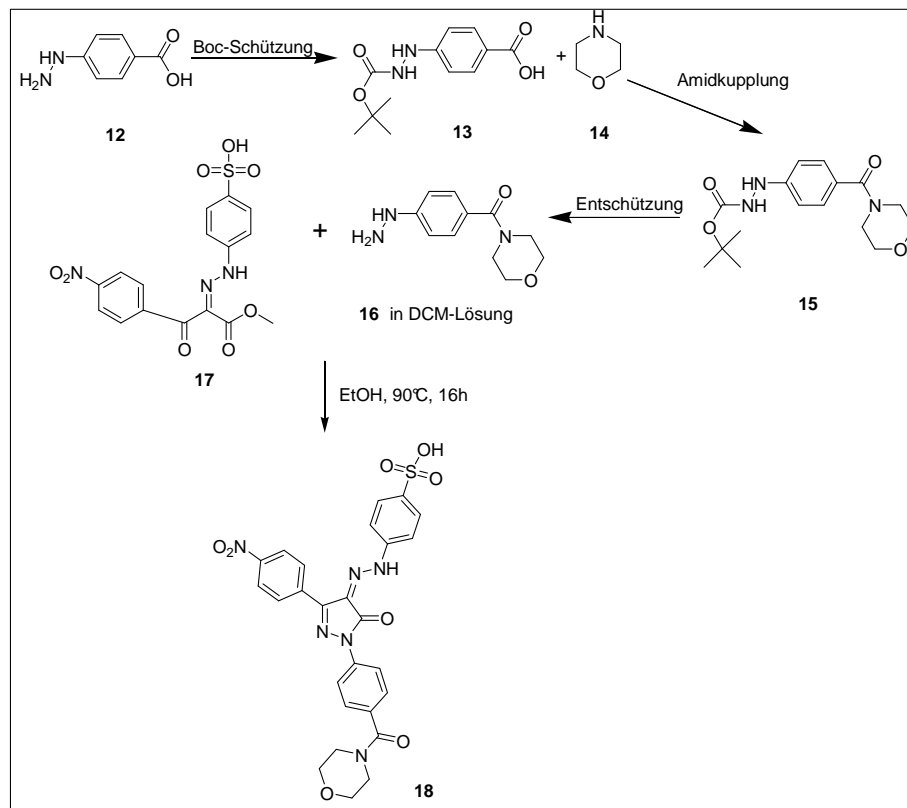


Abb. 42: Darstellung des Pyrazolonderivates 18 in situ via des Hydrazinderivates 16

Der erste Reaktionsschritt ist die Boc-Schützung der Hydrazingruppe. Das Hydrazin **12** wird in Dioxan und Na_2CO_3 -Lösung mit anschließender Zugabe von Boc-Anhydrid dargestellt. Nach saurem Waschen wird mit Ethylacetat extrahiert [87]. Der zweite Reaktionsschritt ist eine Amidkupplung mit EDC/DMAP und dem Morpholin **14**. Der dritte Reaktionsschritt ist die Boc-Abspaltung mit DCM/TFA (6:1). Die Lösung mit dem entschützten Hydrazin **16** wird zum Hydrazon **17** hinzugegeben und zum entsprechenden Pyrazolon **18** umgesetzt.

4.3 Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung von SHP-2-Inhibitoren

Diese Synthesestrategie wurde soweit optimiert, dass es möglich ist, schnell und effizient eine Bibliothek von über 70 Substanzderivaten auf Basis der Leitstruktur darzustellen. PHPS1 ist ein guter Startpunkt um potentielle SHP-2-Inhibitoren zu entwickeln und zu optimieren.

Die Leitstruktur des SHP-2-Inhibitors PHPs1 weist drei Reste zur möglichen Modifikation auf (Abb. 43).

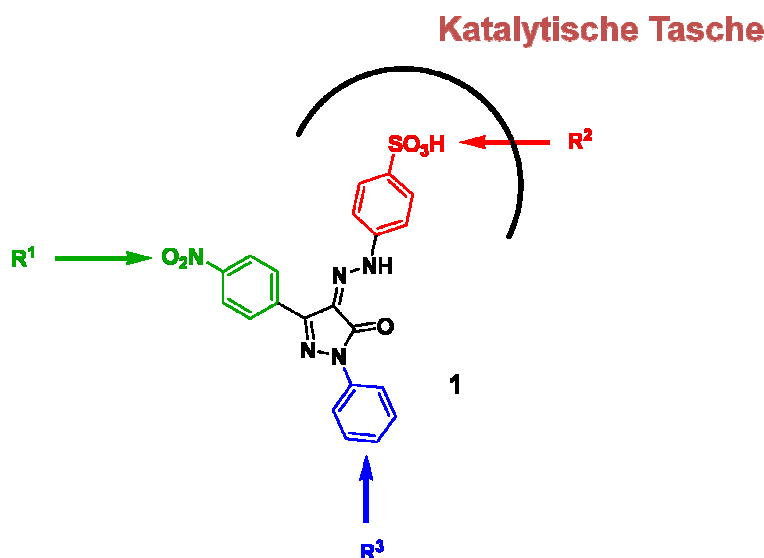


Abb. 43: Übersicht über die Modifikation der Reste

Für die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurden die synthetisierten Verbindungen im Enzym-Assay getestet. Hierfür wurde der IC₅₀-Wert der Inhibitoren bestimmt, die Konzentration eines Inhibitors bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Es werden aufgrund der Übersichtlichkeit nur repräsentative Beispiele aus der Verbindungsbibliothek gezeigt und diskutiert.

Für die Untersuchung der synthetisierten Verbindungen wurden die Feststoffe in DMSO gelöst. Diese Stammlösungen zeigten bei einer Lagerung bei 4 °C über einen Zeitraum von einigen Monaten keine Zersetzungsprodukte.

Es existieren zwei Arten von primären Assays für Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Zum Einen kann man die Phosphatfreisetzung während der Substrathydrolyse detektieren z.B. durch die Bildung eines Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplexes [88]. Zum Anderen kann man die Änderung der Eigenschaften des verwendeten Substrates unter Phosphathydrolyse untersuchen (z.B. mit pNPP und DiFMUP) [62] [89].

Der hier verwendete Assay-Typ gehört zu der zweiten Art, da die verwendeten Substrate durch die Enzyme dephosphoryliert werden. Diese Reaktion kann detektiert werden, um so die Geschwindigkeit der Reaktion zu bestimmen.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Substrate für den Phosphatase-Assay verwendet. Zunächst handelt es sich um das häufig verwendete *para*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP). Hierbei wird die Enzymaktivität durch die Messung der Lichtabsorption detektiert. Dabei wird die Dephosphorylierung von *p*NPP zum detektierbaren gelben *para*-Nitrophenolat (*p*NP) bestimmt (Abb. 44). Die Absorptionsmessung wird bei 405 nm durchgeführt.

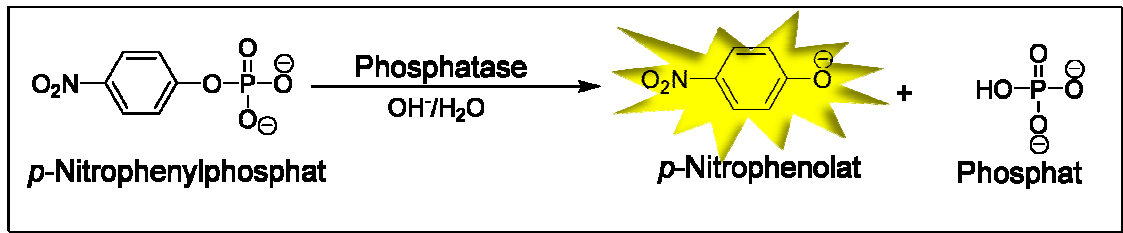


Abb. 44: Mechanismus vom *p*NPP-Assay

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde das Substrat DiFMUP (6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferylphosphat) im Phosphatase-Assay eingesetzt (Abb. 45). Der Vorteil bei diesem Substrat ist die geringere Konzentration, die man im Assay verwenden muss. Beim *p*NPP liegt es im millimolaren Konzentrationsbereich, im Gegensatz dazu verwendet man DiFMUP im mikromolaren Bereich. Bei diesem Substrat regt man bei 358 nm an und misst die Fluoreszenz des Produktes DiFMU bei 455 nm, das bei der Spaltung von DiFMUP entsteht.

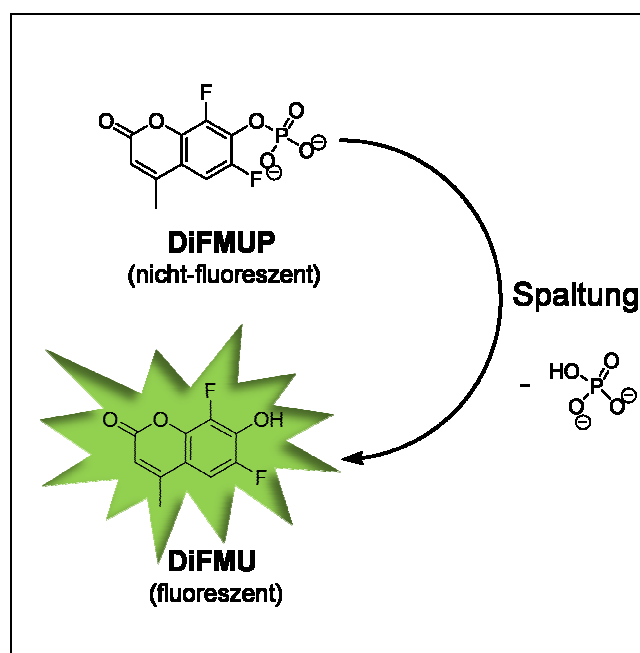


Abb. 45: Mechanismus vom DiFMUP-Assay

Die dabei verwendeten Enzyme wurden mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS Page) und einem anschließenden Westernblot auf ihre Reinheit geprüft. Eine vollständige Denaturierung von Proteinen und gleichzeitige Reduktion der intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken wird in Anwesenheit des Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol und des Tensids SDS erreicht. Darüber hinaus maskiert SDS die Ladung des Proteins, so dass die Trennung bei Anlegen einer Spannung ausschließlich anhand der Molekülgröße erfolgt.

Bei den Enzymproben handelt es sich um das gekaufte SHP-2 in der vollen Länge (Enzo Life Sciences), die katalytische Domäne und die SHP-2-Mutante E76K (beide bereitgestellt von Kerstin Böhm, AG Prof. Heinemann).

Die Abbildung 46 zeigt den Westernblot mit den drei Proteinproben von SHP-2. Zur Bestimmung der jeweiligen Masse wurde ein bekannter Marker verwendet. Die Mutante E76K besitzt die Aminosäuresequenz AS1-AS541 mit der Masse 62,2 kDa, d.h. die Glutaminsäure wurde gegen Lysin ausgetauscht. Die katalytische Domäne hat die Aminosäuresequenz von AS248-AS527 und somit eine Masse von 35,7 kDa. SHP-2 in der vollen Länge besitzt die Sequenz von AS1-593 und eine Masse von 68,5 kDa. Die untersuchten Enzymproben weisen die jeweils korrekte Masse auf. Bei den nachfolgenden Enzymassays wurden die katalytische Domäne und die Mutante E76K von SHP-2 verwendet.

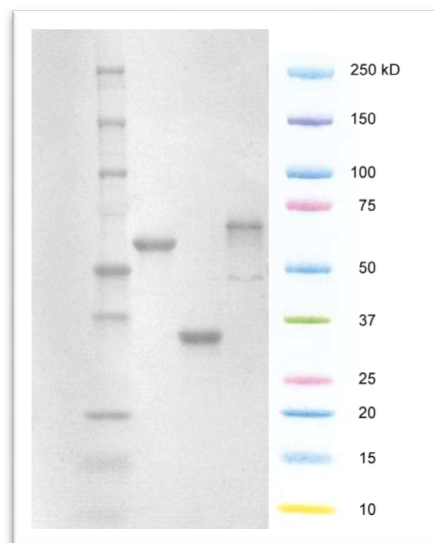


Abb. 46: SHP-2 in der vollen Länge, der katalytischen Domäne und der Mutante E76K

4.3.1 Derivate mit Modifikation des R¹-Restes

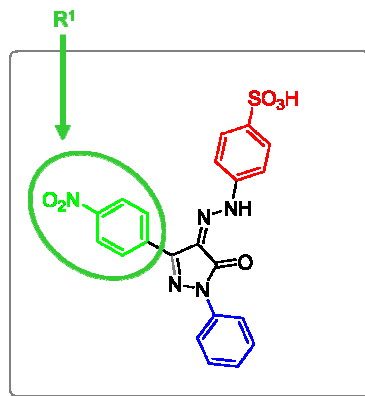


Abb. 47: Modifikation der Leitstruktur am R¹-Rest (grün dargestellt)

Der R¹-Rest (Abb. 47, grün dargestellt) ist in der Leitstruktur ein 4-Nitrophenylrest. Laut der vorhergesagten Wechselwirkungen in der Aktivtasche soll dieser Rest mit dem Arginin 362 in der Peripherie interagieren. Die Ergebnisse der Modifikation des R¹-Restes sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Modifikation des R¹-Restes

Verbindung	R ¹	IC ₅₀ SHP-2 [μM]
1 (PHPS)	-Ph-4-NO ₂	3 ^b
5	-Ph-3-NO ₂	24 ^a
6	-Ph-4-Cl	34 ^a
7	-Ph-4-CF ₃	> 500 ^a
8	-Ph-4-SO ₂ F	> 500 ^a
9	-Ph-4-SO ₂ NH ₂	5 ^a

a: Bestimmung der IC₅₀-Werte im pNPP-Assay

b: Bestimmung der IC₅₀-Werte im DiFMUP-Assay

Man kann erkennen, dass eine Änderung zum 3-NO₂-Rest eine 8-fache Verschlechterung zur Folge hat. Die Einführung von Halogenen in 4-Position mindert die Aktivität erheblich. Nur die Einführung der Sulfonamid-Gruppe zeigt eine vergleichbare inhibitorische Wirkung. Die Aktivitätsabnahme der Derivate verdeutlicht die wichtige Rolle der Nitrogruppe in 4-Position.

4.3.2 Derivate mit Modifikation des R²-Restes

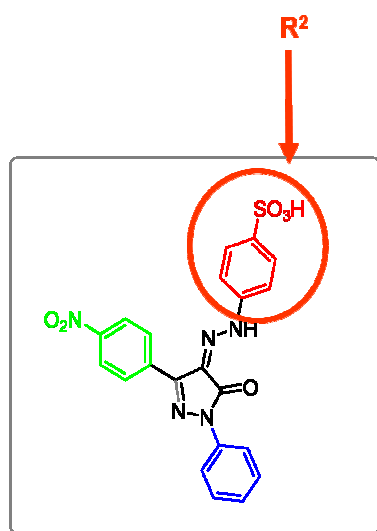


Abb. 48: Modifikation der Leitstruktur am R²-Rest (rot dargestellt)

Die R²-Gruppe (Abb. 48, rot dargestellt) repräsentiert bei diesem Molekül das pTyr-Mimetikum, das die Aktivtasche des Enzymes adressiert. Die Sulfonsäuregruppe am Phenylring wurde hier durch Reste ersetzt, wie z.B. die Trifluormethylgruppe, die Trifluormethylsulfonylgruppe, die Carboxygruppe, die Sulfonamidgruppe, sowie am Phenylring substituierte Phenylsulfonsäure (Tabelle 5).

Tabelle 5: Modifikation des R²-Restes

Verbindung	R ²	IC ₅₀ SHP-2 [μM]
1 (PHPS1)	-Ph-4-SO ₃ H	3 ^{a,b}
10	-Ph-4-OCF ₃	> 500 ^a
11	-Ph-4-SO ₂ CF ₃	> 500 ^a
19	-Ph-4-COOH	21 ^a
20	-Ph-4-SO ₂ NH ₂	5 ^a
21	-Ph-2-Cl-4-SO ₃ H	7 ^b
22	-Ph-2,5-Dichlor-4-SO ₃ H	4 ^b

a: Bestimmung der IC₅₀-Werte im pNPP-Assay

b: Bestimmung der IC₅₀-Werte im DiFMUP-Assay

Eine Einführung der Trifluormethoxy- und der Trifluormethylsulfonyl-Gruppe führten zu einem Aktivitätsverlust ($> 500 \mu\text{M}$). Die Substitution des Sulfonsäurerestes durch Sulfonamid oder Carboxylat führte zu einer Aktivitätsminderung im Enzymassay. Zusätzlich zeigten diese Derivate keine zelluläre Aktivität wie z.B. bei der HGF/SF-induzierten Zelldissoziation. Die Einführung eines Chloratoms am Phenylring, um weitere Wechselwirkung in der katalytischen Tasche zu erlangen, führte zu keiner Aktivitätssteigerung. Aufgrund ihrer Ladung ist die Sulfonsäuregruppe nicht optimal für die Zellgängigkeit. Allerdings scheint sie einen hohen Beitrag zur besseren Löslichkeit zu leisten. Die Untersuchung des R^2 -Restes ergab, dass die Substitution mit den hier vorgestellten Resten keine Alternative bietet.

4.3.3 Derivate mit Modifikation des R^3 -Restes

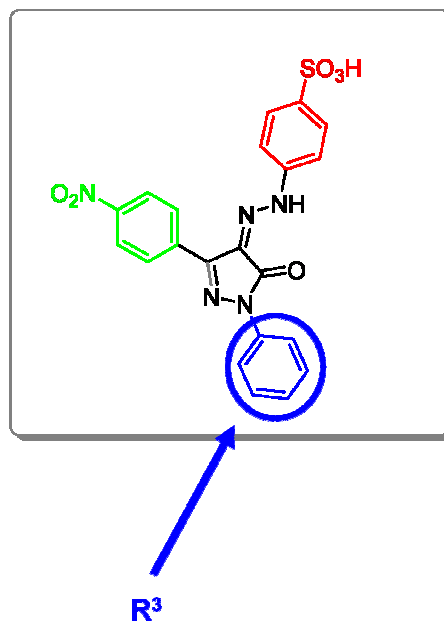
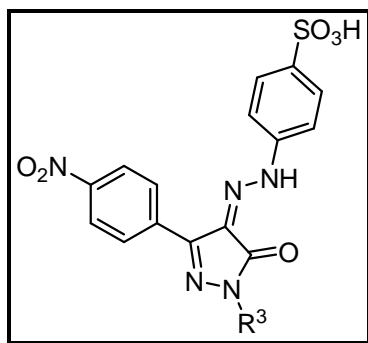


Abb. 49: Modifikation der Leitstruktur am R^3 -Rest (blau dargestellt)

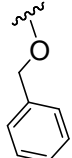
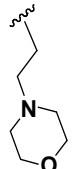
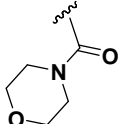
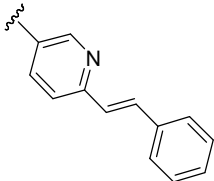
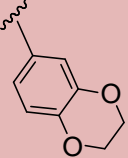
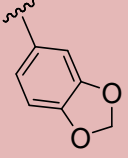
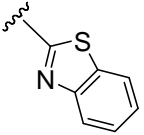
Der R^3 -Rest (Abb. 49, blau dargestellt) der Leitstruktur ist der Teil der Verbindung, der laut der Vorhersage des Docking-Experimentes in die Peripherie ragt und somit den größten Raum beanspruchen kann. Deswegen eignet sich diese Seite dazu, größere Reste einzufügen, die zusätzliche Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, außerhalb der Aktivtasche des Enzyms SHP-2 aufbauen könnten. Dementsprechend sind sterisch anspruchsvolle Substituenten mit Akzeptoreigenschaften für

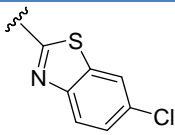
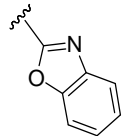
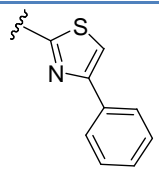
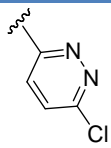
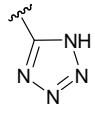
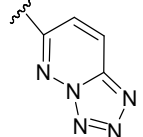
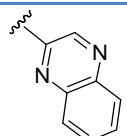
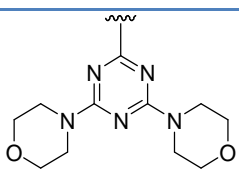
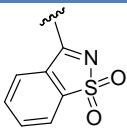
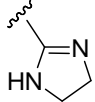
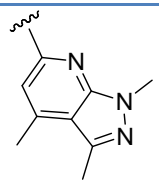
Wasserstoffbrückenbindungen gewünscht. Darüber hinaus wurden hier Reste untersucht, die die Löslichkeit erhöhen sollen. Es wurden Substituenten eingeführt um die Bedeutung des Phenylringes zu untersuchen. Zunächst wurde ein Austausch mit einem Cyclohexylrest analysiert, weiterhin geringe Veränderungen wie die Einführung von Methyl- oder *tert*-Butylgruppen. Auch die Einführung von Halogenen wie Chlorid-, Bromid oder Trifluormethylgruppen in verschiedenen Positionen und Mehrfach-Substitutionen wurden durchgeführt. Anschließend wurden verschiedene Heterozyklenreste wie Benzothiazol-, Benzoxazol-, Pyridazin-, Chinoxalin-, Tetrazolgruppen eingeführt. Nachfolgend sind die Aktivitäten einer Auswahl von Derivaten dargestellt (Tabelle 6).

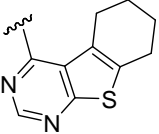
Tabelle 6: Modifikation des R³-Restes



Verbindung	R ³	IC ₅₀ SHP-2 [μM]
1 (PHPS1)	-Ph	3 ^{a,b}
23	-C ₆ H ₁₁	100 ^b
24	-Ph-4-Me	4 ^b
25	-Ph-4-Isopropyl	39 ^b
26	-Ph-4- <i>t</i> -Butyl	2 ^b
27	-Benzyl	29 ^b
28	-Benzyl-3-Hydroxyl	8 ^b
29	-Ph-4-COOEt	0,6 ^a
30	-Ph-4-COOH	67 ^a
31	-Ph-OMe	2 ^b
32	-Ph-2-Et	38 ^b
33	-Ph-4-Cl	0,9 ^b
34	-Ph-2-Cl	> 500 ^a

35	-Ph-3-Cl	8 ^b
36	-Ph-4-CF ₃	3 ^a
37	-Ph-4-Br	51 ^b
38	-Ph-3-Br	10 ^b
39	-Ph-4-NO ₂	0,08^b
40	-Ph-3,4-Dichlor	2 ^b
41	-Ph-3-Cl-4-OMe	2 ^b
42	-Ph-3,4-Dimethoxy	13 ^b
43	-Ph-2-CF ₃ -3-Cl-5-Cl	6 ^b
44	-Ph-Pentafluorid	7 ^b
45		9 ^b
46		23 ^b
47		16 ^a
48		1 ^b
49		0,6^b
50		0,3^b
51		1 ^b

52		3 ^b
53		38 ^b
54		23 ^b
55		31 ^b
56		17 ^b
57		2 ^b
58		2 ^b
59		43 ^b
60		11 ^b
61		19 ^b
62		3 ^b

63		18 ^b
----	---	-----------------

a: Bestimmung der IC₅₀-Werte im pNPP-Assay

b: Bestimmung der IC₅₀-Werte im DiFMUP-Assay

Von den 41 untersuchten Verbindungen, die auf der Leitstruktur **PHPS1 1** basieren und in der R³-Position modifiziert sind, zeigten 34 Verbindungen inhibitorische Aktivitäten im mikromolaren Bereich im Enzymassay, die Verbindungen **29**, **33**, **39**, **49** und **50** besitzen sogar einen IC₅₀-Wert von 0,08-0,9 µM. Nur die Verbindung **41** verliert durch die Modifikation der Struktur die gesamte Aktivität im Enzymassay.

Die Einführung des Cyclohexylrestes (**23**) führte zu einer 30-fachen, beim Cumolrest (**25**) zu einer 13-fachen Verschlechterung. Verglichen damit zeigte die Substitution mit einem Toluol (**24**)- oder *tert*-Butylrestes (**26**) gleiche Aktivität wie bei der Leitstruktur (4 und 2 µM). Die Verlängerung des Restes durch eine Benzylgruppe (**27**) minderte den IC₅₀-Wert um das Zehnfache und liegt bei 29 µM. Die Einführung der Esterfunktion zeigte eine 5-fache Erhöhung der Aktivität (**29**). Die entsprechende Verbindung mit Säurefunktion (**30**) hat im Vergleich geringe Aktivität (67 µM) und ist somit hundertfach schwächer. Die Einfachsubstitution mit einem Chloratom in *para*-Position (**33**) zeigte eine Verbesserung der Aktivität auf 0,9 µM, in *ortho*-Position (**34**) zeigte sie keine Aktivität und in *meta*-Position (**35**) eine Aktivität von 8 µM. Die Einführung der Trifluormethylgruppe (**36**) führte zu keiner Erhöhung der inhibitorischen Aktivität (3 µM). Mehrfachsubstitutionen wie 3,4-Dichlor- (**40**), 3-Chloro,4-Methoxy- (**41**) und Pentafluorphenylreste (**44**) zeigten keine Verminderung des IC₅₀-Wertes. Die Einführung von Benzothiazolen (**51**) verbesserte die Aktivität geringfügig auf 1 µM. Die Benzoxazol-Gruppe (**53**) führte zu einer 13-fachen Verschlechterung. Stickstoffhaltige Heterozyklen wie Pyridazine (**55**) und Tetrazole (**57**) beeinflussten die Aktivität der Verbindungen negativ mit einer 10- bzw. 6-fachen Verschlechterung des IC₅₀-Wertes.

Die Verbindung **57** besitzt einen Tetrazolrest, die Verbindung **60** trägt einen 1,2-Benzothiazol-1,1-dioxid-Rest. Beide Substitutionen sind auch als pTyr-Mimetika bekannt und können somit auch mit dem R³-Rest in der Tasche wechselwirken

[90] [91]. Das stellt eine Konkurrenzwechselwirkung zum R²-Rest dar und ist nicht erwünscht, deswegen werden diese Verbindungen nicht weiterverfolgt.

Bei der Evaluierung der potentiellen SHP-2-Inhibitoren konnten drei Verbindungen identifiziert werden, die bisher die höchste Hemmung der Enzymaktivität im DiFMUP-Assay zeigten (Abb. 50). Es handelt sich dabei um die Verbindung **39** mit einem *para*-Nitro-, die Verbindung **49** mit einem Dihydrobenzodioxin- und die Verbindung **50** mit einem Benzodioxol- Rest.

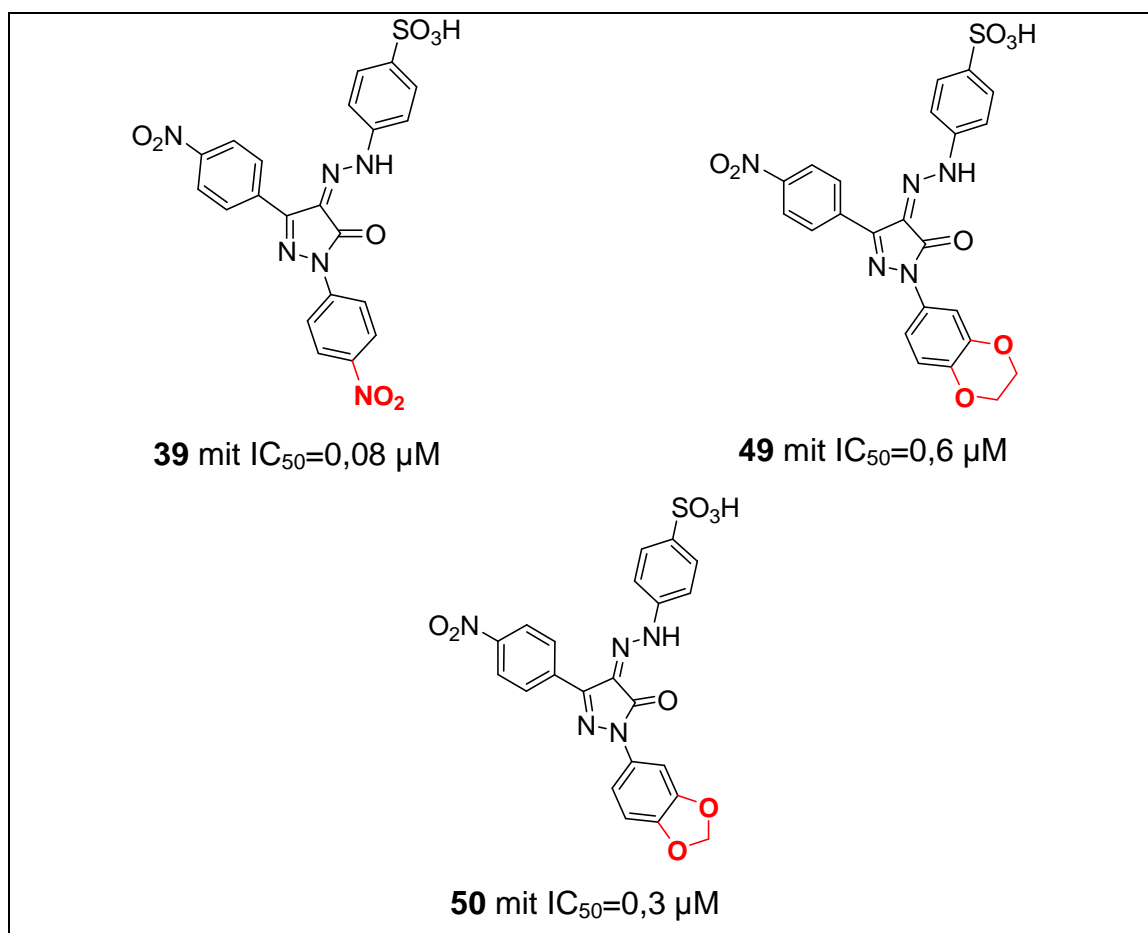


Abbildung 50: Die drei aktivsten SHP-2-Inhibitoren **39**, **49** und **50**

Die IC₅₀-Werte der SHP-2-Inhibitoren liegen alle im nanomolaren Bereich für **49** bei 0,6 μM, für **50** bei 0,3 μM und für **39** sogar bei 0,08 μM. Bei den anschließenden Zellexperimenten (*Kapitel 4.6*) wurden hauptsächlich diese drei Inhibitoren verwendet, da ihre Enzymaktivitäten im nanomolaren Bereich im Enzym-Assay auf ein höheres Potential in den Zellexperimenten hinweisen.

4.4 *Selektivität der SHP-2-Inhibitoren gegenüber anderen Protein-Tyrosin-Phosphatasen*

Ausgesuchte Verbindungen wurden gegen SHP-2-verwandte Phosphatasen wie SHP-1, PTP1B und MptpA im DiFMUP-Assay getestet um die Selektivität zu analysieren.

Tabelle 7: IC₅₀-Werte der Verbindungen gegen 4 verschiedene PTPs

Verbindung	IC ₅₀ SHP-2 [μM]	IC ₅₀ SHP-1 [μM]	IC ₅₀ PTP1B [μM]	IC ₅₀ MptpA [μM]
9	8	9	> 500	> 500
31	2	5	4	5
41	2	4	9	10
45	9	12	214	86
51	1	3	3	6
25	39	18	142	nicht getestet
26	2	3	36	nicht getestet
27	29	26	> 500	nicht getestet
28	8	11	213	nicht getestet
32	38	44	> 500	nicht getestet
48	0,6	0,8	2,7	nicht getestet
52	3	1,5	5	nicht getestet
56	17	15	177	nicht getestet
57	2	1,7	15	nicht getestet
58	2	3	11	nicht getestet
59	43	43	> 500	nicht getestet
60	11	13	181	nicht getestet
61	19	28	> 500	nicht getestet
62	3	4	27	nicht getestet
63	18	24	162	nicht getestet

Alle getesteten 20 Verbindungen besitzen gegen SHP-2 IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich. Keine der getesteten Verbindungen zeigte eine höhere inhibitorische Aktivität gegenüber der verwandten Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1. Im Vergleich dazu gab es jedoch Unterschiede in der Aktivität bei PTP1B, da 11 dieser Verbindungen eine 10- bis 20-fache Verschlechterung der Enzymhemmung aufwiesen und damit eine höhere Selektivität gegenüber SHP-2 besitzen (**9**, **45**, **25**, **27**, **28**, **32**, **56**, **59**, **60**, **61**, **63**). Fünf der Verbindungen (**9**, **31**, **41**, **45**, **51**) wurden zusätzlich gegen die Phosphatase MtpA getestet, zwei davon (Verbindung **9** und **45**) zeigten eine schlechtere inhibitorische Aktivität, die anderen lagen im gleichen Bereich wie der von SHP-2.

Die drei besten SHP-2-Inhibitoren **39**, **49** und **50** wurden ebenfalls auf ihre Selektivität gegenüber anderen Protein-Tyrosin-Phosphatasen im DiFMUP-Assay getestet.

Tabelle 8: Untersuchung von 49, 50 und 39 gegen 4 verschiedene PTPs

Verbindung	IC_{50} SHP-2 [μ M]	IC_{50} SHP-1 [μ M]	IC_{50} PTP1B [μ M]	IC_{50} MtpA [μ M]
50	0,08	2	6	-
49	0,3	3	1	2
39	0,6	3	3	4

Die drei Verbindungen haben IC_{50} -Werte gegen SHP-2 im nanomolaren Bereich. Die untersuchten Inhibitoren besitzen eine hohe Selektivität gegenüber SHP-2. Die **39** besitzt einen IC_{50} -Wert, der 25-fach schwächer bei SHP-1 und 75-fach schwächer bei PTP1B ist. Die Selektivitäten der Inhibitoren **49** und **50** liegen im Bereich des drei- bis zehnfachen Verminderung des Wertes. Die Verbindung **39** ist gegenwärtig der selektivste und potenteste SHP-2-Inhibitor.

Einige Verbindungen wurden im Vergleich zur katalytischen Domäne von SHP-2 mit der SHP-2-Mutante E76K im DiFMUP-Assay getestet. Die E76K-Mutante, die auf der N-SH2-Domäne liegt, verursacht die Aufhebung der Autoinhibition und aktiviert somit das Enzym um das Hundertfache. Die Mutation liegt nicht auf der katalytischen Domäne und sollte somit das Binden und somit die Aktivität der SHP-2-Inhibitoren nicht beeinflussen.

Tabelle 9: Vergleich der IC₅₀-Werte der Verbindungen gegen die katalytische Domäne und die Mutante E76K von SHP-2

Verbindung	IC ₅₀ SHP-2 [μM]	IC ₅₀ SHP-2 (E76K) [μM]
21	7	7
22	4	5
24	4	6
35	8	8
37	51	53
38	10	11
40	2	3
42	13	13
46	23	23
53	38	31
54	23	21
55	31	35

Die IC₅₀-Werte aller Verbindungen gegen die katalytische Domäne von SHP-2 liegen wie erwartet im gleichen Aktivitätsbereich wie die Werte gegen die SHP-2-Mutante E76K.

4.5 Untersuchung der SHP-2-Inhibitoren mit Hilfe von Dockingexperimenten

Das Molecular Modelling und die Dockingexperimente wurden von Dr. Michael Lisurek (AG Kühne) durchgeführt. Für die Dockingexperimente mit dem Programm Sybyl wurde die SHP-2-Kristallstruktur 3B7O aus der pdb-Datenbank (RCSB) verwendet [75]. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm MOE und dem Programm Pymol nachfolgend visuell dargestellt (Abb. 51). Für die drei besten Inhibitoren **49**, **50** und **39** werden die Ergebnisse diskutiert.

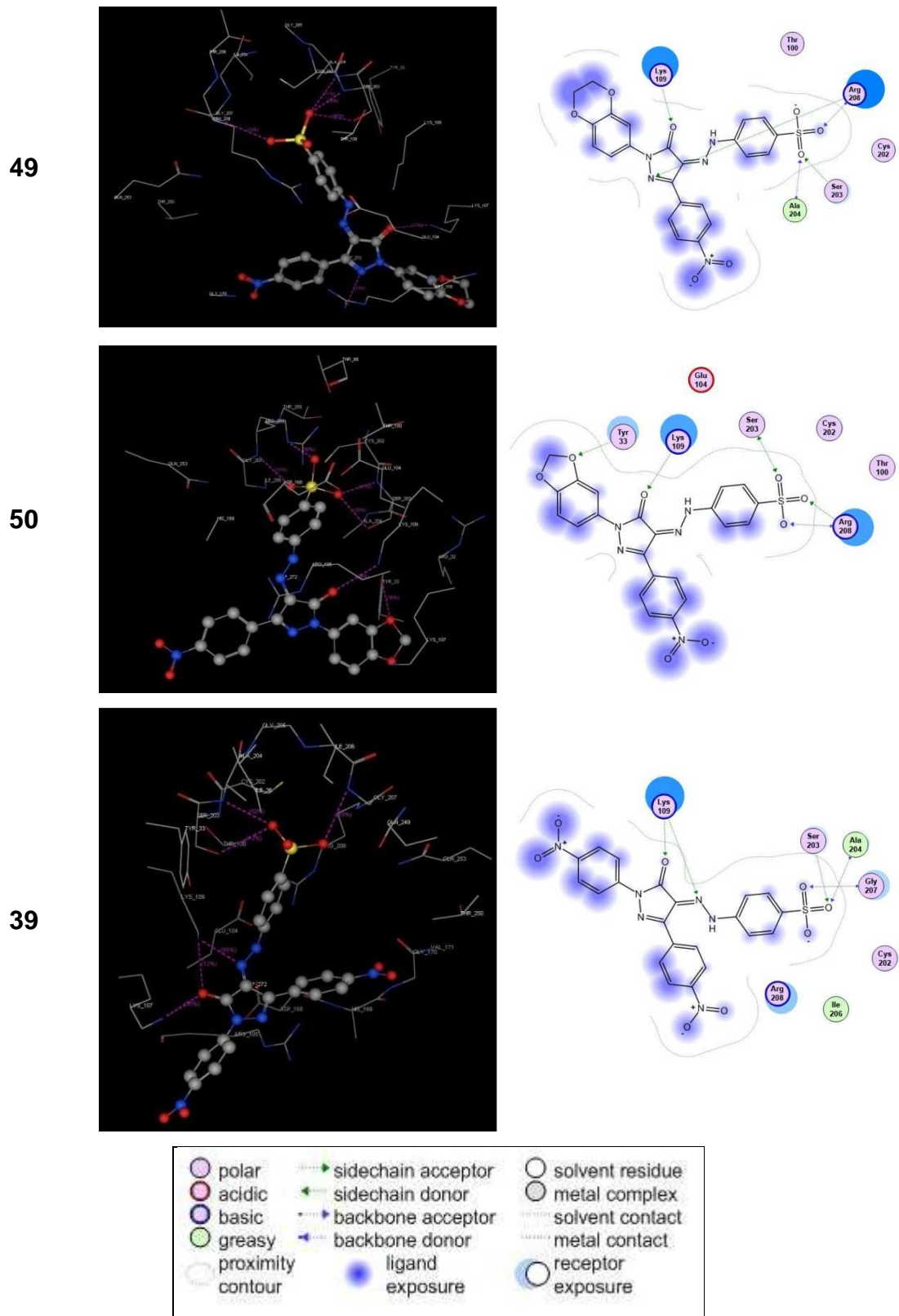


Abb. 51: Virtuelles Docking mit SHP-2 (*3B70*) und der SHP-2-Inhibitoren 49, 50 und 39 mit MOE;
 Links: Darstellung der katalytischen Tasche mit dem jeweiligen Inhibitor
 Rechts: Darstellung der Ligandeninteraktion in der katalytischen Tasche

Die Sulfonsäuregruppe der Verbindung **49** ragt in die katalytische Tasche und wechselwirkt mit Arginin 208, Alanin 204 und Serin 203. Zusätzlich gibt es eine Interaktion zwischen Lysin 109 und dem Sauerstoff des Pyrazolonringes. Die beiden anderen Reste des Inhibitors zeigen in die Peripherie und sind lösungsmittlexponiert.

Die Verbindung **50** zeigt den gleichen Bindungsmodus der Sulfonsäure. Es gibt eine weitere Wechselwirkung mit dem Sauerstoff des Benzodioxolrestes und dem Tyrosin 33.

Die Verbindung **39** zeigt ebenfalls die typischen Wechselwirkungen in der Aktivtasche. Das Lysin 109 interagiert mit dem Sauerstoff des Pyrazolons und einem Stickstoffatom des Hydrazon-Linkers. Weitere Wechselwirkungen der beiden *para*-Nitrophenylgruppen konnten nicht identifiziert werden.

Die beschriebene intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung vom NH des Hydrazon-Linkers (Z-Isomer) konnte hierbei nicht identifiziert werden.

Die Abbildung 52 zeigt die Kristallstruktur von SHP-2 in der Cartoondarstellung mit den drei Inhibitoren **49**, **50** und **39** in der katalytischen Tasche.

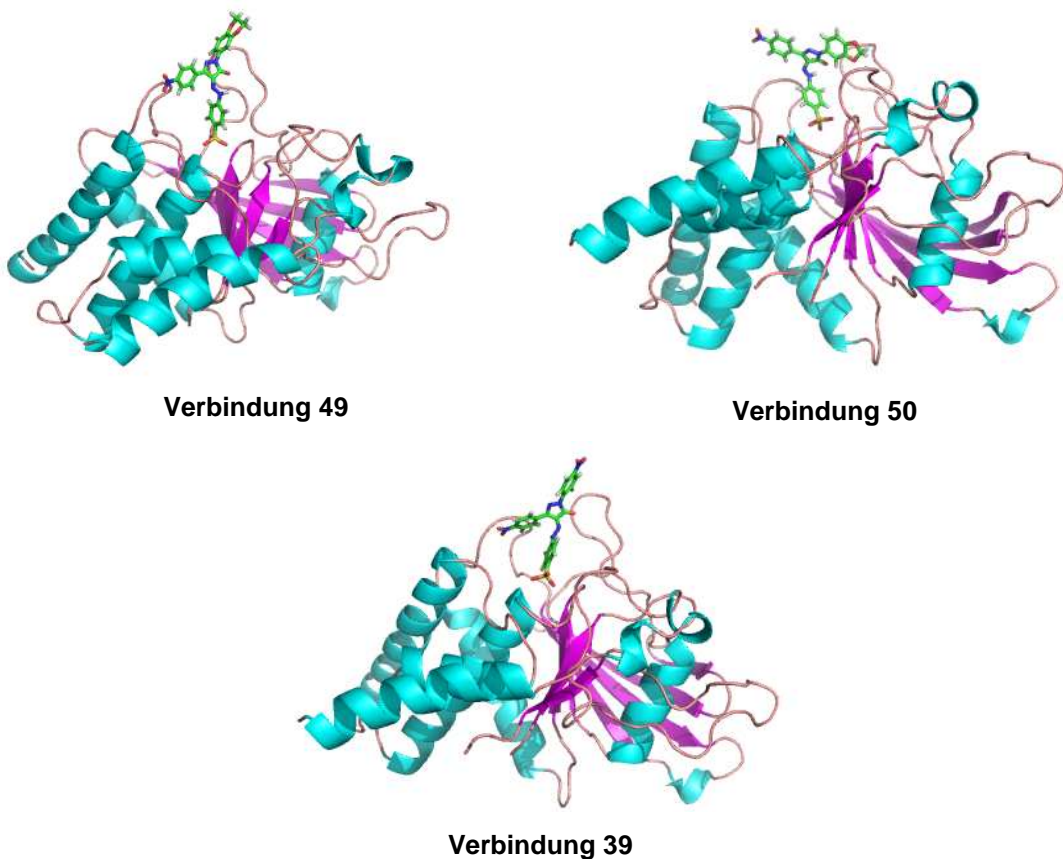


Abb. 52: Darstellung von SHP-2 mit den drei verschiedenen Inhibitoren **49**, **50** und **39** (Cartoondarstellung) generiert durch Pymol

4.6 Untersuchung der biologischen Wirksamkeit der

SHP-2-Inhibitoren mittels in vitro und in vivo Experimenten

Die durch chemische Modifikationen von der Leitstruktur PHPS1 1 synthetisierte Verbindungsbibliothek von potentiellen SHP-2-Inhibitoren wurde unter Verwendung eines Phosphatase-Assays auf ihre inhibitorische Wirksamkeit gegenüber SHP-2 durch Bestimmung der IC₅₀-Werte untersucht (Kapitel 4.3 und 4.4). Darüber hinaus wurden Experimente mit der SHP-2-Mutante E76K und den weiteren Phosphatasen SHP-1, PTP1B und MptpA durchgeführt, um die Selektivität der Inhibitoren zu bestimmen. Die IC₅₀-Werte dieser Verbindungen dienten als Grundlage für die weitere Untersuchung in zellulären Experimenten. Es wurden nur SHP-2-Inhibitoren mit IC₅₀-Werten im niedrigen mikromolaren bzw. nanomolaren Bereich genauer untersucht.

Die Inhibitoren wurden auf ihre biologische Wirksamkeit in Zellexperimenten und ihre Toxizität in Anlehnung an die Untersuchung der Leitstruktur PHPS1 analysiert. PHPS1 hemmt SHP-2-abhängige zelluläre Vorgänge wie HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation und „Branching Morphogenesis“ von Epithelzellen. Weiterhin inhibiert PHPS1 signalabwärts HGF/SF-induzierte anhaltende Phosphorylierung von Erk1/2 MAPK und Dephosphorylierung von Paxillin [53].

Für die Analyse wurden die ausgewählten Verbindungen aus der Bibliothek ebenfalls in den etablierten Experimenten mit HGF/SF-stimulierter Zelldissoziation von MDCK-C Zellen (Madin Darby Canine Kidney, canine Nierenepithelzellen) getestet [92] [23]. Darüber hinaus wurden in diesem Experiment auch humane Pankreastumorzellen verwendet, die sich gleichermaßen mit HGF/SF stimulieren lassen (persönliche Mitteilung Prof. Gherardi; zur Verfügung gestellt von Prof. Gherardi, Cambridge).

Desweiteren wurde die Wirkung des Inhibitors **50** in einem Proliferations-Assay mit zwei verschiedenen humanen Lungentumorzellen, LXFA 526L und LXFL 1647L, bestimmt.

Zusätzlich wurde die Verbindung **50** in einem Softagar-Assay mit zwei verschiedenen humanen Lungentumorzellen, LXFA 526L und LXFL 1121L, auf die antitumorale Wirkung *in vitro* untersucht.

Basierend auf diesen Experimenten und Vorversuchen wurde zum Abschluss der Untersuchungen der SHP-2-Inhibitoren die Verbindung **39**, aufgrund der nanomolaren Enzyminhibition und einer positiven Verträglichkeitsstudie in der Nacktmaus, in einem Therapieversuch mit dem Xenograft LXFA 526 auf die antitumorale Wirkung *in vivo* untersucht.

Die Zellexperimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, von Chris Eckert (AG Prof. W. Birchmeier) in Zusammenarbeit mit der Screening Unit (Dr. Jens von Kries) durchgeführt und dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Aufgrund des besonderen Angebotes von verschiedenen humanen und vor allem patientennahen Krebszelllinien, wie LXFA 526L, LXFL 1647L und LXFL 1121L wurde bei der Untersuchung der SHP-2-Inhibitoren mit der Firma Oncotest (Freiburg) zusammengearbeitet.

4.6.1 Experimente zur HGF/SF-stimulierten Zelldissoziation

Epithelzellen spielen bei der Entwicklung von humanen, malignen Tumoren eine tragende Rolle. Über 90 % der humanen Tumore sind Karzinome und haben damit einen epithelialen Ursprung. Bei der Metastasierung wandeln sich maligne Krebszellen von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften um. Diesen Prozess bezeichnet man als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) [93] [94]. Die EMT ist ein essentieller Vorgang in der Embryonalentwicklung und Wundheilung, jedoch können deregulierte EMT-Mechanismen ein Bestandteil der Progression von Tumoren in epithelialen Gewebe sein (adulte Pathogenese) [95]. Die typischen Merkmale sind hierbei die Veränderung oder Verlust der zellspezifischen Eigenschaften und die Fähigkeit zur Migration.

Epithelzellen wachsen typischerweise in definierten Zellkolonien mit einem festen Zellverband. Durch funktionelle Studien hat sich gezeigt, dass bei Anwesenheit des Wachstumsfaktors HGF/SF die epithelialen MDCK-C Zellen aus ihrem Zellverband dissoziieren und wesentlich mobiler sind, die epitheliale-mesenchymale Transition findet statt [92] [23]. HGF/SF bewirkt eine Aktivierung des MAPK-Signalweges über die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met. Signalabwärts von Met befindet sich u.a. die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2, die mit den entwickelten Inhibitoren selektiv gehemmt werden soll (Abb. 53) [24].

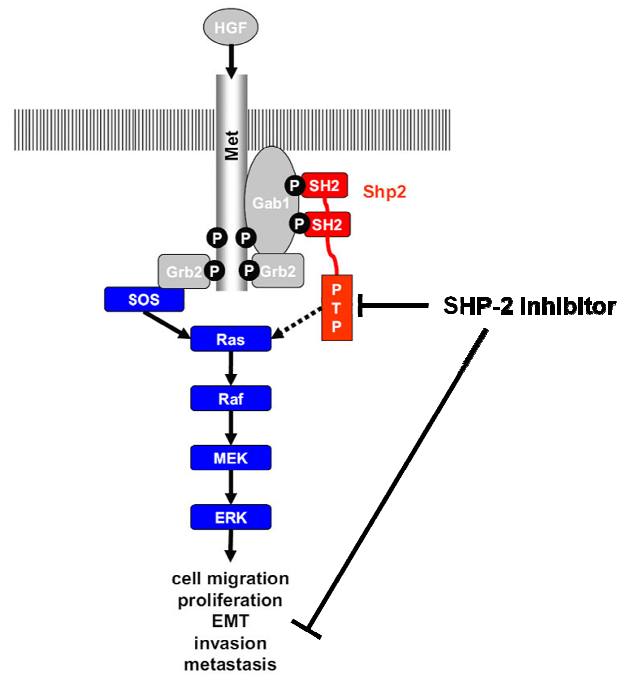


Abb. 53: Schematische Darstellung der möglichen Wirkung eines Inhibitors von SHP-2 beim HGF/SF-stimulierten Met-Signalweg [53]

Die entwickelten SHP-2-Inhibitoren sollen auf ihre Wirksamkeit bei der HGF/SF-stimulierten Zelldissoziation von zwei verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Zunächst wurden die Experimente bei den etablierten MDCK-C Zellen durchgeführt.

Es wurden 13 potentielle SHP-2-Inhibitoren auf ihre konzentrationsabhängige Wirkung auf die HGF/SF-induzierte Zelldissoziation an MDCK-C Zellen getestet (Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht der Inhibitionswerte der getesteten Verbindungen mit MDCK-C Zellen

Verbindung	Inhibition der Zelldissoziation bei Konzentration der Verbindung in μM
1 (PHPS1)	7,5
21	> 10
22	10
54	> 10
35	10

40	5
42	> 5
55	5
44	> 5
43	5
49	5
50	2,5
39	1,25

Es konnten zehn Verbindungen identifiziert werden, die im niedrigen mikromolaren Bereich konzentrationsabhängig die Zelldissoziation von MDCK-C Zellen hemmen.

In Abbildung 54 sieht man das unterschiedliche Verhalten mit und ohne den Wachstumsfaktor HGF/SF bei MDCK-C Zellen. Ohne die Zugabe von HGF/SF bleiben die Zellen fest in ihrer Kolonie (Abb. 54a). Nach der Stimulation mit dem Wachstumsfaktor erkennt man deutlich die Zelldissoziation aus dem Zellverband (EMT) (Abb. 54b). Die untersuchten Verbindungen inhibieren diese Zelldissoziation in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abb. 54c-k). Wie hier gezeigt werden konnte, inhibiert die Verbindungen **49** und **50** bei 5 μ M bzw. 2,5 μ M. Die bisher aktivste Verbindung, die **39**, bewirkt selbst bei 1,25 μ M eine Inhibition der Zelldissoziation.

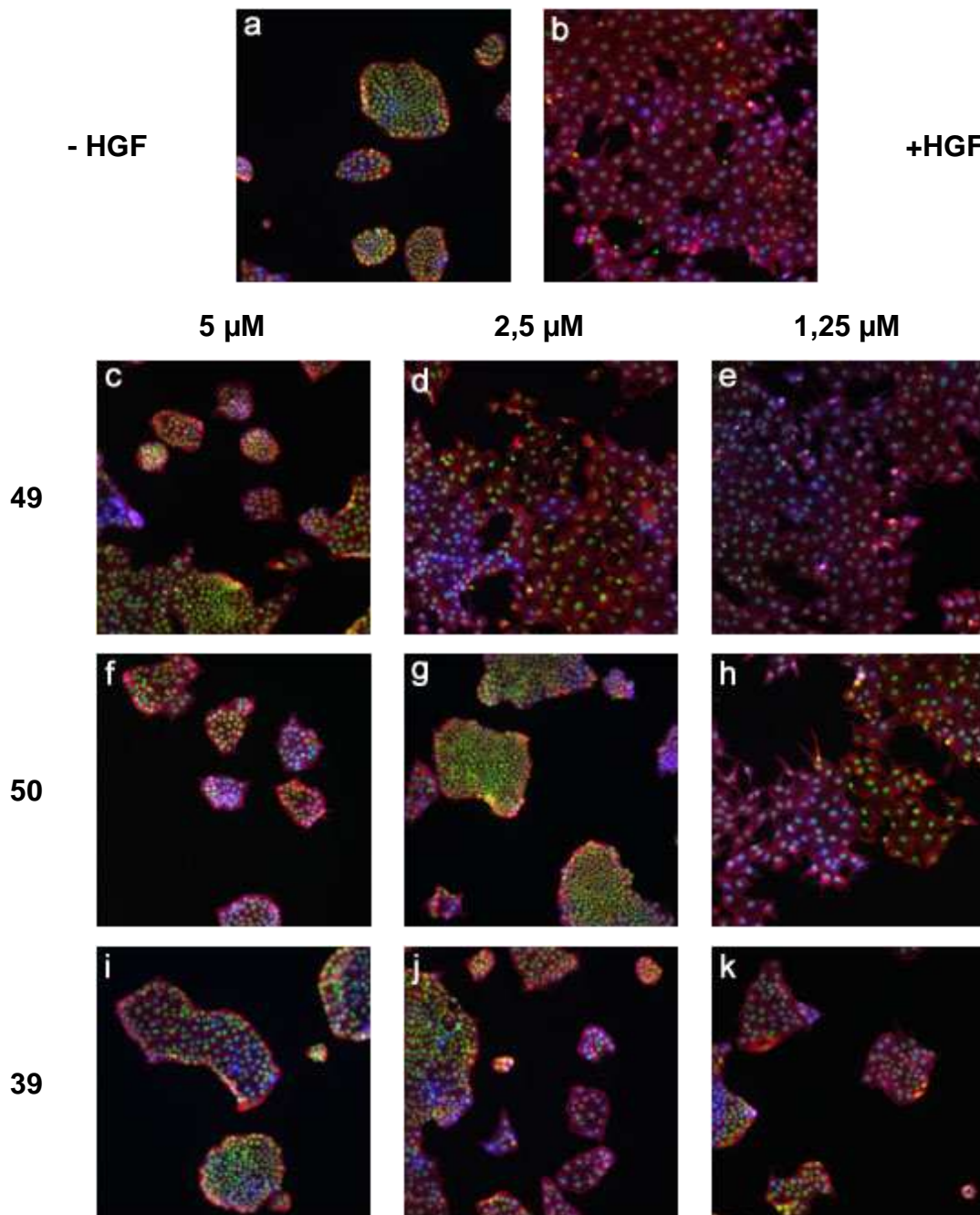


Abb. 54: HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation von MDCK-C Zellen

Nach der erfolgreichen Evaluierung der Hemmung der Zelldissoziation von caninen Zellen, wurden 16 Verbindungen zusätzlich auf ihre inhibitorische Wirkung an humanen Pankreastumorzellen, HPAF II Zellen, getestet (Tabelle 11).

HPAF II Zellen wachsen ebenfalls in definierten Zellkolonien und lassen sich mit HGF/SF vergleichsweise stimulieren (Abb. 55a und b) (persönliche Mitteilung Prof. Gherardi; zur Verfügung gestellt von Prof. Gherardi, Cambridge).

Tabelle 11: Übersicht der Inhibitionswerte der getesteten Verbindungen mit HPAF II Zellen

Verbindung	Inhibition der Zelldissoziation bei Konzentration der Verbindung in μM
1 (PHPS1)	7,5
48	10
40	5
42	5
44	5-10
43	5
56	5-10
57	10
60	> 10
62	10
26	10
52	2,5
58	2,5-5
49	5
50	2,5
39	0,6

Wie bei den Experimenten mit den MDCK-C Zellen konnte gezeigt werden, dass die HGF/SF-induzierte Zelldissoziation (EMT) von den SHP-2-Inhibitoren konzentrationsabhängig gehemmt werden kann (Abb. 55c-k). Es wurden vier Verbindungen **39**, **50**, **52** und **58** identifiziert, die im Bereich von 2,5 μM eine inhibitorische Wirkung zeigten.

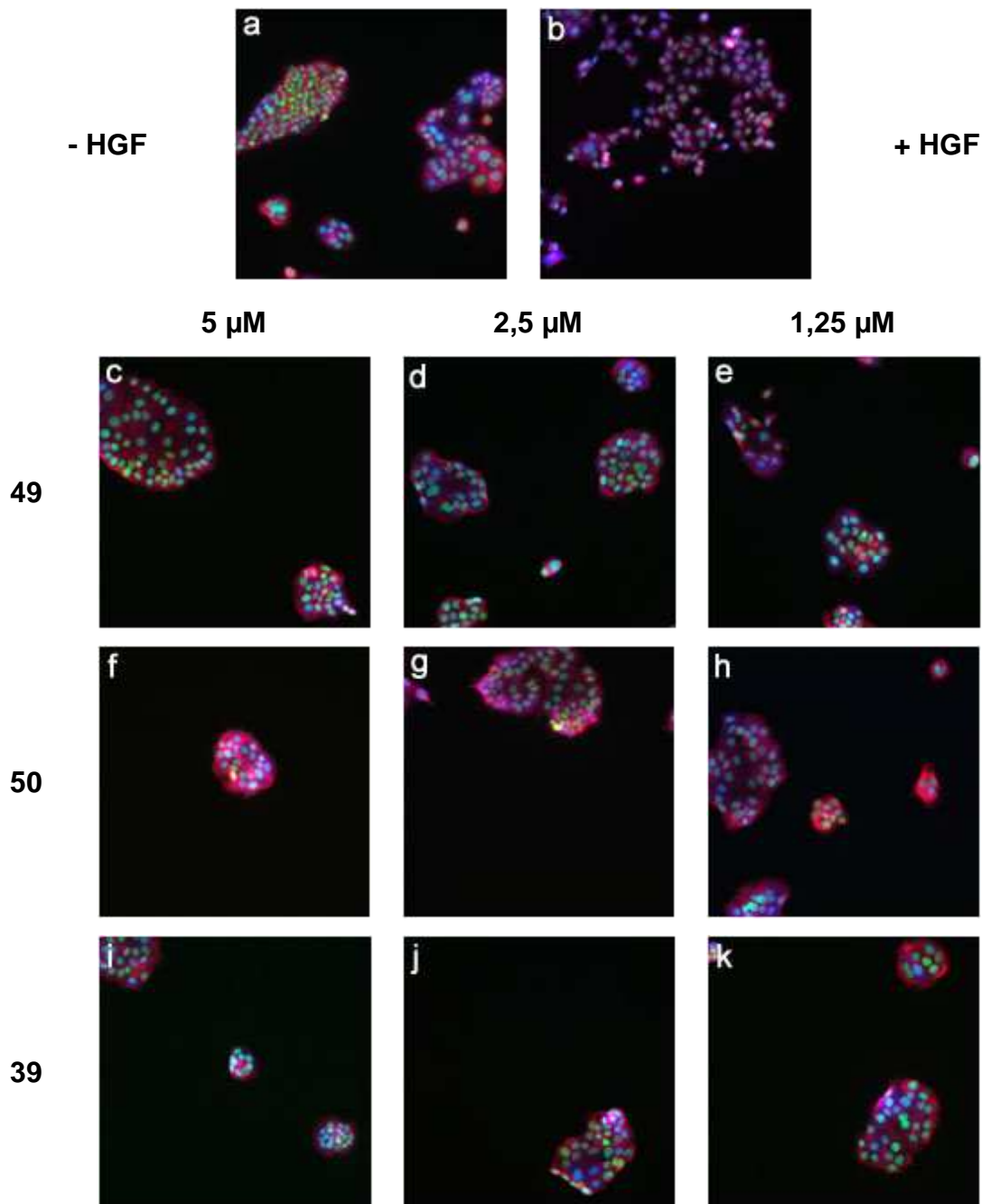


Abb. 55: HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation von HPAF II Zellen

Für den Inhibitor **39** konnte sogar eine Inhibition des HGF-induzierten Scatters bei einer Konzentration von 0,6 μM nachgewiesen werden (Abb. 56c-e).

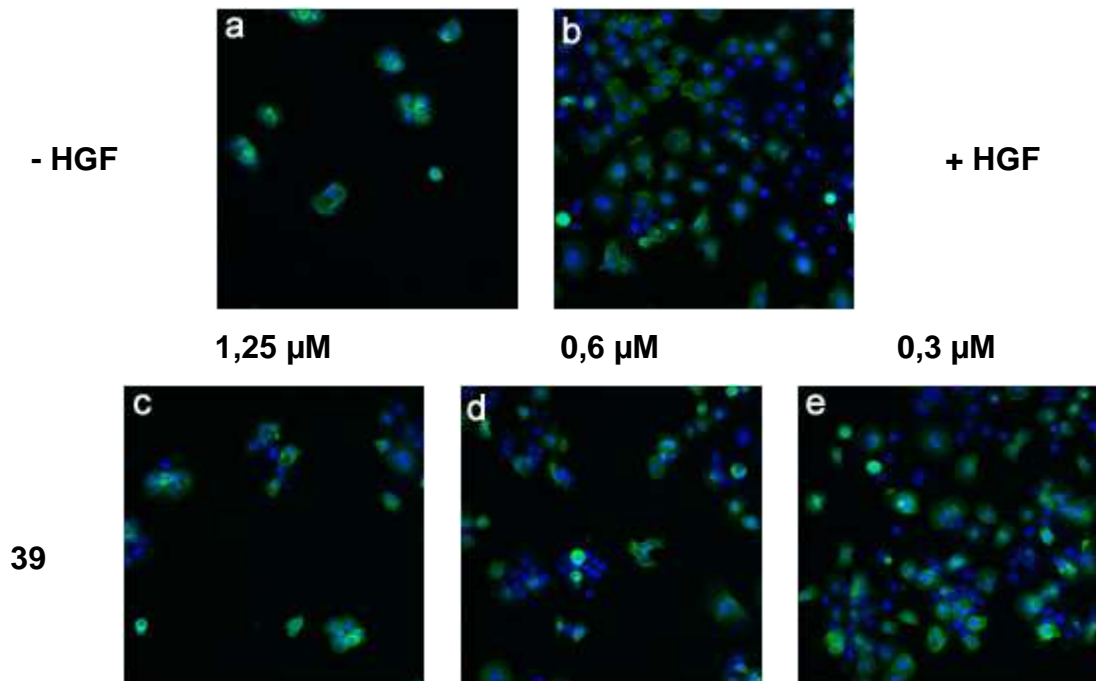


Abb. 56: HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation von HPAF II Zellen mit **39**

Die Experimente zur HGF/SF-stimulierten Zelldissoziation zeigen, dass die untersuchten SHP-2-Inhibitoren die HGF/SF-stimulierte EMT von caninen MDCK-C Zellen und humanen HPAF II Zellen in einer konzentrationsabhängigen Weise ebenfalls im niedrigen mikromolaren Bereich hemmen.

Die Leitstruktur PHS1 zeigt in beiden Experimenten eine Inhibition im Bereich von 5-10 μM . Die Verbindung **40**, die die Zelldissoziation von MDCK-C bei einer Konzentration von 5 μM hemmt, besitzt vergleichsweise einen IC_{50} -Wert von 2 μM im Enzymassay. Bei den Untersuchungen mit den humanen Pankreastumorzellen konnten vier Verbindungen gefunden werden, die eine Hemmung bei 5 μM zeigen. Weiterhin hemmen zwei Verbindungen **52** und **58** die Zelldissoziation bei 2,5 μM . Die Aktivität der Inhibitoren **52** und **58** liegt im Enzymassay bei 3 bzw. 2 μM . Der bisher beste Kandidat, die Verbindung **39**, hemmt die Zelldissoziation bei 0,6 μM und ist damit im Vergleich zur Leitstruktur in der inhibitorischen Wirkung um einen Faktor von 17 besser. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibitoren HGF-induzierte EMT inhibieren und

demnach auf dem Met-Signalweg wirken. Alle getesteten Verbindungen zeigten in diesem Zellexperiment mit beiden Zelllinien keine Toxizität.

4.6.2 Wirkung der SHP-2-Inhibitoren auf die Proliferation von verschiedenen humanen Tumorzelllinien

Zellen proliferieren so lange bis sie, z.B. durch Kontakthemmung, bei der Ausbildung eines Monolayers gestoppt werden, danach beginnen sie auszudifferenzieren. Mit Hilfe des Proliferations-Assays soll die Wirkung des SHP-2-Inhibitors **50**, als Modelverbindung, auf die Zellteilung von zwei humanen Tumorzelllinien bestimmt werden. Der Proliferations-Assay wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Oncotest in Freiburg durchgeführt, da dort die Möglichkeit zur Untersuchung der zwei patientennahen, adhären-wachsenden, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) Zelllinien, der Zelllinie LXFA 526L und der der LXFL 1647L, besteht.

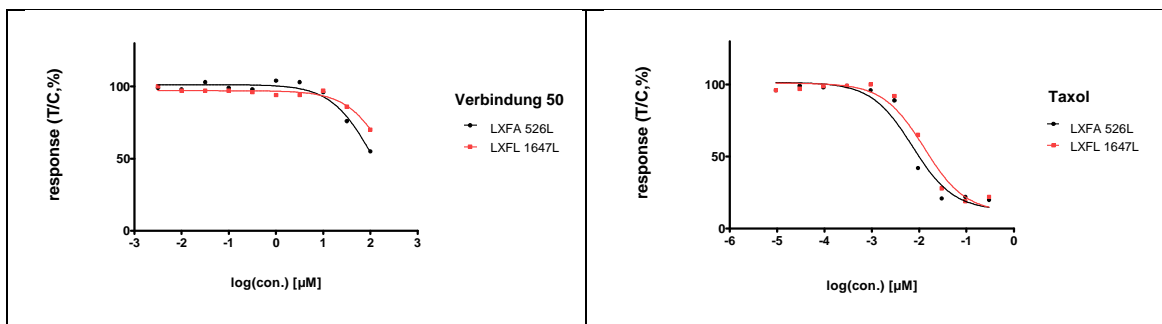


Abb. 57: Proliferationshemmung von LXFA 526L und LXFL 1647L mit Verbindung 50 (links) und Taxol (rechts)

Die Hemmung der Proliferation der beiden Zelllinien durch die Inhibitoren wird im Vergleich zur Behandlung mit dem Zytostatikum Taxol bewertet (Abb. 57). Der Quotient T/C in %, bei dem T dem gemessenen Wert der behandelten Zellen und C dem Kontrollwert der unbehandelten Zellen entspricht, gibt die Hemmung der Proliferation in Prozent an. In der höchsten Testkonzentration von 100 µM von **50** wurde bei der Zelllinie LXFA 526L ein T/C von 45 % erreicht und bei der LXFL 1647L ein T/C von 30 %. Die Referenzsubstanz Taxol zeigte in beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Wirksamkeit mit IC₅₀-Werten von 10 nM, das einem Faktor von 10000 im Vergleich zur Wirkung von **50** entspricht. Das bedeutet, dass die SHP-2-Inhibitoren in diesem Versuch die Proliferation nur marginal beeinflussen.

4.6.3 Identifizierung einer SHP-2-abhängigen humanen Tumorzelllinie mit Hilfe von siRNA-Experimenten

Mit Hilfe von zielgerichteter siRNA lässt sich die Expression von spezifischen Zielgenen verringern. Zur weiteren Untersuchung der potentiellen SHP-2-Inhibitoren kann man gegen SHP-2 gerichtete siRNA als Kontrolle verwenden, indem man die Verringerung der Expression von SHP-2 mit der Wirkung der SHP-2-Inhibitoren vergleicht. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine veröffentlichte humane Tumorzelllinie, die SHP-2 exprimiert und das sich mit siRNA gegen SHP-2 herunter regulieren lässt.

Die siRNA-Experimente wurden aufgrund der zur Verfügung gestellten Tumorzelllinien in Zusammenarbeit mit der Firma Oncotest in Freiburg durchgeführt. Zunächst wurde ein siRNA-Experiment mit zwei verschiedenen Lungentumorzelllinien, den Zelllinien LXFA 526L und LXFL 1121L, durchgeführt, um deren SHP-2-Abhängigkeit zu untersuchen (Abb. 58). Nach Behandlung der Zellen wurden die Zelllysate hergestellt und die SHP-2 Expression mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Wie auf dem Westernblot zu erkennen ist, wird SHP-2 in den Zellen exprimiert (Abb. 58, Bande bei 65 kDa) und die Proteinexpression von SHP-2 lässt sich mittels siRNA herunter regulieren. Im folgenden Softagar-Assay wurde aufgrund dieses Vorexperimentes die siRNA **A** verwendet.

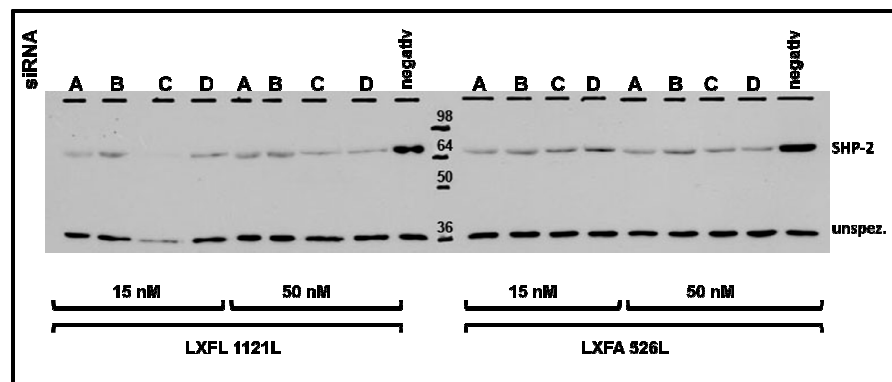


Abb. 58: Untersuchung der humanen Tumorzelllinien LXFL 1121L und LXFA 526L mit vier verschiedenen siRNAs gegen SHP-2 im Western Blot

Mit diesem Experiment soll die Abhängigkeit der Koloniebildung von humanen Tumorzellen von SHP-2 untersucht werden. Eine mögliche Hemmung des Tumorwachstums durch die Inhibitoren kann als Vorexperiment für weitere *in*

vivo-Versuche dienen. Hierbei wird ein Agarose-basiertes Zellkultur-System verwendet, welches ausschließlich das Wachstum transformierter Zellen unterstützt.

Die zwei Inhibitoren **50** und **39** wurden bei einer Konzentration von 40 μ M im Softagar-Assay an den humanen Tumorzelllinien LXFA 526L und LXFL 1121L, welche aus Tumorexografts von Nacktmäusen gewonnen wurden, getestet.

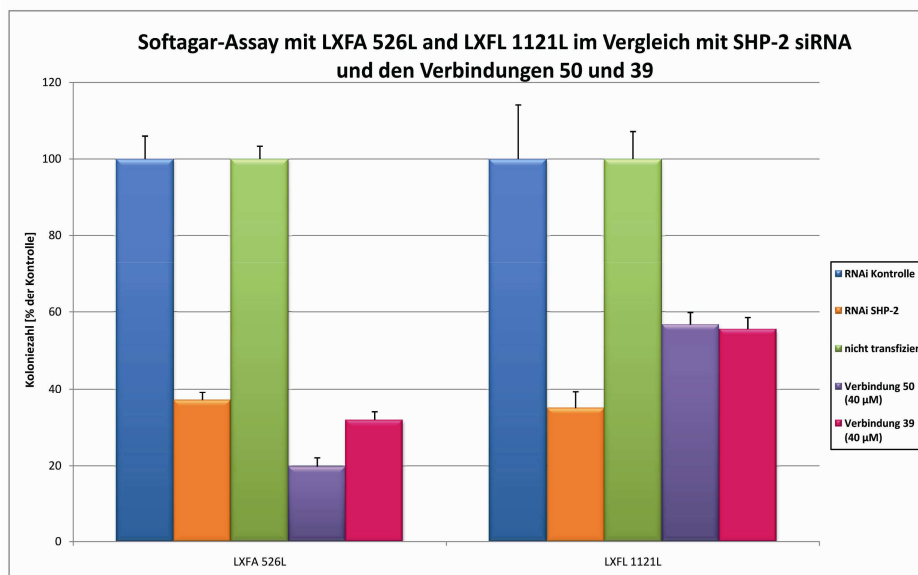


Abb. 59: Darstellung der Ergebnisse aus dem Softagar-Assay im Balkendiagramm

Die Werte der Kolonienanzahl wurden auf die Zahl der Kolonien der nicht-transfizierten Zellen (Kontrollwert) normiert (Abb. 59, grüner Balken). Beide humane Tumorzelllinien, LXFA 526L und LXFL 1121L, wachsen in definierten Kolonien. Die Verringerung der Expression von SHP-2 mittels siRNA führte zu einer deutlichen Abnahme der Koloniezahl auf 35 % bzw. 37 % bei beiden Zelllinien (Abb. 59, oranger Balken). Diese Beobachtung weist auf eine Abhängigkeit des Tumorwachstums von SHP-2 hin. Der Inhibitor **50** inhibiert das Wachstum der Kolonien bei LXFA 526L auf 20 %, die Verbindung **39** auf 32 %. In der Zelllinie LXFL 1121L liegt die Koloniehemmung bei der Verbindung **50** bei 57 %, bei **39** auf 56 %.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die inhibitorische Wirkung der beiden Verbindungen **50** und **39** vergleichbar ist mit der stark verringerten Expression von SHP-2 durch siRNA. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die identifizierten Verbindungen selektive Inhibitoren für SHP-2 sind. Hinsichtlich

dieser positiven Ergebnisse sind anschließend Tierversuche mit dem Xenograft LXFA 526 durchgeführt worden.

4.6.4 Verträglichkeitsstudie von SHP-2-Inhibitoren in der Nacktmaus

Nach den Untersuchungen der SHP-2-Inhibitoren im Phosphatase-Assay und den verschiedenen *in vitro* Experimenten, wurde eine Verträglichkeitsstudie in der Nacktmaus vorgenommen. Nacktmäuse sind athymische Mäuse mit Immundefekt (NMRI nu/nu). Sie sind ein genetischer Mutant der Hausmaus mit fehlendem Thymus, daraus folgt ein Mangel an T-Lymphozyten, wodurch die Nacktmaus ein stark eingeschränktes Immunsystem hat, was sie zu einem idealen Wirt für homologe und xenogene Transplantationen bzw. Xenotransplantationen und das humane Tumorwachstum möglich macht.

Bei der Verträglichkeitsstudie wurden die Leitstruktur und die bisher besten Kandidaten der SHP-2 Inhibitoren, d.h. **PHPS1 1, 49, 50** und **39** getestet. Mit diesem Experiment soll die Verträglichkeit und Toxizität der Verbindungen untersucht werden, indem die Mortalität und der Gewichtsverlust der Mäuse analysiert wird. Ein weiteres Ziel der Experimente ist die Identifizierung von Dosislevels und von Dosis-Plänen, die geeignet sind für spätere *in vivo*-Wirksamkeitsstudien.

Die Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Oncotest in Freiburg durchgeführt. Die jeweiligen Gruppen beinhalten je drei tumorfreie, weibliche Nacktmäuse. Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurden 3 ml/kg der Verbindungen gelöst in DMSO täglich den Nacktmäusen *intraperitoneal* (*ip*, in den Bauchraum) gespritzt, der Kontrollgruppe wurde nur das Lösungsmittel DMSO im entsprechendem Volumen verabreicht (Tabelle 12). Danach wurden die Tiere zwei weitere Wochen beobachtet. Während der täglichen Routineuntersuchung wurden die Mäuse gewogen.

Tabelle 12: Dosierungen der Verbindungen in der Verträglichkeitsstudie

Bezeichnung	Dosierung (mg/kg/d)	Dauer	Verabreichung
1 (PHPS1)	23,3 ^a	0-13	<i>ip</i>
	69,8 ^b	0-13	<i>ip</i>
49	117,78 ^b	0-13	<i>ip</i>
50	114,63 ^b	0-13	<i>ip</i>
39	45,93 ^b	0-3	<i>ip</i>

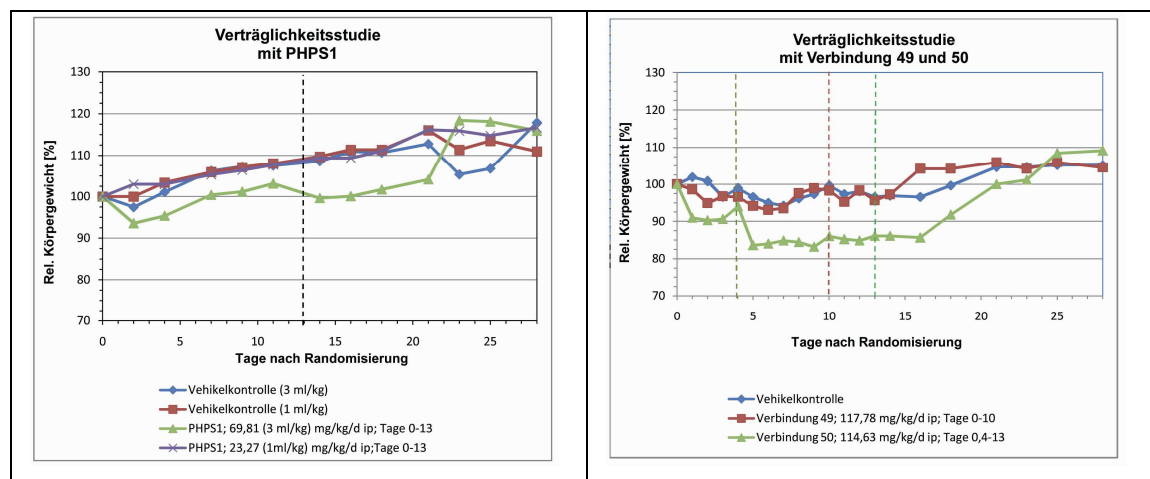
^a 1 ml/kg^b 3 ml/kg

Abb. 60: Verträglichkeitsstudie von PHPS1 (links), 49 und 50 (rechts)

Die Leitstruktur wurde in zwei unterschiedlichen Dosen getestet. Dabei zeigte sich, dass die tägliche *ip*-Dosierung von 1 ml/kg **PHPS1 1**, keinerlei Gewichtsabnahme und Beeinträchtigung der Mäuse bewirkte. Dagegen kam es bei einer Dosierung von **PHPS1 1** in der dreifachen Dosis initial zu Gewichtsverlusten von wenigen Prozenten (Abb. 60, links). Für beide Gruppen kam es aber bereits während der zweiwöchigen Therapiephase zu einer Erholung der Mäuse, abzulesen an der Gewichtszunahme. Insgesamt sieht man eine moderate und transiente Beeinträchtigung der Mäuse durch PHPS1, das auf einen biologischen Effekt von PHPS1 hinweist. Dabei ist eine tägliche Gabe von 3 ml/kg als das maximale Dosisvolumen zu betrachten.

Die Verbindung **49** zeigte in dieser Verträglichkeitsstudie keine Auffälligkeiten. Im Vergleich dazu hatten die mit Verbindung **50** behandelten Mäuse einen Gewichtsverlust von 16,9 %. Die Gewichtsabnahme der Mäuse war jedoch nur

während der Therapiephase zu beobachten. Sie benötigten etwa 6-8 Tage nach der letzten Behandlung, um sich zu erholen. Die Verbindung **50** wurde mit der nahezu maximal tolerierten Dosis (MTD) verabreicht. Für **49** wurde die MTD nicht erreicht. Dieses Experiment zeigt biologische Aktivität der Verbindung **50** in der Maus (Abb. 60, rechts).

Die Verbindung **39**, die im Enzym- und im Scatter-Assay bisher den wirkungsvollsten inhibitorischen Effekt zeigte, wurde in einer Kurzzeit-Verträglichkeitsstudie innerhalb von drei Tagen getestet. Die höchstmögliche applizierte Dosis von 45,93 mg/kg/d bei Nacktmäusen zeigte innerhalb dieses Zeitraumes keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Verträglichkeit.

Die bei diesen Tierexperimenten ermittelten Werte zeigen, dass für die geplanten Therapieversuche mit dem Xenograft LXFA 526 die höchstmögliche Dosis der Inhibitoren eingesetzt werden kann.

4.6.5 Antitumorale Wirkung der Verbindung 39 im Tierexperiment

Aufgrund der vorangegangenen erfolgreichen Experimente der Verbindung **39** mit der Zelllinie LXFA 526L, einer patientennahen Zelllinie im Softagarassay (*Kapitel 4.6.3*) und der Verträglichkeit und biologischen Wirksamkeit *in vivo* wurde ein Tierexperiment mit dieser Zelllinie und diesem Inhibitor ausgewählt. Die antitumorale Wirkung der Verbindung **39** wurde in diesem Tierexperiment untersucht [96].

Für den Therapieversuch wurden pro Gruppe fünf weibliche NMRI nu/nu in einem Alter von 12-14 Wochen verwendet. Ein 4-5 mm großes Tumorstück wurde den Mäusen einseitig subkutan implantiert. Bei einem Tumolvolumen von 50-200 mm³ wurde die Therapie mit **39** begonnen. Die Testsubstanz wurde einmal pro Tag in DMSO bei einem Volumen von 3ml/kg und einer Dosis von 45,93 mg/kg *ip* verabreicht, als Kontrolle diente nur DMSO. Die therapierten Mäuse wurden täglich untersucht. Das Tumolvolumen wurde durch zweidimensionale Messungen am Tag 0, dem Therapiebeginn, und danach zweimal pro Woche bestimmt. Die Wirksamkeit wurde durch die maximale Hemmung des Tumolvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe definiert. Die Tumoringibition wird mit T/C in % angegeben. Dabei ist T das relative Tumolvolumen mit Behandlung und C der Kontrollwert.

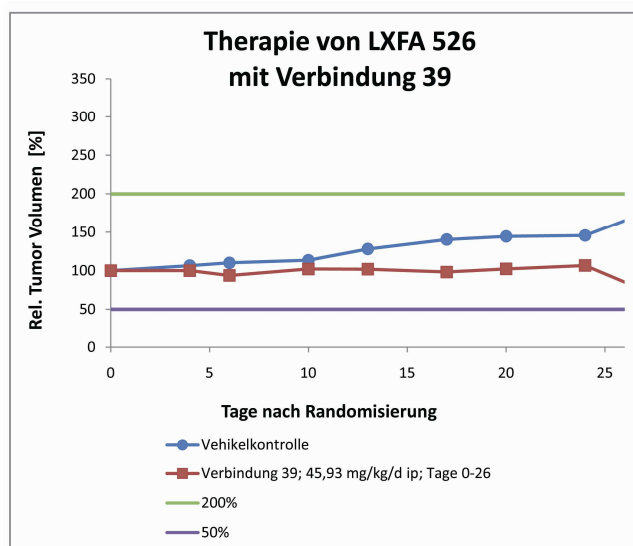


Abb. 61: Therapieversuch mit LXFA 526 und Verbindung 39

Wie in Abbildung 61 dargestellt, reduziert die Verbindung **39** das Tumorwachstum des Lungenadenokarzinoms LXFA 526 mit einem T/C-Wert von 42,6 %, der auf Basis des einseitigen Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests auch signifikant ist [97]. Somit besitzt dieser Inhibitor eine antitumorale Wirkung und ist aufgrund dieses Ergebnisses auch bioverfügbar in der Nacktmaus.

4.7 Zusammenfassung und Potential der entwickelten SHP-2-Inhibitoren

Es konnte gezeigt werden, dass ausgehend von einem virtuellen Screening mit einem Homologiemodell von SHP-2 die Identifizierung der Leitstruktur **PHPS1 1** für einen SHP-2-Inhibitor möglich ist [53]. Durch chemische Optimierung der Inhibitoren konnte eine Verbindungsbibliothek synthetisiert werden, die durch SAR und anschließend in verschiedenen Experimenten auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht wurde. Die verbesserten SHP-2-Inhibitoren **50** und **39** sind im Enzymassay im nanomolaren Bereich aktiv, sie hemmen zusätzlich die HGF-stimulierte EMT von caninen MDCK-C Zellen und auch von humanen Pankreastumorzellen im niedrigen mikromolaren bzw. nanomolaren Bereich. Sie zeigen im Softagar-Assay Hemmungen der Koloniebildung von bis zu 40 % von zwei verschiedenen humanen Lungentumorzelllinien, die zur Kontrolle mit siRNA gegen SHP-2 ebenfalls hemmbar sind. In keinem, der in dieser Arbeit untersuchten Experimente, konnte eine toxische Wirkung der SHP-2-Inhibitoren

festgestellt werden. Die hier gezeigten Experimente deuten insgesamt darauf hin, dass es sich bei den entwickelten Verbindungen um selektiv wirkende SHP-2-Inhibitoren handelt. Die ersten Tierversuche mit humanen Tumorenografts in der Nacktmaus zeigen darüber hinaus, dass es eine antitumorale Wirkung des Inhibitors **39** *in vivo* auf humane Tumore gibt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse deutlich, dass die Inhibition von SHP-2 ein sinnvoller Ansatz zur Krebstherapie sein könnte. Insbesondere die weiterentwickelte Verbindung **39**, die auf der Leitstruktur PPHS1 basiert, weist durch gute Verträglichkeit im Tierversuch und gute inhibitorische sowie selektive Wirksamkeit, ein hohes Potential für die Weiterentwicklung als Krebstherapeutikum auf.

Die Zukunft dieses Projektes, das in einem PreGOBio-Projekt (MDC, Berlin) weitergeführt wird, liegt zunächst in der weiteren chemischen Modifikation und Optimierung der Verbindungen. Die Aktivität, die Spezifität und die Löslichkeit der potentiellen SHP-2-Inhibitoren soll auf diesem Wege gesteigert werden. Die bestehende Bibliothek von SHP-2-Inhibitoren soll durch die Verwendung von neuen Molekülbestandteilen erweitert und optimiert werden. Zusätzlich sollen die 19 alternativen Strukturen, die während des virtuellen Screenings am Beginn des Projektes identifiziert worden sind, untersucht werden [53].

Die Kristallisation von SHP-2 mit einem Inhibitor in der Aktivtasche könnte das in diesem Projekt entwickelte Homologiemodell von SHP-2 belegen. Es konnten bereits erfolgreich Kristalle von SHP-2 ohne Ligand in einer guten Auflösung in der AG Heinemann (MDC, Berlin) hergestellt werden.

Ein weiteres Experiment zur Klärung der Spezifität der SHP-2-Inhibitoren wäre ein SILAC-Experiment (stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkultur) [98]. Durch Einbau von stabilen, nicht-radioaktiven, schweren Isotopen wie z.B. Arginin ($^{13}\text{C}_6$) im Vergleich zu normalen Aminosäuren, könnte man durch massenspektrometrische Messungen zeigen, dass keine oder nur geringe Unterschiede zwischen siRNA und mit SHP-2-Inhibitor behandelten Zellen existieren.

Weiterhin sollen die identifizierten, aktiven Verbindungen in sogenannten ADME-TOX Studien (Absorption, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung und Toxizität) untersucht werden die das Verhalten eines Wirkstoffes im Organismus beschreiben [99]. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit wie z.B.

Experimenten wie dem Caco-2-Assay [100] oder dem PAMPA-Assay [101] bei denen die Membranpermeabilität auf unterschiedliche Weisen bestimmt werden kann, stehen zur Verfügung. Als Metabolismus-Assays könnten Versuche mit dem Cytochrome P450 durchgeführt werden [102]. Zusätzlich sollen weitere SHP-2-abhängige Tiermodelle zur Vorbereitung von präklinischen Studien etabliert werden. Die SHP-2-Inhibitoren können zusätzlich zur Erforschung der Bedeutung von SHP-2 signalabwärts von verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie PDGFR, FGFR und EGFR verwendet werden.

5 ENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG VON PTP-INHIBITOREN

5.1 Bekannte pTyr-Mimetika als Strukturvorlage

Die Entwicklung von spezifischen Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren kann ein leistungsfähiges Werkzeug für das Verständnis der *in vivo* Rolle dieser Proteine in der Signalübertragung sein. Die Identifizierung und Anwendung von neuen pTyr-Mimetika ist ein wichtiger Bestandteil des Inhibitor-Designs für PTPs. Wie im *Kapitel 2.5.4* beschrieben wird, besitzen alle potenten PTP-Inhibitoren ein geladenes pTyr-Mimetikum. Die stark anionische Natur dieser Inhibitoren verhindert jedoch signifikant die Zellgängigkeit und orale Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen [11]. Aminosäuren, die das pTyr flankieren, tragen mit einem hohen Anteil zur Bindung des Substrates bei. Das pTyr selber ist sehr wichtig für die PTP-Erkennung von Substraten. Jedoch ist die pTyr-Gruppe nicht ausreichend für eine affine Bindung mit einer signifikanten inhibitorischen Wirkung bei PTPs. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei Fehlen der Phosphatgruppe oder eines entsprechenden Mimetikums in der Peptidsequenz keine Bindung mit der Phosphatase stattfindet. Arbeiten von Burke *et al.* führten zu der Entdeckung des nicht-hydrolyzierbaren isosterischen pTyr-Mimetikum Difluormethylphosphonat (DFMP), in dem der Sauerstoff des Phosphorylestere durch eine Difluormethyl-Gruppe ersetzt wurde (Abb. 62) [103]. Durch die Einführung von DFMP in peptidische oder nicht-peptidische Gerüste wurden PTP-Inhibitoren im nanomolaren Bereich identifiziert. Unlängst war dieses Isoster noch das aktivste pTyr-Mimetikum.

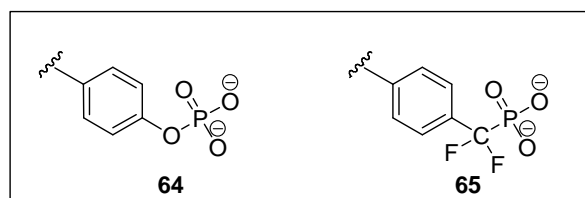


Abb. 62: Chemische Struktur von pTyr (64) und DFMP (65)

Das pTyr-Mimetikum DFMP **65** besitzt einen K_i -Wert von 2,5 mM bei PTP1B, im Vergleich dazu hat das Substrat pNPP einen K_m -Wert von 1,3 mM.

Das pTyr und das DFMP wurden in einem Dockingexperiment mit der Kristallstruktur 1U2P von MptpA untersucht (Abb. 63). Dabei handelt es sich um

eine farbkodierte Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials auf der Connolly-Oberfläche der Kristallstruktur (generiert durch das Programm Sybyl, MOLCAD). Die rotgefärbten Flächen deuten auf hohe negative elektrostatische Potentiale hin, während die blaugefärbten gleichbedeutend mit hohen positiven Potentialen der Oberflächenregionen sind. Die Analyse der Wechselwirkungen von pTyr in der katalytischen Tasche von MptpA zeigt eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen, es werden zwei mit Isoleucin 15, eine mit Cystein 16 und drei mit Arginin 17 und der Phosphonatgruppe gebildet (Abb. 62, links). Zusätzlich wechselwirkt Glycin 13 mit dem Sauerstoffatom der Esterfunktion und Tyrosin 129 mit dem aromatischen Ringsystem des pTyr. Im Vergleich dazu besitzt das DFMP ebenfalls viele Interaktionen der Phosphatgruppe mit Aminosäureresten in der katalytischen Tasche (Abb. 62, rechts). Durch die stark ionische Wechselwirkung in der positiv geladenen Tasche, wird eine feste Bindung ausgebildet.

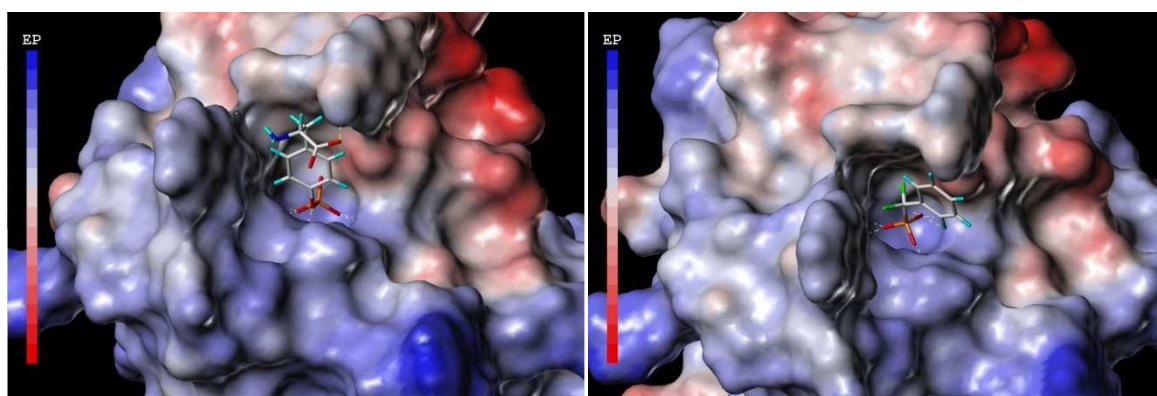


Abb. 63: Farbkodierte Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials von MptpA (*IU2P*) mit pTyr (links) und DFMP (rechts)

Der Forschungsschwerpunkt bei der Entwicklung von kleinen Molekülen als PTP-Inhibitoren hat sich vorwiegend auf die Identifizierung von pTyr-Mimetika gelegt [104]. Zwei verschiedene Arbeitsgruppen von *Astra Zeneca* und *Incyte Corporation*, die sich mit der Entwicklung von PTP1B-Inhibitoren beschäftigen, haben unabhängig voneinander einen fünfgliedrigen Heterozyklus als neues pTyr-Mimetikum identifiziert.

Mit Hilfe des strukturbasierten Designs und einer fragmentbasierten NMR-Screening-Strategie identifizierten Black *et al.* das Thiazolidinon (TDZ) als potentes pTyr-Mimetikum bei PTP1B [105]. Der darauf basierend entwickelte Inhibitor besitzt einen IC_{50} -Wert von 2,5 μ M (Abb. 64).

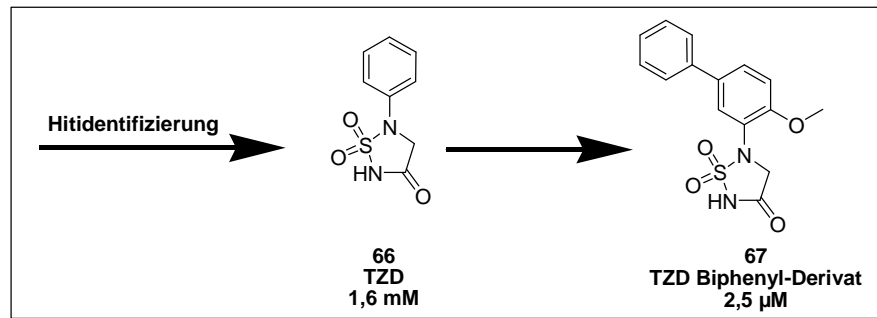


Abb. 64: Entwicklung des TZD-basierten ptyr-Mimetikum [105]

Zeitgleich verwendeten Forscher von *Incyte Corporation* ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign zur Entwicklung von PTP-Inhibitoren [50]. Durch genaue Untersuchungen und Vergleich der veröffentlichten PTP1B-Kristallstrukturen mit Inhibitoren aus der PDB-Datenbank wurden die bekannten pTyr-Mimetika und deren multiple Wasserstoffbrückenbindungen in der katalytischen Tasche der Phosphatasen analysiert. Dabei zeigten das Difluoromethylphosphonat **65** (DFMP, Abb. 62) und die Carboxymethylsalicylsäure **68** (CMS, Abb. 65) eine besondere und komplementäre Bindung mit den hochpolarisierten Resten der Aktivtasche.

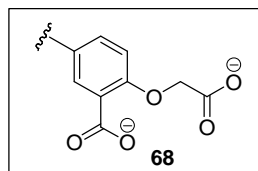


Abb. 65: Chemische Struktur von Carboxymethylsalicylsäure (CMS)

Die genaue Analyse der beiden Verbindungen in der Kristallstruktur von PTP1B ergab, dass durch die unterschiedlichen Bindungsmodi verschiedene Wassermoleküle ersetzt werden (Abb. 66). Die Wechselwirkungen dieser Überlagerung kann durch einen Heterozyklus wie ein Thiazolidinon (TZD) oder ein Isothiazolidinon (IZD) (Abb. 66d, 67, Verbindung **69** und **70**) nachgeahmt werden. In Folge dessen werden alle drei Wassermoleküle in der katalytischen Tasche ersetzt.

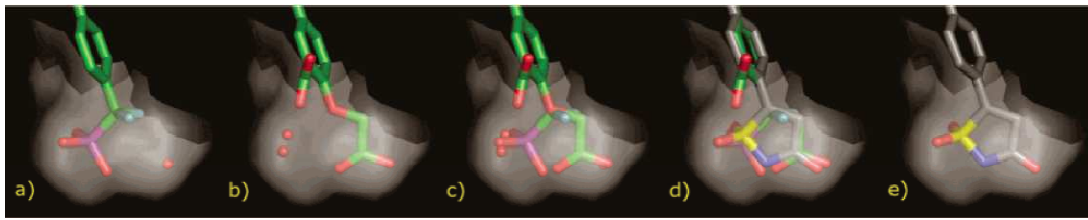


Abb. 66: Struktur-basiertes Design des IZD als heterocyclisches pTyr-Mimetik [50]

a) DFMP Inhibitor und Wassermolekül in PTP1B, b) CMS Inhibitor mit 2 Wassermolekülen in PTP1B, c) Überlagerung der beiden Strukturen, die die Entstehung des fünfgliedrigen Heterozyklus, d) Designer IZD Heterozyklus mit den beiden Originalstrukturen überlagert, e) IZD alleine

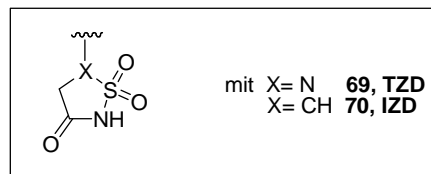


Abb. 67: Chemische Struktur von TZD 69 und IZD 70

Der auf diesem Ansatz basierte Inhibitor, ein in ein Tripeptid eingebauter (S)-IZD-Baustein, besitzt einen IC_{50} -Wert von 40 nM und stellt damit das zurzeit aktivste pTyr-Mimetikum dar. Die Optimierung dieser Strukturen als PTP-Inhibitoren ist bis heute nicht abgeschlossen. Im Moment liegt der Fokus auf der Substitution des vorhandenen Peptidgerüsts. Der zunächst als optimale Substitution gefundene Benzimidazol-Rest wurde inzwischen, aufgrund der schlechten Resultate bei der Strukturoptimierung, durch Imidazolin und Imidazol ersetzt (Abb. 68) [106] [107].

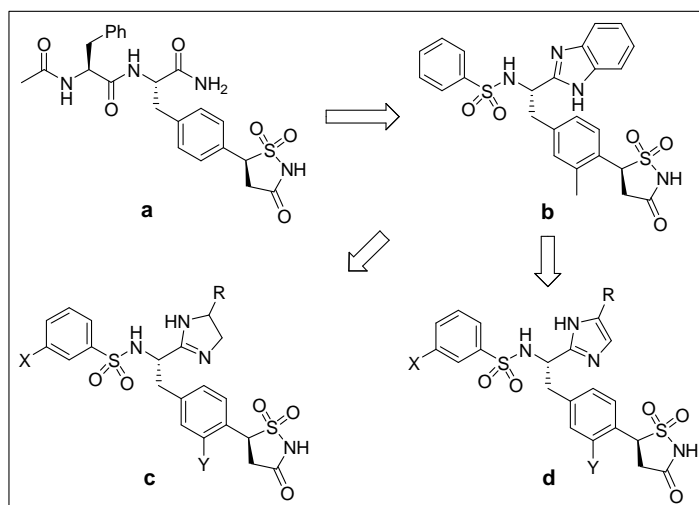


Abb. 68: Strukturoptimierung vom Tripeptid (a) über das Benzimidazol (b) zum Imidazolin (c) und Imidazol (d) [107]

Huang *et al.* entwickelten 2002 mit den beiden Resten, der Trifluormethylsulfonyl (TFMS)- und der Trifluormethylsulfonylamido (TFMSA)-Gruppe, eine neue Serie von pTyr-Mimetika (Abb. 69) [11]. Die Substitution der sauren OH-Gruppe der Benzolsulfonsäure **71** durch einen elektronegativen und neutralen Trifluormethylrest führt zu der ungeladenen Verbindung **72** mit dem TFMS-Rest, die gleichermaßen ein guter Akzeptor von Wasserstoffbrückenbindungen ist. Eine Weiterentwicklung führte zu einer Verbindung mit dem TFMSA-Rest **73**.

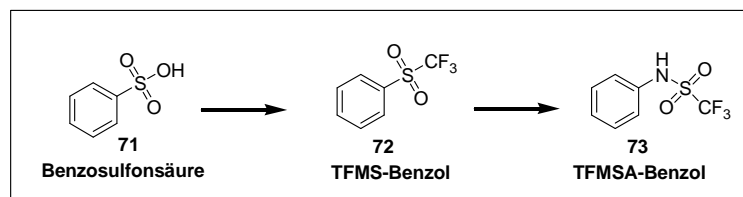


Abb. 69: Entwicklung der TFMS- und TFMSA-Gruppe ausgehend von der Benzosulfonsäure [11]

Die TFMS-Gruppe zeigt in den Dockingexperimenten mit der Phosphatase PTP1B vergleichbare Wechselwirkungen wie das Phosphotyrosin in der Aktivtasche, wobei die Fluoratome eine wichtige Rolle spielen. Die divalenten Verbindungen **A-E** mit unterschiedlichen Resten zeigten Hemmungen im mikromolaren Bereich (Abb. 70).

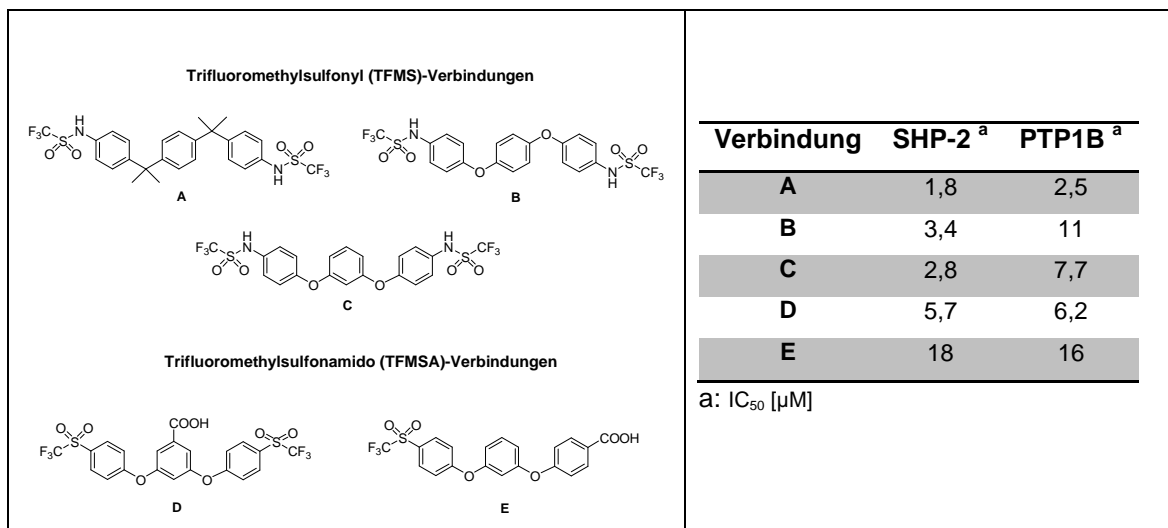


Abb. 70: Beispiele für PTP-Inhibitoren und deren IC₅₀-Werte [11]

5.2 Synthese und Validierung der Fragmentbibliothek

Die Abbildung 71 zeigt schematisch den in meiner Arbeit verwendeten Prozess zur Identifizierung von Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren basierend auf neu entwickelten pTyr-Mimetika. Nach Auffinden eines moderat-aktiven pTyr-Mimetikums durch die Validierung einer synthetisierten Fragmentbibliothek im Enzymassay, wird das Fragment chemisch so modifiziert, dass es in Kupplungsreaktionen mit z.B. Aminen einsetzbar ist. Die auf diesem Wege dargestellten Verbindungen werden anschließend im Enzymassay auf ihre inhibitorische Aktivität validiert.

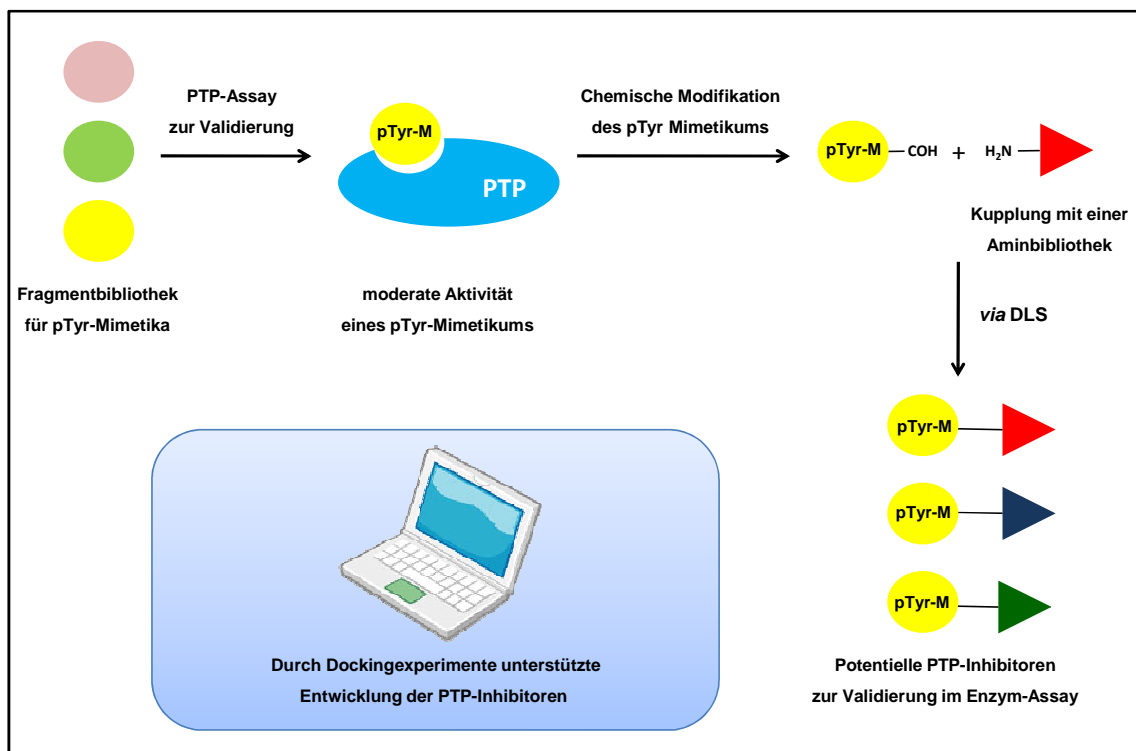


Abb. 71: Schematischer Ablauf zur Identifizierung von potentiellen PTP-Inhibitoren

Als Ausgangspunkt der Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine kleine Bibliothek von Verbindungen mit möglichen pTyr-Mimetika synthetisiert. Die Phosphatfunktionalität wurde basierend auf den publizierten Ergebnissen z.B. durch eine Sulfonamido-, Acylsulfonamido- oder Sulfamidgruppe ersetzt (Kapitel 5.1). Diese Fragmente mit den potentiellen pTyr-Mimetika-Gruppen wurden anschließend im Phosphatase-Assay mit dem Substrat pNPP auf ihre Enzymaktivität und Eigenschaft als pTyr-Mimetikum gegenüber der ZielpHosphatase MptpA hin untersucht. Diese Untersuchungen wurden durch

Dockingexperimente der Verbindungen in die Kristallstruktur von MptpA unterstützt (Dr. Michael Lisurek, AG Kühne). In der RCSB Proteindatenbank befinden sich zwei Kristallstrukturen von MptpA, die Struktur *1U2P* ohne Ligand und *1U2Q* mit einem Glycerol in der Aktivtasche [46]. Die Überlagerung dieser beiden Kristallstrukturen zeigt im Allgemeinen eine gute Übereinstimmung, jedoch existiert eine auffällige Abweichung. Der Tryptophanrest in der Kristallstruktur mit Ligand klappt an die Seite der katalytischen Tasche (Abb. 72, blau dargestellt).

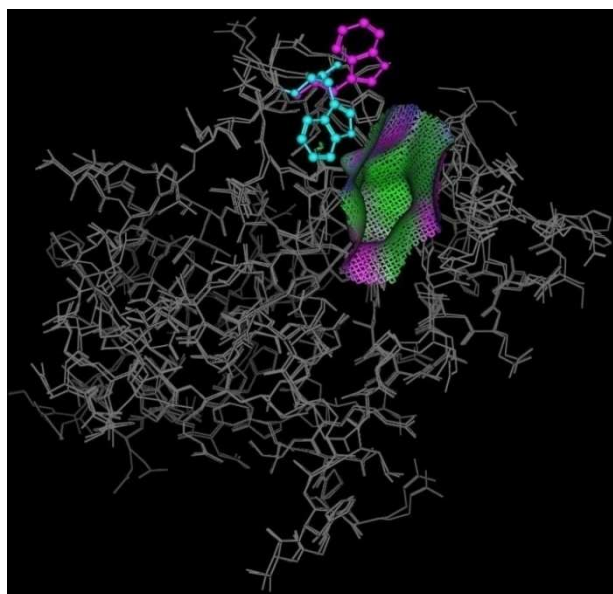


Abb. 72: Überlagerung der beiden Kristallstrukturen von MptpA, *1U2P* (rosa) und *1U2Q* (blau)

Diese Veränderung macht die tiefe Tasche von MptpA schwerer für einen Liganden erreichbar und ist deswegen für die Dockingexperimente nicht geeignet. Die anschließenden Simulationen der zu untersuchenden Verbindungen wurden mit der Struktur *1U2P* durchgeführt.

5.2.1 Synthese und Validierung von zyklische Fragmenten

Aufgrund der interessanten strukturbasierten Entwicklungen von pTyr-Mimetika von Black *et al.* [105] und Combs *et al.* [50] wurde der Fokus der eigenen Arbeit ebenfalls zunächst auf heterozyklische Grundstrukturen gelegt, die nachfolgend exemplarisch diskutiert werden. Aufgrund einer ähnlichen Struktureinheit und einem leichten synthetischen Zugang wurden zyklische Verbindungen wie das Benzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid **75** ausgewählt und dargestellt (Abb. 73) [108].

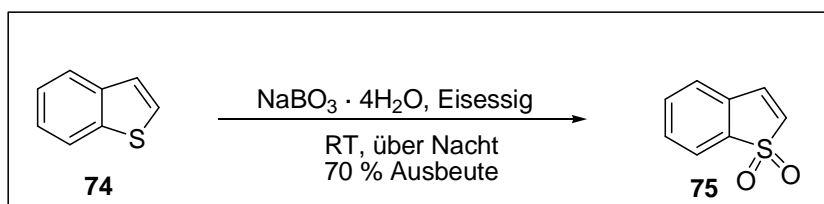


Abb. 73: Darstellung des Benzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid 75

Das Benzothiophen wird mit Natriumperborat Tetrahydrat in Eisessig umgesetzt. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 70 % isoliert werden. Sulfonamidreste, sowie die Sulfonamide und die Sulfamate gelten weithin in der Medizinischen Chemie als optimal für das Design von biologisch aktiven Verbindungen [109]. Demzufolge wurden zyklische Sulfonamide in dieser Arbeit aufgrund ihrer interessanten Struktureinheit untersucht. Das 1,3-Dihydro-2,1,3-benzothiadiazol-2,2-dioxid **78** konnte aus *o*-Phenylendiamin **76** mit Schwefelsäurediamid **77** in Diglyme quantitativ dargestellt werden [110].

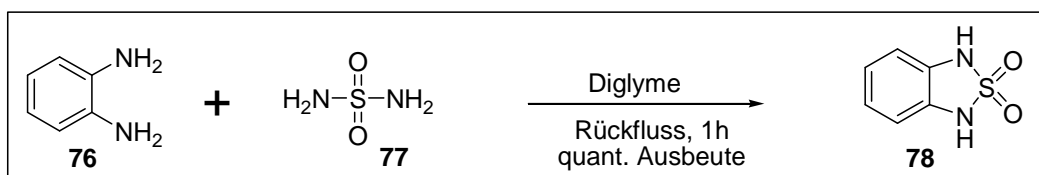
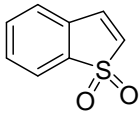
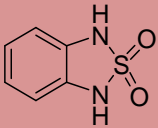
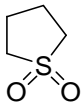
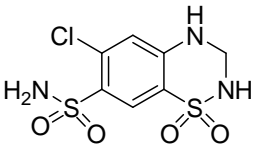
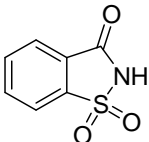


Abb. 74: Darstellung des 1,3-Dihydro-2,1,3-benzothiadiazol-2,2-dioxid 78

Anschließend wurden die beiden synthetisierten Fragmente **75**, **78** und drei weitere, kommerziell erwerbliche Substanzen (**79-81**) in einem Phosphatase-Assay mit dem Substrat *p*NPP-Assay auf ihre Aktivität gegenüber MptpA untersucht (Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht der zyklischen Verbindungen gegen MptpA

Bezeichnung	Struktur	Ausbeute (%)	IC ₅₀ -Wert ^a MptpA [μM]
75		70	> 5000
78		quantitativ	857
79		kommerziell erhältlich	> 5000
80		kommerziell erhältlich	> 5000
81		kommerziell erhältlich	> 5000

a: Bestimmung der IC₅₀-Werte im pNPP-Assay

Das Benzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid **75** zeigte keine Aktivität im Enzymassay. Die Verbindung **78**, das 1,3-Dihydro-2,1,3-benzothiadiazol-2,2-dioxid, besitzt einen IC₅₀-Wert von 857 μM. Die moderate Aktivität der Verbindung **78** verglichen mit Werten von bekannten pTyr-Mimetika stellt dieses Fragment als einen guten Ausgangspunkt für weitere synthetische Optimierungen dar. Sulfolan (**79**) besitzt eine einfache und kleine Struktureinheit der untersuchten Verbindungen dar, zeigte jedoch beim Versuch im Enzymassay keine inhibitorische Aktivität. Das Hydrochlorothiazid **80** und Saccharin **81** haben ebenfalls keinen Einfluss auf die Hemmung der Enzymaktivität von MptpA.

Die Wechselwirkungen der aktivsten Verbindung **78** mit einem IC₅₀-Wert von 857 μM wurden in einem Dockingexperiment mit der Kristallstruktur von MptpA analysiert (Abb. 75).

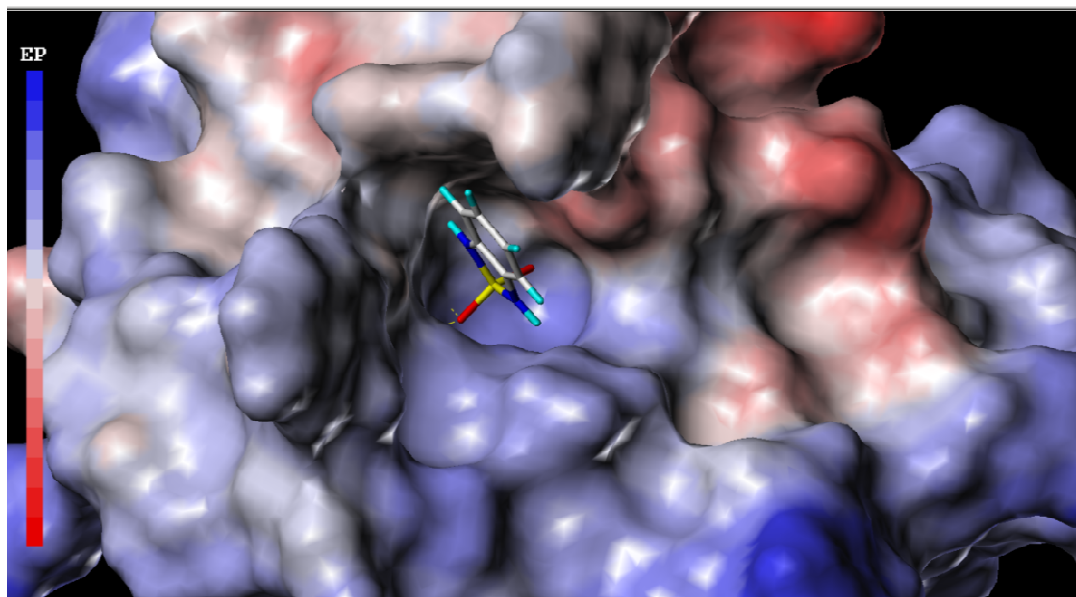


Abb. 75: Farbkodierte Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials von MptpA (1U2P) mit Verbindung 78

Das 1,3-Dihydro-2,1,3-benzothiadiazol-2,2-dioxid **78** ragt mit der SO₂-Gruppe in die katalytische Tasche. Ein Sauerstoffatom der Sulfonamidgruppe interagiert mit dem Isoleucin 15 und dem Cystein 16. Die bipyridinische Struktur hat laut dieser Vorhersage ausreichend Platz im katalytischen Spalt. Die dargestellten Wechselwirkungen finden jedoch nicht direkt am Boden der Aktivtasche statt. Das spiegelt sich auch im moderaten IC₅₀-Wert von 857 µM gegenüber MptpA im Enzymassay wieder.

5.2.2 Fragmente mit einer Trifluormethylsulfonyl- oder Trifluormethylsulfonamido-Gruppe

Im Gegensatz zu den veröffentlichten bidentaten PTP-Inhibitoren von Huang *et al.* mit der Trifluormethylsulfonyl (TFMS)- und der Trifluormethylsulfonamido (TFMSA)-Gruppe sollen in dieser Arbeit beide Gruppen als monovalentes Fragment untersucht werden, um ihre Aktivität als pTyr-Mimetikum im Enzymassay zu bestimmen (Abb. 70, Kapitel 5.1) [11].

Die Synthese dieser Verbindungen geht vom entsprechenden Amin aus, das unter basischen Bedingungen mit dem Trifluormethansulfonsäureanhydrid umgesetzt wird (Abb. 76) [11]. Dabei wurden drei Amine (**82a-c**) mit unterschiedlich langen Linkern zur Trifluormethylsulfonamido-Gruppe verwendet. Die Ausbeuten lagen zwischen 44-71 %.

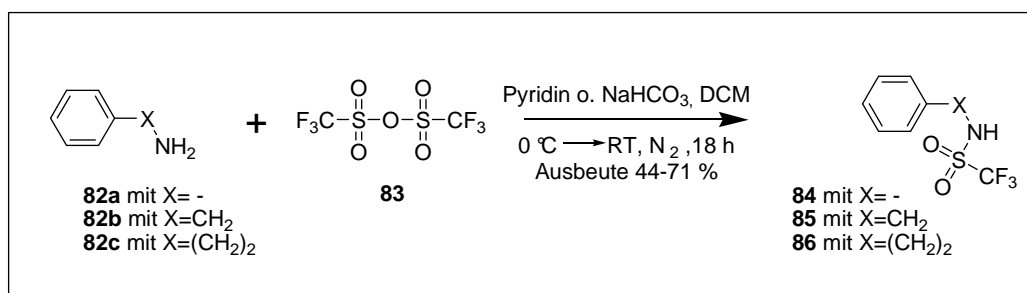


Abb. 76: Darstellung der Verbindungen mit Trifluormethylsulfonamido-Gruppe anhand der Verbindung **84**, **85** und **86**

Weiterhin wurde diese Gruppe variiert und Verbindungen mit Trifluormethylacylsulfonamid-Resten dargestellt. Eine Methode zur Darstellung dieser Moleküle ist die Verwendung der entsprechenden Carbonsäure **87** mit Trifluormethansulfonamid **88** (Abb. 77). Die Verbindung konnte mit einer Ausbeute von 63 % isoliert werden.

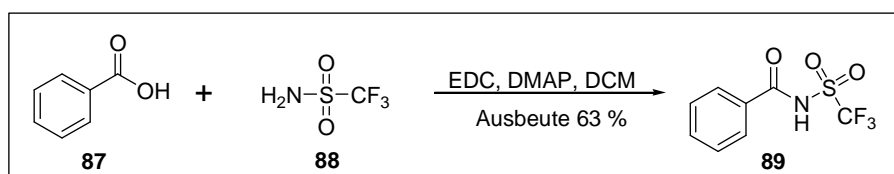


Abb. 77: Darstellung der Verbindung **89**

Zusätzlich wurde noch eine Methylengruppe als Linker eingeführt. Dafür wurden drei verschiedene Acetylchlorid-Verbindungen **90a-c** mit Trifluormethansulfonamid **88** unter basischen Bedingungen gekuppelt, um die Verbindungen **91-93** zu erhalten (Abb. 78) [111]. Die Ausbeuten lagen zwischen 51-76 %.

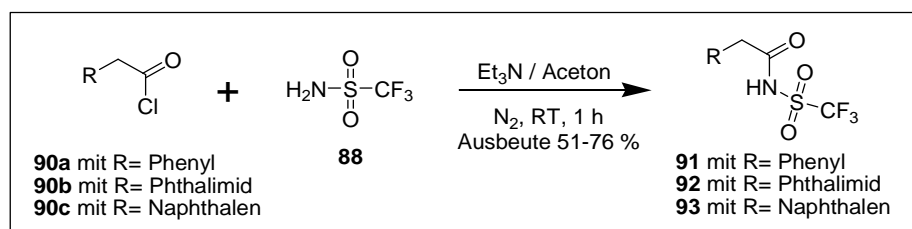


Abb. 78: Darstellung der Verbindung **91-93**

Weiterhin wurden Substanzen untersucht, die eine von Resten flankierte Acylsulfonamid-Gruppe besitzen. Acylsulfonamide sind bekannt für die Verwendung beim Design von PTP-Inhibitoren [112]. Die Verbindungen wurden

durch Kupplung von Benzolsulfonamid **94** mit Carbonsäurederivaten **95a-c** mit Hilfe von EDC und DMAP dargestellt. Die Produkte **96-98** konnten mit Ausbeuten von 22-42 % isoliert werden.

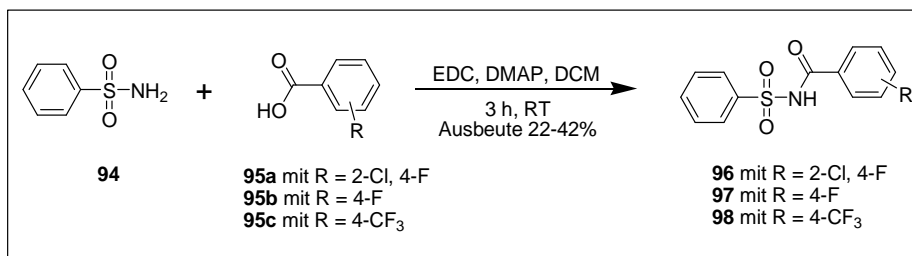
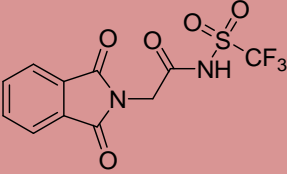
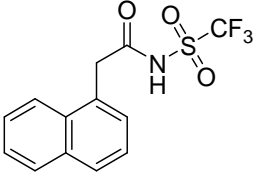
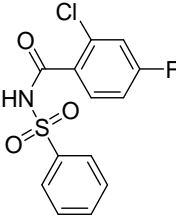
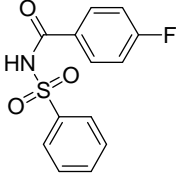
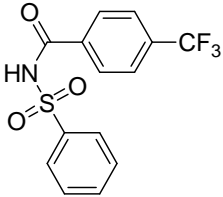


Abbildung 79: Darstellung von 96-98

Die insgesamt zehn Verbindungen mit vier unterschiedlichen Struktureinheiten wurden in einem pNPP-Assay auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber MptpA untersucht (Tabelle 14).

Tabelle 14: Übersicht über die getesteten Verbindungen mit MptpA

Bezeichnung	Struktur	Ausbeute (%)	IC ₅₀ -Wert ^a MptpA [μM]
84		71	534
85		46	3195
86		44	> 5000
89		63	1860
91		76	824

92		51	352
93		51	765
96		42	615
97		38	500
98		22	427

a: Bestimmung der IC_{50} -Werte im $pNPP$ -Assay

Die drei Verbindungen mit der Trifluormethylsulfonamid-Gruppe (**84-86**) zeigen abhängig von der Länge des Linkers (keine, eine oder zwei Methylengruppen) moderate Aktivitäten im Enzymassay. Dabei war das kleinste Molekül, Verbindung **84** mit einem IC_{50} -Wert von 534 μM das aktivste Fragment. Die Verbindung **89** mit dem Trifluormethylacetylsulfonamid-Rest ohne Methylene-Linker besitzt einen IC_{50} -Wert von fast 2 mM und liegt damit im Bereich von Substraten wie $pNPP$. Die drei Verbindungen **91-93** tragen alle eine Methylene-Gruppe zwischen dem variablen Arylrest und der Trifluormethylacetylsulfonamid-Gruppe. Die Verbindung **92** mit dem Phthalimidrest zeigt die bisher höchste Aktivität einer Verbindung im Enzymassay mit 352 μM gegenüber MptpA. Die getesteten Verbindungen **96-98** bei denen die Acetylsulfonamid-Gruppe flankiert ist, haben eine inhibitorische Aktivität im mittleren mikromolaren Bereich (400-600 μM).

Zur Darstellung des Bindungsmodus in der katalytischen Tasche von MptpA wurden die Verbindungen **84**, **92** und **98** (Abb. 80a-c) in einem Dockingexperiment mit der Kristallstruktur (*1U2P*) untersucht.

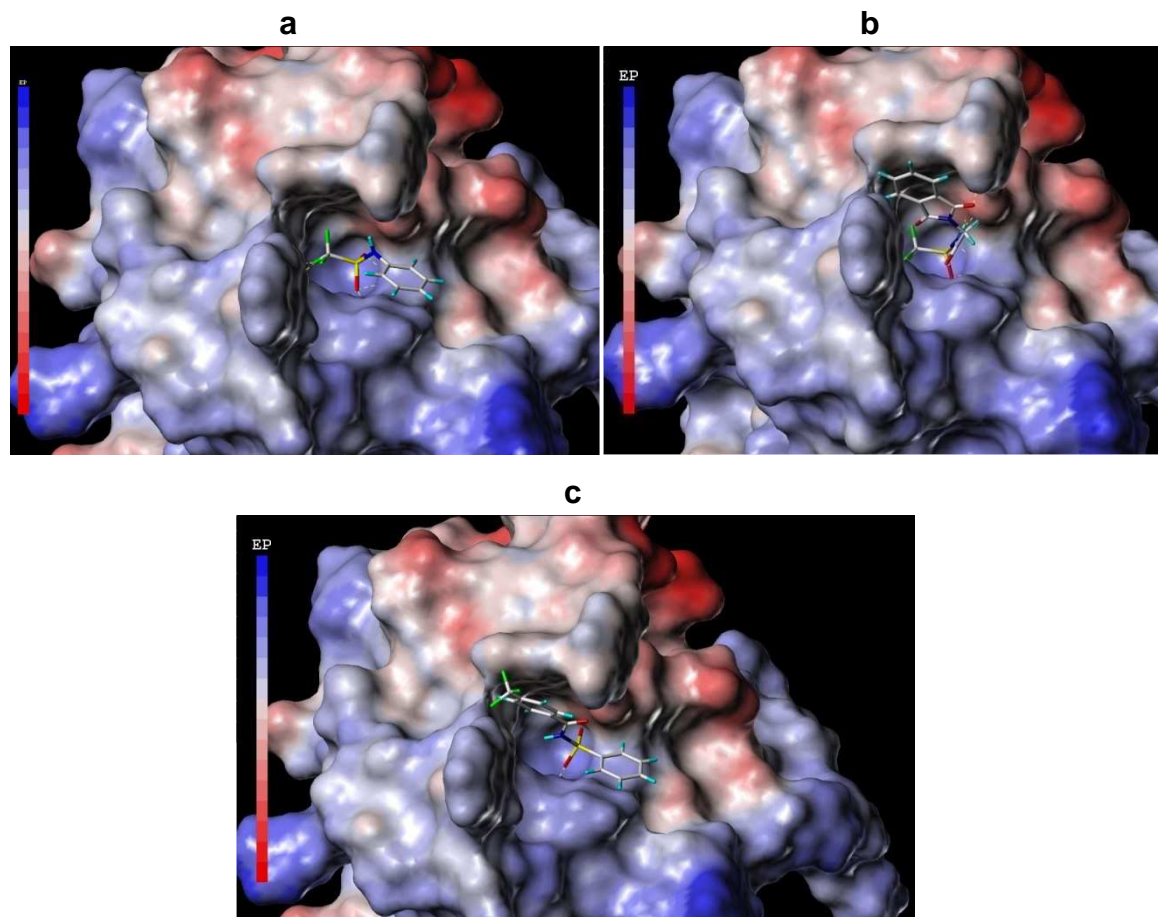


Abb. 80: Farbkodierte Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials von MptpA (*1U2P*) mit **84** (a), **92** (b) und **98** (c)

In diesem Modell besitzt die Trifluormethylgruppe der Verbindung **84** zwei Wasserstoffbrücken zu Isoleucin 15 und Cystein 16 (Abb. 80a). Die SO₂-Gruppe geht fünf Interaktionen mit Glycin 13, Threonin 12 und Arginin 17 ein. Diese Wechselwirkungen der Trifluormethylsulfon-Gruppe finden tief in der katalytischen Tasche statt, vergleichbar mit der Verbindung **92** (Abb. 80b). Zusätzlich gibt es hier noch zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der NH-Gruppe und dem Asparagin 126. Das Sauerstoffatom des Phthalimid-Restes interagiert mit Tyrosin 129. Diese erhöhte Anzahl von Wechselwirkungen in der katalytischen Tasche kann somit zu der etwas höheren inhibitorischen Aktivität im Enzymassay von 352 µM im Gegensatz zur Verbindung **90** mit 534 µM führen.

Das Ergebnis der Analyse des Bindungsmodus von **98** mit MtpA (Abb. 80c) ergab nur eine Wechselwirkung der SO₂NH-Gruppe mit Glycin 13. Die flankierenden Reste verhindern die Wechselwirkung mit der katalytischen Tasche und somit eine optimale Hemmung der Phosphatase. Diese Verbindungen eignen sich laut Vorhersage somit nicht für die weitere Verwendung als potentielle Fragmente für pTyr-Mimetika, sondern eher als zusätzliche Gruppen an einem Inhibitorgrundgerüst, um weitere Wechselwirkungen aufzubauen.

5.2.3 Bewertung der Verwendung als pTyr-Mimetikum

Die Untersuchungen der kleinen Fragmentbibliotheken zeigten einige gute Startpunkte für eine weitere Untersuchung dieser aktiven Fragmente als potentielle pTyr-Mimetika. Bei den zyklischen Fragmenten konnte Verbindung **78** mit einem IC₅₀-Wert von 857 µM identifiziert werden. Es ist vergleichsweise schwer auf dem Gebiet der Heterozyklen mögliche Struktureinheiten zu identifizieren, die die notwendigen Wechselwirkungen in der katalytischen Tasche eingehen können, da aufgrund ihrer rigideren Strukturen die benötigte Flexibilität nicht gegeben ist. Außerdem ist der synthetische Zugang schwieriger als bei der Einführung von terminalen Resten.

Die terminalen potentiellen pTyr-Mimetika wie Verbindung **84** und **92** stellen gute Startpunkte für eine weitere Untersuchung und Optimierung dar. Der einfache Zugang dieser Reste ermöglicht eine schnelle Erweiterung des Moleküls, um zu untersuchen, welche Struktureinheiten eine Aktivität erhöhen können.

Die Dockingexperimente der Strukturen mit einem flankierten pTyr-Mimetika zeigten, dass bei einer engen und tiefen PTP-Tasche diese Struktureinheiten mit den auf beiden Seiten flankierenden Resten Probleme aufweisen, tief in der Tasche zu interagieren. Trotzdem weisen sie gute IC₅₀-Werte zwischen 427-616 µM auf. Mit Unterstützung von Dockingexperimenten konnten somit 5 Fragmente identifiziert werden, die eine moderate Aktivität gegen MtpA zeigen. Davon ist eine Verbindung zyklisch, eine Verbindung besitzt die Trifluormethylsulfonamido-Gruppe und drei die Acylsulfonamido-Gruppe. Es konnte gezeigt werden, dass es durch rationales Design möglich ist, neue Startpunkte für potentielle pTyr-Mimetika zu finden.

Aufgrund der simplen Struktur mit vergleichsweise hoher Aktivität und leichtem synthetischen Zugang wurde die Verbindung **84** ausgewählt, um sie in weiteren Experimenten zu optimieren und anschließend weiter zu validieren.

5.3 *Synthese und Untersuchung des Aldehydes*

Basierend auf den vorherigen Untersuchungen im Phosphatase-Assay und in Dockingexperimenten scheint die Verbindung **84** optimale Eigenschaften für eine Anwendung als Ersatz für die pTyr-Gruppe zu besitzen. Im Vergleich zum pTyr-Fragment und DFMP vernetzt sich die Trifluormethylsulfonamid-Gruppe der Verbindung **84** laut Dockingexperimenten ebenfalls optimal mit Wasserstoffbrückenbindungen in der Aktivtasche von MptpA. Die Herausforderung ist es nun, die Verbindung so strukturell zu erweitern, dass die Aktivität und Selektivität erhöht werden kann. Dafür wurde die Verbindung in ein kupplungsfähiges Fragment umgewandelt. In diesem Fall wird eine Aldehydgruppe eingeführt. Es ist aber auch denkbar mit einer freien Amingruppe Kupplungsreaktionen mit z.B. Carboxylaten durchzuführen.

Identifizierte aktive pTyr-Mimetika sollen zusätzlich in einem fragmentbasierten Ansatz verwendet werden, um mit Hilfe dieser Methode neue potentielle PTP-Inhibitoren zu entwickeln.

5.3.1 Aldehydsynthese

Die Synthese des Aldehydfragmentes **103** lässt sich in vier Stufen unterteilen (Abb. 81). Die erste Reaktion ist die Schützung des Alkohols [113]. Der zweite Schritt ist die Triflierung der Amingruppe mit Hilfe von Trifluormethansulfonsäureanhydrid [114]. Die Entschützung der Alkoholfunktion wird mit TBAF durchgeführt [115]. Die Umwandlung der Alkoholgruppe zur Aldehydgruppe wird durch eine Oxidation mittels Manganoxid in Chloroform erhalten [116].

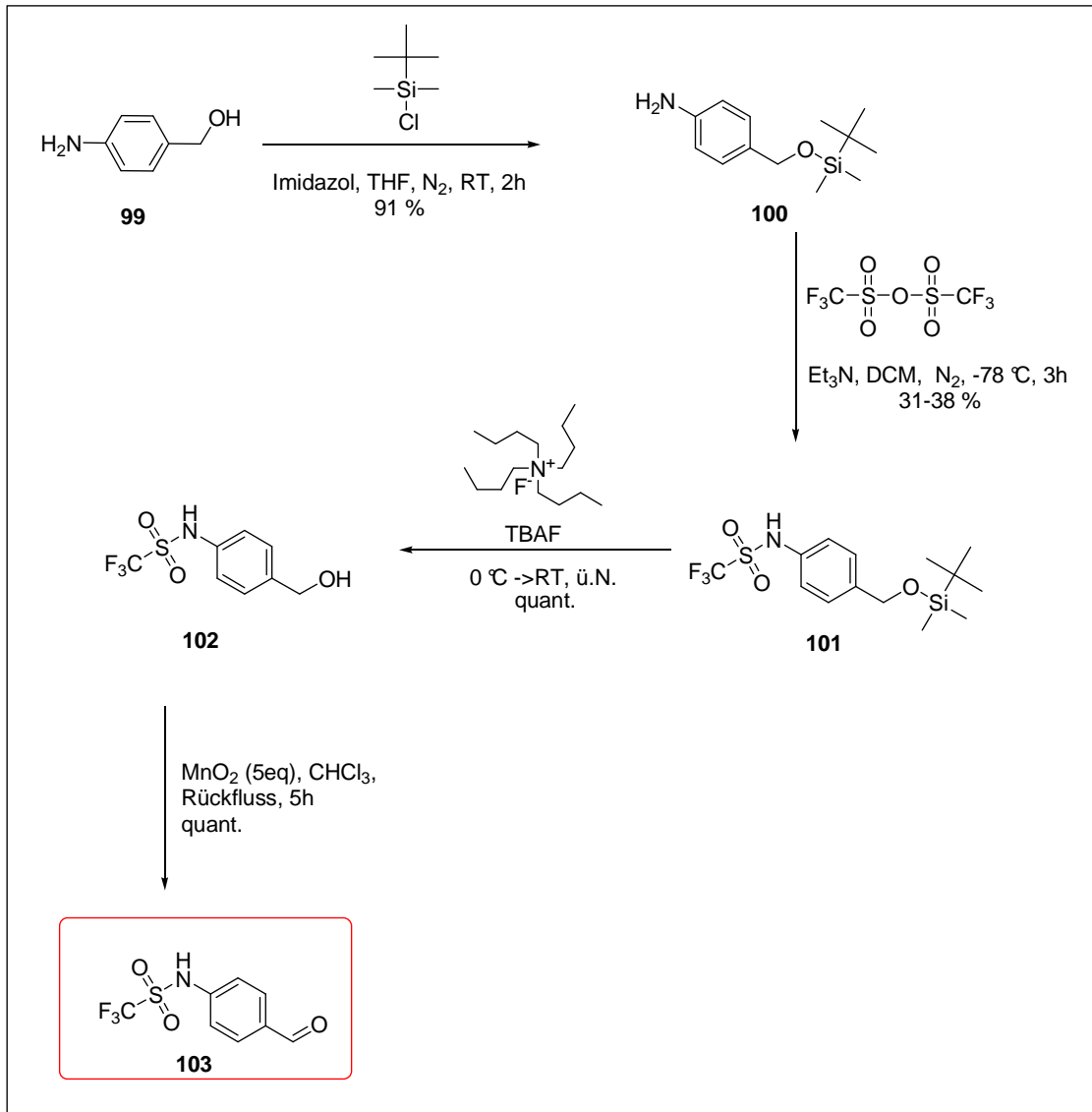


Abbildung 81: Darstellung der Verbindung 103

5.3.2 pK_s -Wert-Bestimmung des Aldehyds

Das Aldehyd **103** wurde auf seine Säurestärke hin untersucht. Für die Anwendung des Fragmentes als pTyr-Mimetikum ist der Ladungszustand wichtig, da die Membranpermeabilität davon abhängig sein kann. Daher wurde eine Titration durchgeführt (Abb. 82).

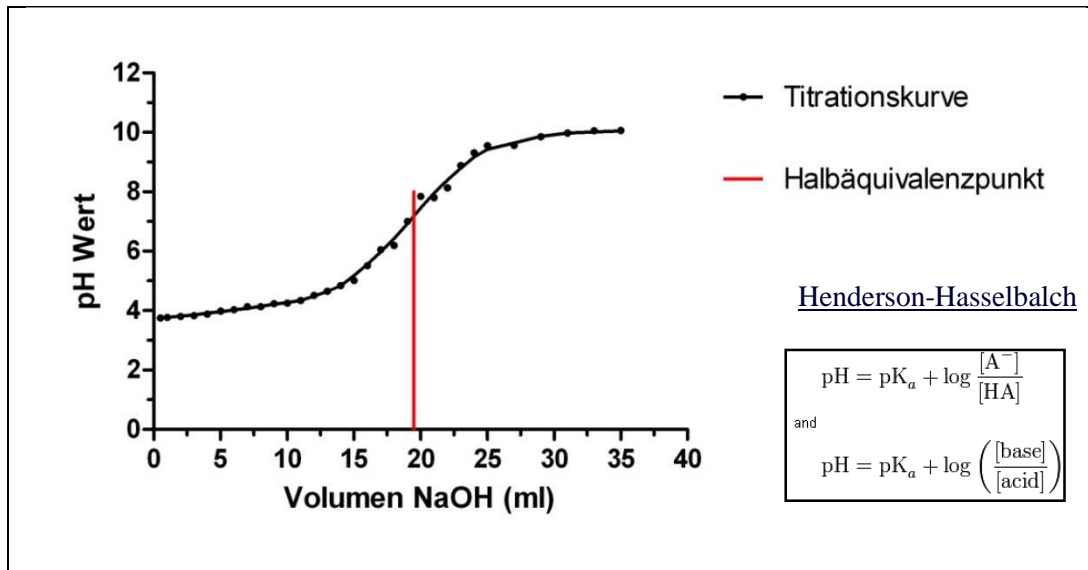


Abb. 82: Titrationskurve zur experimentellen Bestimmung de pK_s -Wertes von **103**

Der experimentell bestimmte pK_s -Wert von Verbindung **103** beträgt 7,2. Die Verbindung ist damit eine schwache Säure, die dementsprechend nicht vollständig dissoziiert vorliegt. Der pK_s -Wert von pTyr liegt zum Vergleich bei 5,8, der von DFMP im Bereich von 5,1 [117] [118], sie gehören zu den mittelstarken Säuren. Da das Gleichgewicht der Verbindung **103** laut pK_s -Wert auf der ungeladenen Seite liegt, spricht dieses Experiment für die Verwendung dieses Fragmentes als pTyr-Mimetikum.

5.3.3 Im Caco-2-Assay

Die Verbindung **103** wurde in einem weiteren wichtigen Experiment für Permeabilitätsuntersuchungen getestet. Der Caco-2-Assay wurde bei der Firma Apredica (USA) durchgeführt.

Der Caco-2-Assay ist eine nützliche Methode zur Vorhersage für humane Darmpermeabilität und Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Medikamenten [100]. Caco-2 Zellen sind humane, epitheliale Darmkrebszellen, die im Monolayer wachsen. Sie weisen damit eine physikalische und biochemische Barriere für Ionen und kleine Moleküle auf. Die Korrelation zwischen *in vitro* P_{app} mittels Caco-2 Experimenten und *in vivo* Versuchen ist bekannt [119]. Mit der Formel 3 ist der experimentell bestimmte Wert P_{app} definiert.

Formel 3

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{c_0 A}$$

dQ/dt = Rate der Permeabilität
 c_0 = Anfangskonzentration der Testverbindung
 A = Fläche des Monolayers

Für die apikale zur basolateralen Permeabilität (A → B) wird die zu testende Verbindung auf der apikalen Seite hinzugegeben und anschließend auf der basolateralen Seite die Konzentration der Verbindung mittels LC/MS/MS bestimmt (Abb. 83). Als Kontrolle für einen vollständig gebildeten Monolayer wird der nicht permeable Farbstoff Lucifer Yellow verwendet. Die Konzentration der Testverbindung ist 10 µM und der Versuch wurde für 2 Stunden durchgeführt. Durch die umgekehrte Richtung im Versuch (B → A) bekommt man Hinweise auf die Art des Transportes, der passiv oder aktiv sein kann.

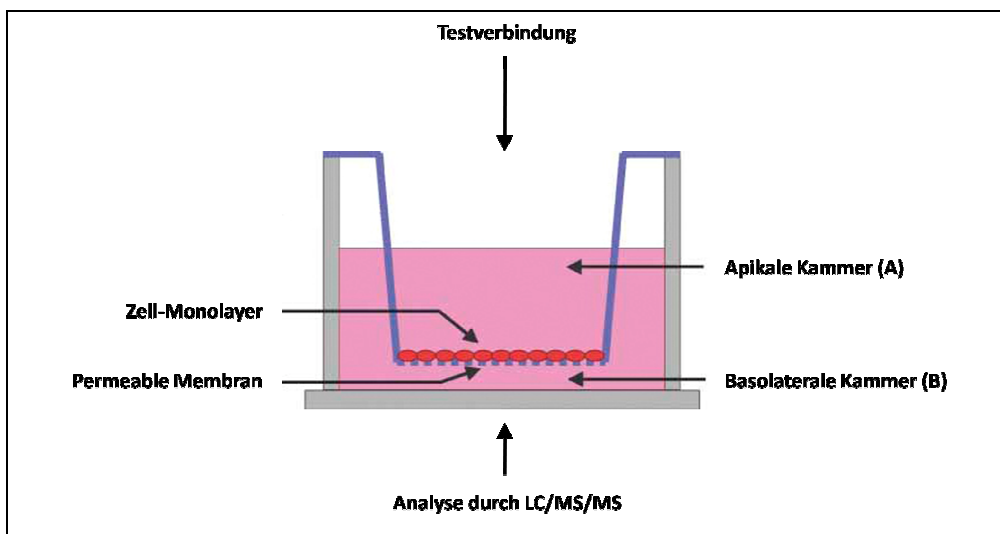


Abb. 83: Schematischer Aufbau eines Caco-2 Assays

Die Verbindung **103** besitzt einen Wert von $P_{app} = 24,5 (10^{-6} \text{ cm/s})$. Das ist eine moderate Permeabilität. Zum Vergleich hat die Positivkontrolle einen Wert von 45,1 und die Negativkontrolle 0,8. Aufgrund dieses Experimentes kann die ideale Eigenschaft in Bezug auf die Membranpermeabilität des Fragmentes **103** belegt werden. Die Verbindung **103** ist ein geeigneter Kandidat für die Weiterentwicklung zu einem potenten pTyr-Mimetikum.

5.3.4 Anwendung des Aldehydes

Eine mögliche Anwendung für das in dieser Arbeit identifizierte Aldehyd **103**, ist das dynamische Ligationsscreening, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Rademann entwickelt wurde [70]. Bei diesem Ansatz wird eine Kupplungsreaktion in Anwesenheit einer Phosphatase durchgeführt, um das Gleichgewicht dieser chemischen Reaktion auf die Produktseite zu verschieben. In diesem Fall soll ein Aldehyd mit einem Amin zu einem potentiellen Inhibitor reagieren. Gleichzeitig wird die Hemmung der Phosphatase durch die entstehende Verbindung mittels Substrat-Assay analysiert. Ein somit identifizierter Hit kann nachfolgend chemisch synthetisiert werden, um ihn anschließend im Enzymassay zu validieren. Diese Methode kann einen völlig neuen Zugang zu potenten Inhibitorclassen für Protein-Tyrosin-Phosphatasen bieten.

Bei Untersuchungen mit dem Aldehyd und der verwendeten Aminbibliothek in sechs verschiedenen Konzentrationen (300, 100, 50, 25, 12,6 und 6,25 μM , jeweils äquimolar) mit MptpA unter Verwendung des DiFMUP-Assays konnten keine Verbesserungen der inhibitorischen Wirkung der untersuchten Verbindungen identifiziert werden. Jedoch konnten bei diesen Experimenten aktive Amine gefunden werden (Kapitel 5.4).

In einem vergleichbaren Assaysystem wurde die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 untersucht. Hierbei konnte eine Verbindung mit verbesserter inhibitorischer Aktivität identifiziert werden (Abb. 84). Da die Verbindung mit verschiedenen Methoden chemisch nicht darstellbar war, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um ein falsch positives Ergebnis handelte. Daher wurde diese Verbindung nicht weiterverfolgt.

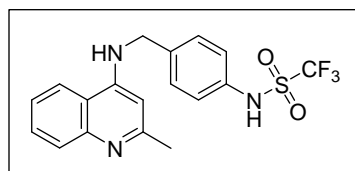


Abbildung 84: Chemische Struktur des falsch positiv Hits

5.4 Untersuchung der Aminbibliothek gegen MptpA, SHP-2 und SHP-1

Die Aminbibliothek besteht aus 886 Verbindungen mit überwiegend aromatischer Struktur. Um neue Struktureinheiten für die Entwicklung von Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren zu identifizieren wurde die gesamte Substanzbibliothek mit den Phosphatasen MptpA, SHP-2 und SHP-1 untersucht und die IC_{50} -Werte bzw. Enzymaktivitäten (bei 100 μ M Konzentration der Verbindungen) bestimmt (Abb. 85). Die gefundenen Verbindungen können dann anschließend mit geeigneten Kupplungspartnern wie Carbonsäurederivaten mit einem pTyr-Mimetikum verknüpft und auf ihre Aktivität im Enzymassay geprüft werden.

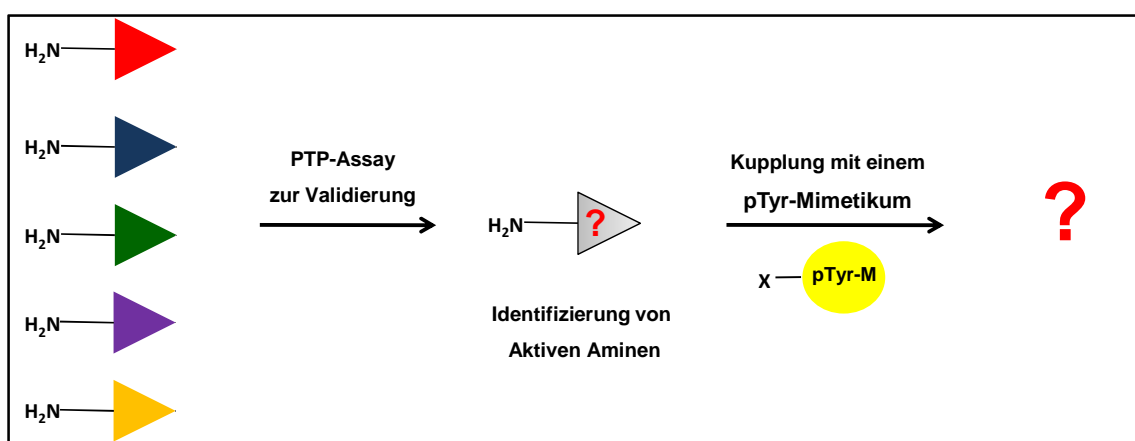


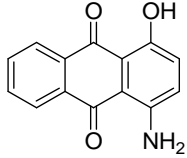
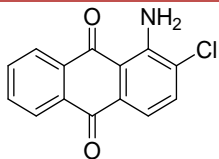
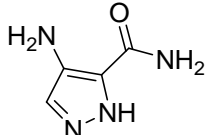
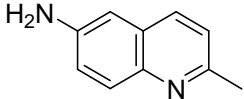
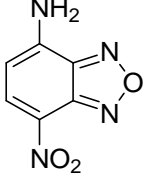
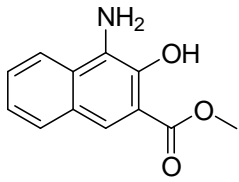
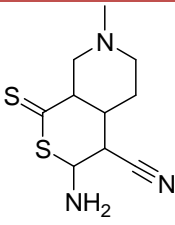
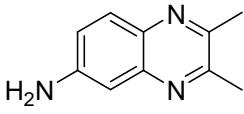
Abbildung 85: Untersuchung und Validierung der Aminbibliothek

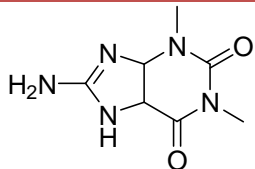
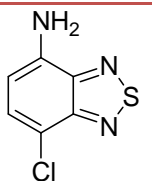
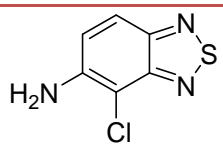
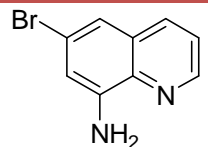
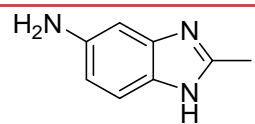
Die Untersuchung der Aminbibliothek im Enzymassay gegen MptpA ergab 87 Hits, die bei einer Konzentration von 300 μ M eine Aktivitätsminderung des Enzyms größer als 60 % zeigten. Davon zeigen 41 Verbindungen sogar eine Aktivitätsminderung von 80 %. Diese Verbindungen wurden genauer untersucht und IC_{50} -Werte bestimmt. Es wurden 12 Amine mit überwiegend aromatischer Struktur gefunden, die einen IC_{50} -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich zwischen 4 und 19 μ M zeigten.

Bei den hier neben MptpA verwendeten Enzymen handelt es sich zum einen um die katalytische Domäne von SHP-2 und zum anderen um SHP-1 in der vollen Länge. Für das Enzym SHP-2 konnten 7 Amine identifiziert werden, die die Enzymaktivität bei einer Konzentration von 100 μ M auf 2-59 % verringern können. Bei SHP-1 konnten insgesamt 13 Verbindungen gefunden werden. Von diesen Verbindungen zeigten zwei (**104** und **110**) eine Aktivität bei beiden

Enzymen auf. Verglichen mit den Hits, die bei MtpA gefunden worden sind, gibt es fünf Übereinstimmungen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht über die getesteten Amine gegen MtpA, SHP-2 und SHP-1

Bezeichnung	Struktur	MtpA (IC ₅₀ in μM) ^b	SHP-2 (Aktivität in %) ^{b,c}	SHP-1 (Aktivität in %) ^{b,c}
104		19	34	46
105		4	n.a.	n.a.
106		8	n.a.	19
107		5	n.a.	39
108		12	n.a.	40
109		13	n.a.	48
110		n.a.	2	1
111		14	n.a.	n.a.

112		13	n.a.	n.a.
113		8	n.a.	n.a.
114		12	n.a.	n.a.
115		11	n.a.	n.a.
116		8	n.a.	n.a.

b: Bestimmung der IC₅₀-Werte im DiFMUP-Assay

c: Enzymaktivität bei einer Konzentration von 100 µM der Testverbindung

n.a: nicht aktiv

Die hier identifizierten 13 Verbindungen können für eine Inhibitorentwicklung von Phosphatasen basierend auf diesen Gerüsten verwendet werden. Eine Möglichkeit wäre, die gefundenen Amine mit dem auf dieser Arbeit basierenden Fragment **II** zu koppeln und die Verbindung **III** auf die inhibitorische Aktivität gegen MptpA, SHP-2 und SHP-1 zu untersuchen (Abb. 86). Mit diesen Ergebnissen könnte man eine Aussage über das Potential der hier identifizierten Amine treffen.

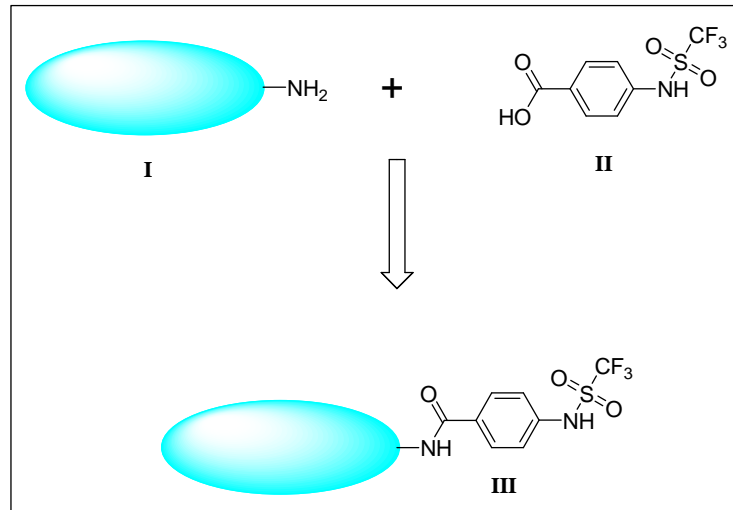


Abb. 86: Mögliche Anwendung eines potentiell aktiven Amins zu weiteren Untersuchungen

5.5 Synthese einer Verbindungsbibliothek mit einem pTyr-Mimetikum

Wie bereits in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, geht die Trifluormethylsulfonylamido-Gruppe zahlreiche Wechselwirkungen in der katalytischen Tasche der Phosphatase MtpA ein und stellt daher einen guten Ausgangspunkt für weitere Entwicklungen ausgehend von diesem Fragment dar (Kapitel 5.2.2).

Die einfache Synthese ausgehend von einem Amin und Trifluormethansulfonsäureanhydrid führte zu der Annahme, dass eine roboterunterstützte Umsetzung der gesamten Aminbibliothek möglich ist. Diese Synthese stellt einen neuen Zugang für interessante Verbindungen mit einem pTyr-Mimetikum dar (Abb. 87). Anschließend wurde die gesamte synthetisierte Verbindungsbibliothek gegen die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 im Enzymassay mit DiFMUP getestet.

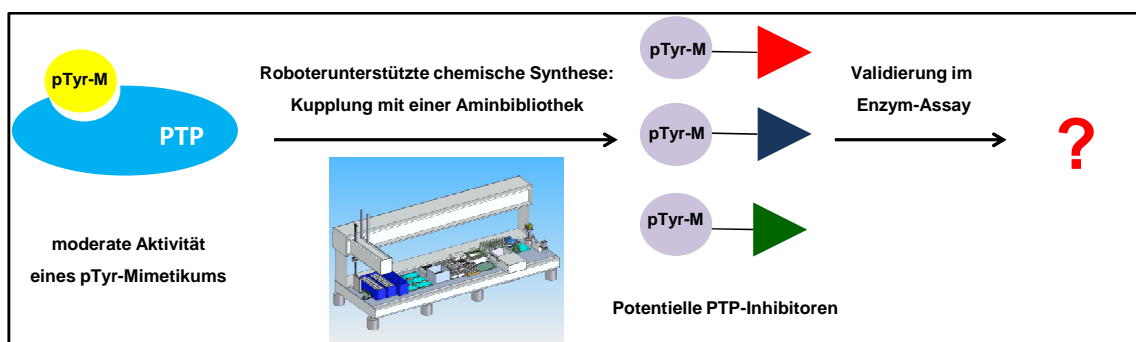


Abbildung 87: Roboterunterstützte Synthese einer Fragmentbibliothek

5.5.1 Roboterunterstützte Synthese der Substanzbibliothek

Zunächst wurde die Synthese von Derivaten mit einer Trifluormethylsulfonamido-Gruppe ausgehend von verschiedenen Aminen im kleinen Maßstab untersucht und optimiert. Die Durchführung der Synthese am Roboter und anschließende Analytik der Bibliothek wurde von Dr. Boo Geun Kim (AG Rademann, FMP) durchgeführt.

Die Reaktion findet unter inerten Bedingungen statt. Für die Synthese der Bibliothek wurde trockenes 1,2-Dichlorethan verwendet. Das Amin (5 μ M) wurde in einem Verhältnis von 1:2 zum Triethylamin (10 μ M) eingesetzt. Das Trifluormethansulfonsäureanhydrid (25 μ M) wurde in einem Überschuss von 5 Äquivalenten langsam dazugegeben. Bei einer Temperatur von 2 °C wurde für acht Stunden geschüttelt. Die Analytik der Rohprodukte wurde per LC/MS mit UV/VIS-Detektor bei 254 nm durchgeführt.

Tabelle 16: Statistik zur roboterunterstützten Synthese einer Bibliothek

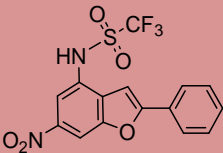
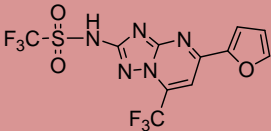
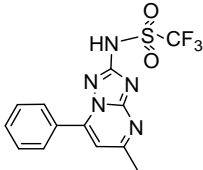
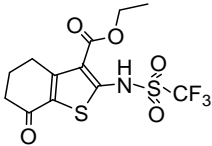
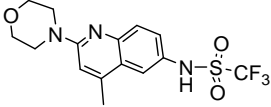
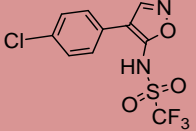
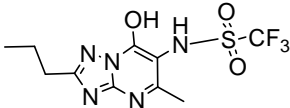
Kein Produkt	Produkt			Total
	Reinheit (via LC/MS, 254 nm)			
	< 30 %	30-59 %	> 60 %	
377	88	191	208	487
44 %	10 %	22 %	24 %	56 %

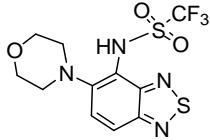
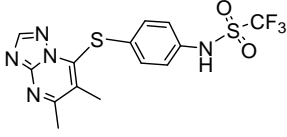
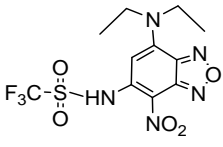
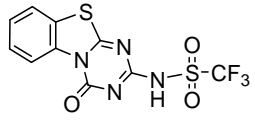
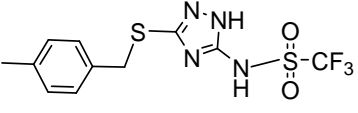
Die Statistik der roboterunterstützten Synthese der Verbindungsbibliothek ist in Tabelle 16 dargestellt. Fast die Hälfte der Verbindungen (44 %) zeigte keine Umsetzung zum Produkt. Die LC/MS-Analytik zeigte überwiegend das Ausgangsprodukt. 10 % zeigten das gewünschte Produkt mit einer Reinheit von weniger als 30 %. 191 Verbindungen (= 22 % der Verbindungen) besaßen eine Reinheit von 30-59 %. Nur 24 % der Produkte konnten mit einer Reinheit von über 60 % gebildet werden und kamen somit für eine weitere Validierung im Enzymassay gegenüber SHP-2 in Frage.

5.5.2 Enzymassay und Hitidentifizierung

Die synthetisierte Verbindungsbibliothek wurde ohne vorherige Reinigung in den vier Konzentrationen 500 μM , 300 μM , 100 μM und 10 μM mit dem Enzym SHP-2 untersucht. Mit Hilfe eines DiFMUP-Assays wurden die Enzymaktivitäten bestimmt. Es wurden 12 Substanzen identifiziert, die bei einer Konzentration der Testverbindung von 100 μM zwischen 0 und 45 % die Enzymaktivität hemmen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht der gefundenen Verbindungen bei SHP-2

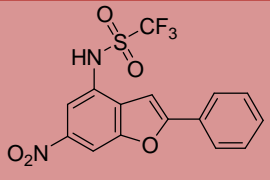
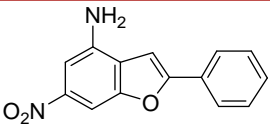
Bezeichnung	Struktur	SHP-2 (Aktivität in %) ^a
117		0
118		25
119		45
120		14
121		34
122		43
123		45

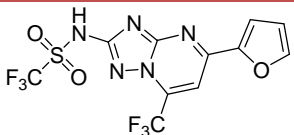
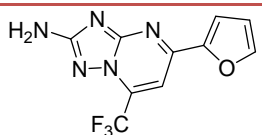
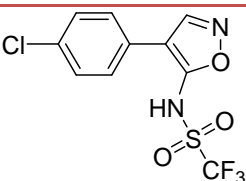
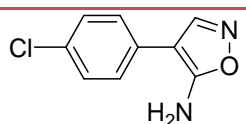
124		12
125		0
126		14
127		27
128		31

a: Enzymaktivität bei einer Konzentration von 100 μM der Testverbindung im DiFMUP-Assay

Für die Validierung der gemessenen Aktivitätswerte wurden die drei Verbindungen **117**, **118** und **122** aufgrund der Verfügbarkeit der Edukte ausgewählt und im kleinen Maßstab chemisch dargestellt. Die Produkte konnten mit einer Ausbeute von 19-81 % isoliert werden. Die synthetisierten Verbindungen wurden ebenfalls in einem DiFMUP-Assay mit dem Enzym SHP-2 getestet (Tabelle 18).

Tabelle 18: IC_{50} -Werte der synthetisierten Verbindungen bei SHP-2

Bezeichnung	Struktur	IC_{50} -Wert ^b SHP-2 [μM]
117_isoliert		86
129		> 1000

118_isoliert		~ 500
130		100
122_isoliert		542
131		nicht getestet

b: Bestimmung der IC₅₀-Werte im DiFMUP-Assay

Mit Hilfe der synthetisierten Substanzbibliothek von Verbindungen mit einem Trifluormethylsulfonamido-Rest konnte durch Validierung der Hit **117_isoliert** mit einem IC₅₀-Wert von 86 µM identifiziert werden. Das entsprechende Amin ist nicht aktiv im Enzymassay. Die Verbindung **118_isoliert** besitzt einen IC₅₀-Wert von 500 µM und das entsprechende Amin **130** einen von 100 µM. Die Verbindung **122_isoliert** zeigt ebenfalls in diesem Bereich eine moderate Hemmung von 542 µM.

Das Dockingexperiment mit der Verbindung **117_isoliert** zeigt diese Verbindung mit dem pTyr-Mimetikum in der katalytischen Tasche von SHP-2 (Abb. 88).

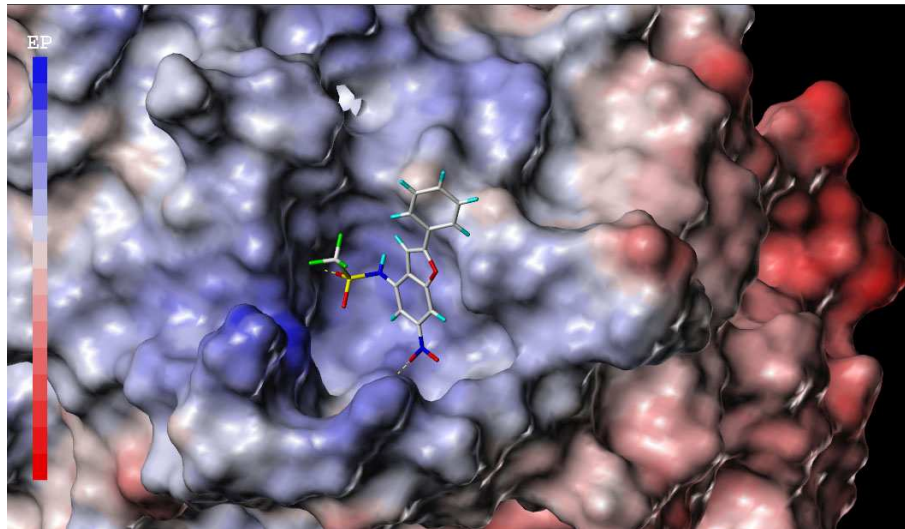


Abb. 88: Farbkodierte Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials von SHP-2 (3b7O) mit Verbindung 117_isoliert

Bei dieser Darstellung des Dockingexperimentes erkennt man eine Wechselwirkung zwischen einem Sauerstoffatom der $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{NH}$ -Gruppe mit dem Alanin 461 und zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoffatom der Nitrogruppe.

Mit Hilfe einer roboterunterstützten Synthese wurde die gesamte Aminbibliothek mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid unter basischen Bedingungen umgesetzt. Durch LC/MS-Analytik wurde bei 56 % der Reaktionen das gewünschte Produkt detektiert. Allerdings besaß nur ein Viertel der Produkte eine Reinheit über 60 %. Anschließend wurde diese neue Substanzbibliothek gegen die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-2 getestet. Dabei wurden für SHP-2 12 Verbindungen identifiziert, von denen drei Substanzen synthetisiert und validiert wurden.

Die Verbindung **117_isoliert** besitzt einen IC_{50} -Wert von 86 μM . Diese Verbindung stellt einen guten Ansatzpunkt für weitere chemische Optimierung dar, die zu einem potenten PTP-Inhibitor führen können. Zusätzlich wurde ein weiteres Amin **130** identifiziert, das ohne einen Trifluormethylsulfonamido-Rest einen IC_{50} -Wert von 100 μM hat.

5.5.3 Einbau des Triflats in Peptidsequenzen

Zur weiteren Untersuchung der Trifluormethylsulfonamido-Gruppe als pTyr-Mimetikum, wurde ein peptischer Baustein, basierend auf Phenylalanin, mit der entsprechenden Gruppe synthetisiert, um ihn in eine bekannte Peptidsequenz einzubauen (Abb. 89). Diese kommerziell erwerbliche Sequenz H-EFpTyrAEAVGRSPDPAK wird als SHP-1/SHP-2 Substrat bei Enzo® Life Sciences verkauft. Die Sequenz wurde durch Phagendisplay-Experimente identifiziert [120]. Jedoch gibt es keine veröffentlichten Aktivitätsdaten zu diesen Peptiden.

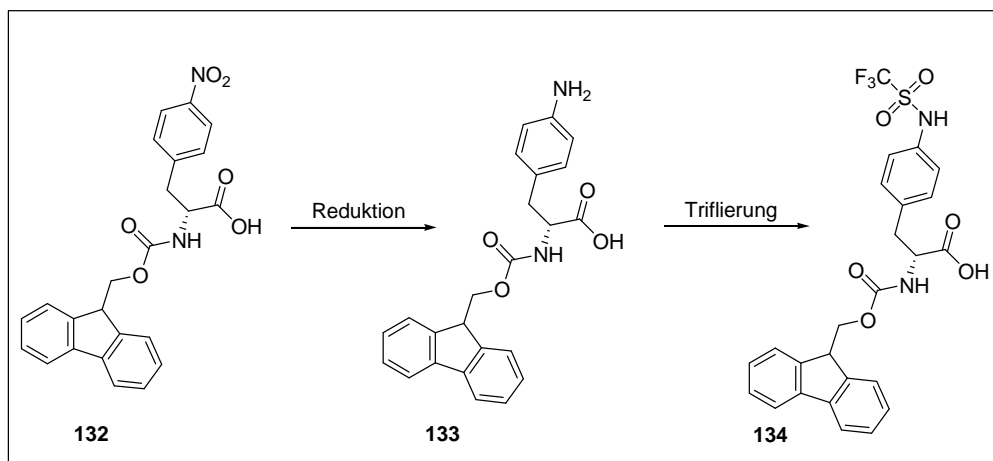


Abb. 89: Darstellung des Peptisbausteins 134

Für die Synthese des pTyr-Derivates wurde das Fmoc-geschützte 4-Nitro-L-phenylalanin **132** mit Zinnchlorid in der Mikrowelle reduziert. Anschließend wurde das freie Amin mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid unter basischen Bedingungen umgesetzt. Der synthetisierte Baustein **134** wurde in die zur Verfügung gestellte Sequenz von Stefan Wagner (AG Rademann, FMP) mittels Festphasensynthese eingebaut. Anschließend folgte noch eine Kupplung mit Phenylalanin und schließlich mit Glutaminsäure. Zur Kontrolle wurde die analoge Sequenz mit dem 4-Nitro-L-phenylalanin **132**, anstelle des pTyr-Mimetikums synthetisiert. Die beiden verwendeten Bausteine und die jeweilige Peptidsequenz wurden im DiFMUP-Assay gegenüber SHP-2 getestet (Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht über die zwei synthetisierten Peptidsequenzen 134 und 135

Bezeichnung	Struktur	IC ₅₀ -Wert ^b [μM]
132	FmocPhe(4-NO ₂)-OH	201
134	FmocPhe(4-NHSO ₂ CF ₃)-OH	40
135	Ac-EF-4-NO ₂ -FAEAVGRSPDPAK	> 1000
136	Ac-EFpTyrMAEAVGRSPDPAK	~ 1000

b: Bestimmung der IC₅₀-Werte im DiFMUP-Assay

Die inhibitorische Aktivität der beiden Peptidsequenzen im Enzymassay sind sehr gering. Die Sequenz **136** besitzt einen IC₅₀-Wert von nur 1000 μM, die Sequenz **135** zeigt keine inhibitorische Aktivität in diesem Bereich. Beide Phenylalanin-basierten Bausteine zeigen IC₅₀-Werte im mikromolaren Bereich, die Verbindung **132** hemmt mit 201 μM und **134** mit 40 μM.

Die Verbindung **134** wurde in einem Dockingexperiment mit der Kristallstruktur von SHP-2 untersucht (Abb. 90). Die Trifluormethylsulfonamido-Gruppe repräsentiert auch hier das pTyr-Mimetikum und interagiert mit Serin 460 und Alanin 461.

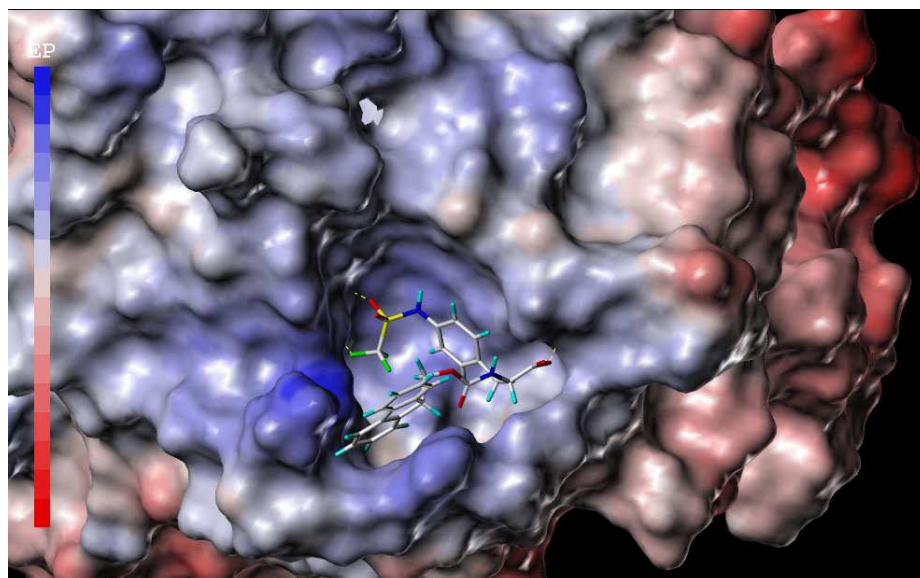


Abb. 90: Farbkodierte Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials von SHP-2 (3b7O) mit Verbindung 134

Da für die untersuchte Sequenz des SHP-2-Substrates Vergleichswerte fehlen, kann keine Aussage über die Verwendung der Verbindung **134** in einer Peptidsequenz getroffen werden. Allerdings weist der IC₅₀-Wert von 40 µM auf ein geeignetes Potential hin.

Zur weiteren Untersuchung sollte der Baustein in bekannte und validierte Sequenzen eingesetzt werden. Für diese Experimente könnten sich die Sequenzen Ac-DADE-**X**-L-NH₂ und Ac-ELEF-**X**-MDYE-NH₂ eignen, wobei **X** das pTyr-Mimetikum darstellt (Tabelle 20) [61] [121] [122].

Tabelle 20: Übersicht über publizierte Peptidsequenzen

Bezeichnung	Peptidsequenz	PTP1B K _i [µM]
137	Ac-DADE- F₂Pmp -L-NH ₂	0,026
138	Ac-ELEF- F₂Smp -MDYE-NH ₂	0,36

Eine weitere Variante zur Validierung der Verbindung **134** ist der Einbau in die Peptidsequenz von Gab1, Ac-PGNT-**X**-QIPRTF-NH₂ **139**, mit anschließendem Enzymassay (Angabe Screening Unit, Dr. Jens von Kries).

5.6 Zusammenfassung

Der fehlende adäquate Ersatz von pTyr in Leitstrukturen bei der Inhibitorentwicklung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen stellt gegenwärtig immer noch einen limitierenden Faktor dar. Aufgrund der Anforderungen, wie Zellpermeabilität und Bioverfügbarkeit, sollten potentielle pTyr-Mimetika idealerweise ungeladene Strukturen sein, die trotzdem eine starke Wechselwirkung mit der positiv geladenen Aktivtasche der Phosphatasen besitzen.

Durch Untersuchungen der in dieser Arbeit synthetisierten Fragmentbibliothek gegenüber der gewählten Modell-Phosphatase MptpA konnte ein zyklisches Fragment, die Verbindung **78**, mit einem IC₅₀-Wert von 857 µM identifiziert werden. Weiterhin konnten bei den terminalen, potentiellen pTyr-Mimetika, die Verbindungen **84** und **92** mit einer Trifluormethylsulfonamid- bzw. Trifluormethylacylsulfonamidgruppe gefunden werden, die einen IC₅₀-Wert von

534 μM bzw. 352 μM besitzen. Ferner stellen die Verbindungen **91** und **93** mit einer moderaten Aktivität von 824 μM und 765 μM ebenfalls einen guten Startpunkt für weitere Inhibitorentwicklungen dar. Somit konnten fünf Fragmente identifiziert werden, die eine moderate Aktivität gegen MptpA zeigen und sich als geeignete Startpunkte zur Optimierung für potentielle pTyr-Mimetika auszeichnen.

Die begleitenden Dockingexperimente mit der Kristallstruktur von MptpA unterstützen die Aussage, dass die Trifluormethylsulfonamid- und die Trifluormethylacylsulfonamidgruppe zahlreiche und wichtige Wechselwirkungen des pTyr-Mimetikums mit der Tasche ausbilden, die vergleichbar mit dem natürlichen Substrat pTyr oder bekannten und potenten Mimetika sind. Zusätzlich ermöglicht der einfache, synthetische Zugang dieser Reste eine schnelle Erweiterung des Moleküls, um zu untersuchen, welche Modifikation zu einer Optimierung der inhibitorischen Aktivität führen könnte.

Aufgrund der einfachen Struktur mit vergleichsweise hoher Aktivität und leichtem synthetischen Zugang wurde die Verbindung **84** mit der Trifluormethylacylsulfonamidgruppe ausgewählt, um sie in weiteren Experimenten zu validieren. Der pKs-Wert des entsprechenden Aldehydes **103** wurde in einem Titrationsexperiment als schwache Säure mit einem Wert von 7,2 bestimmt. Der Caco-2-Assay ergab einen Wert von $P_{\text{app}} = 24,5 (10^{-6} \text{ cm/s})$, der einer moderaten Membranpermeabilität entspricht. Diese Ergebnisse belegen, dass dieses Fragment **103** aufgrund seiner untersuchten Eigenschaften ein geeigneter Kandidat für den Einsatz in der Entwicklung von pTyr in PTP-Inhibitoren ist, z.B. für den Einsatz in einem dynamischen Ligationsassay.

Danach wurde der Fokus der Arbeit auf Komponenten gelegt, die zur Erweiterung eines pTyr-Mimetikums geeignet sein könnten. Dafür wurde eine Bibliothek von Aminen gegenüber den Phosphatasen MptpA, SHP-2 und SHP-1 untersucht und miteinander verglichen. Die dadurch identifizierten 13 Amine besitzen IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich von 4-19 μM . Aufgrund der Aminfunktionalität stellen sie geeignete Kandidaten für die weitere Inhibitorentwicklung dar, da sie in einer einfachen chemischen Kupplungsreaktion mit einem potenten pTyr-Mimetikum Verbindungen ergeben, die in einem Enzymassay validiert werden können.

Basierend auf den in dieser Arbeit demonstrierten positiven Eigenschaften der Trifluormethylacylsulfonamidgruppe und dem einfachen synthetischen Zugang ausgehend von einem Amin, wurde die bestehende Aminbibliothek mit roboterunterstützter Synthese umgewandelt und im Anschluss gegenüber SHP-2 im Enzymassay auf die inhibitorische Aktivität getestet. Mit Hilfe dieser Methode konnten drei Verbindungen, **117_isoliert** mit einem IC_{50} -Wert von 86 μ M, **118_isoliert** und **122_isoliert** mit IC_{50} -Werten im Bereich von 500 μ M identifiziert werden. Diese drei Strukturen könnten die Basis für eine Leitstrukturoptimierung für die Entwicklung neuer, potenter SHP-2-Inhibitoren darstellen.

Um die Trifluormethylacylsulfonamidgruppe weiter zu validieren wurde die Struktureinheit in einen analogen Aminosäurebaustein umgewandelt, um ihn in eine Peptidsequenz mittels Festphasensynthese einzubauen. Die getestete Sequenz **136** mit dem analogen pTyr-Baustein **134** zeigte einen inhibitorischen Aktivitätswert von 1 mM, jedoch zeigt der Aminosäurebaustein **134** alleine eine Hemmung von 40 μ M. Folglich sollte der Einsatz dieses Bausteines in einer bekannten und potenten Peptidsequenz ein besseres Resultat zeigen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung verschiedener Methoden, neue Ansatzpunkte für Inhibitorentwicklung für Protein-Tyrosin-Phosphatasen identifiziert worden sind, die noch validiert werden müssen.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 *Materialien und Methoden*

6.1.1 **Chemikalien und Lösungsmittel**

Die verwendeten Lösungsmittel, Chemikalien, Reagenzien und Harze wurden von den Firmen Novabiochem, ABCR, Fluka, Merck, Riedel de Haen, Lancaster, Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fisher Scientific und VWR bezogen und wurden ohne weitere Reinigung verwendet, wasserfreie Lösungsmittel (puriss. absolute) ($\text{H}_2\text{O} \leq 0.005 \%$, über Molekularsieb) von Fluka.

Die Lösungsmittel für die HPLC wie Acetonitril und Methanol (HPLC Gradient Grade) wurden von Fisher Scientific verwendet. Wasser für die HPLC wurde mit einer Millipore Milli-Q® Biocel A10 Anlage aufbereitet.

Deuterierte Lösungsmittel für NMR Messungen wurden von Deutero GmbH und Euriso-Top GmbH verwendet.

Die in dieser Arbeit verwendete Aminbibliothek besteht aus 886 Verbindungen und wurde von ChemDiv Inc., USA, bezogen.

Die verwendeten Molekülbausteine für Synthesen und Screenings wie Hydrazine und Amine sind von ChemBridge Corporation, USA, ACB Blocks Ltd., Russland, Chemcube UG, Deutschland und Unichem Corp., Russland.

Experimente mit wasserempfindlichen Substanzen wurden in im Vakuum ausgeheizten und mit Stickstoff befüllten Schlenk-Gefäßen durchgeführt.

6.1.2 **Analytische Methoden und Geräte**

6.1.2.1 **Dünnschichtchromatographie**

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Silicagel Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ von Merck verwendet. Die Detektion erfolgte mittels einer UV-Lampe bei 254 nm.

6.1.2.2 **Kernmagnetische Resonanzspektroskopie**

Die Aufnahme der ^1H - und ^{13}C -NMR- Spektren erfolgte standardmäßig mit dem Gerät Bruker AV 300. Die ^1H -Messungen fanden bei 300 MHz und die ^{13}C -Messungen bei 75 MHz ^1H -Breitbandentkoppelt statt. Die Spektren wurden bei

einer Temperatur von 300 K aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde CDCl_3 oder d^6 -DMSO verwendet. Die chemische Verschiebung ist in ppm relativ zum jeweiligen Lösungsmittel oder TMS als internen Standard angegeben. Die Kopplungskonstante in Hertz (Hz) und die Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett.

Prozessierung und Auswertung erfolgte mit dem Programm ACD/2D NMR (Version 5.07, ACDLabs, Kanada).

6.1.2.3 LC/MS-Messungen

Die Standardanalysen wurden mit einem LC-Gerät der Firma Agilent Technologies der 1100-Serie durchgeführt. Ausgestattet ist dieses Gerät mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) gekoppelt mit einem Single-Quadrupole Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisation (ESI). Als Säulen wurden eine Macherey-Nagel EC C-18ec 30 x 2 mm mit 100 Å Porengröße und 3 µm Partikelgröße und eine Macherey-Nagel EC C-18ec 250 x 4 mm mit 100 Å Porengröße und 5 µm Partikelgröße verwendet. Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus Wasser mit 0,1 % Ameisensäure und entweder Methanol oder Acetonitril, jeweils mit 0,1 % Ameisensäure.

Bei den Messungen wurden die Wellenlängen 254 nm, 450 nm, 230 nm und 280 nm detektiert. Es wurde in der Regel eine Gradientenmethode von 5-99 % Acetonitril verwendet. Die Daten wurden mit Hilfe des Programmes von Agilent LC/MSD ChemStation B.03.02 analysiert und bearbeitet.

6.1.2.4 Hochauflösendes Massenspektrometer

Hochauflöselöste Massen wurden mit einem Accurate Mass Time-of-Flight-(ToF)-Massenspektrometer 6220 der Firma Agilent Technologies mit einer LC der 1200er Serie und DAD verwendet. Die Chromatographie erfolgte über eine Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 50 x 4,6 mm mit 1,8 µm Partikelgröße. Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus Wasser mit 0,1 % Ameisensäure und entweder Methanol oder Acetonitril, jeweils mit 0,1 % Ameisensäure.

6.1.2.5 Präparative HPLC

Reinigungen mittels präparativer HPLC wurden an einer Anlage der 1100er Serie der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Die Detektion erfolgte über

einen Multiwellenlängen-Detektor (MWD). Die verwendeten Elutionsmittel waren Wasser und Acetonitril mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure. Als Säule wurde eine VarioPrep C-18ec 250 x 21 mm mit 100 Å Porengröße und 7 µm Partikelgröße und eine VarioPrep C-18ec 125 x 32 mm mit 100 Å Porengröße und 7 µm Partikelgröße, beide Säulen von der Firma Macherey-Nagel, eingesetzt. Die jeweiligen Methoden mit entsprechendem Gradienten wurden aufgrund der LC/MS-Analytik der zu reinigenden Verbindung angepasst.

6.1.2.6 Bestimmung der Reinheiten

Die Reinheiten der Verbindungen wurden mittels LC/MS-Analytik bestimmt.

6.1.2.7 Bestimmung der Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte der Verbindungen wurden mit dem Gerät B-545 von Büchi bestimmt.

6.1.2.8 Mikrowellenunterstützte Synthese

Mikrowellenunterstützte Synthese wurde unter Verwendung des Gerätes SmithSynthesizer™ der Firma Biotage (Upsala, Schweden) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten in druckstabilen Reaktionsgefäßen verschlossen mit Septen in einem Volumen von 0,5-5 ml. Das verwendete Magnetron besitzt eine Leistung von 15-300 W und erzeugt die Mikrowellenstrahlung bei einer Frequenz von 2,45 GHz. Druckluft am Ende der Reaktion führt zu einem rapiden Abkühlen der Gefäße.

6.1.2.9 Roboterunterstützte Synthese einer Verbindungsbibliothek

Für die roboterunterstützte Synthese einer Verbindungsbibliothek wurde der Roboter SOPHAS® GXXL von der Firma Zinsser Analytic, Deutschland verwendet.

6.1.2.10 Festphasensynthese

Reaktionen auf der Festphase wurden in 10 ml Spritzen aus Polypropylen (Roland Vetter Laborbedarf OHG) durchgeführt.

6.1.2.11 Software zur Durchführung bzw. Darstellung von Dockingexperimenten

Die Dockingexperimente von Verbindungen mit Kristallstrukturen aus der RCSB-Proteindatenbank wurden von Dr. Michael Lisurek (AG Kühne, FMP) mit

dem Programm Sybel® (Version 8.1, Tripos L.P., USA) durchgeführt. Für die Darstellung der Dockingergebnisse und der Kristallstrukturen der verschiedenen Protein-Tyrosin-Phosphatasen wurden die Programme MOE (Molecular Operating Environment, Version 2006.08, Chemical Computing Group Inc., Kanada) und Pymol™ (Freeware, Version 0.99 rc6, DeLano Scientific LLC, USA) verwendet.

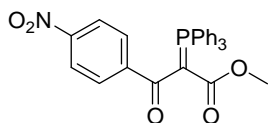
6.2 Synthesen

6.2.1 Synthese der SHP-2-Inhibitoren

6.2.1.1 Darstellung der Ketophosphoranylide 3

Prozedur IA: Methyl(triphenylphosphoranyliden)-acetat **2** (1 eq, 1,5 mmol) wird in trockenem DCM vorgelegt. Eine Mischung aus der jeweiligen Carbonsäure (1,2 eq, 1,8 mmol), MSNT (1,2 eq, 1,8 mmol) und Lutidin (1,4 eq, 1,7 mmol) in trockenem DCM wird hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit H₂O gequencht. Die beiden Phasen werden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, gefiltert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Silicagel gereinigt.

Prozedur IB: Methyl(triphenylphosphoranyliden)-acetat **2** (1 eq, 1,5 mmol) wird in trockenem DCM vorgelegt. Eine Mischung aus dem jeweiligen Carbonsäurechlorid (1,2 eq, 1,8 mmol) und Lutidin (1,4 eq, 1,7 mmol) in trockenem DCM wird hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit H₂O gequencht. Die beiden Phasen werden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, gefiltert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Silicagel gereinigt.

Methyl-3-(4-nitrophenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)-propanoat**3a**

Verbindung **3a** wird unter Verwendung der Prozedur **IA** mit 4-Nitrobenzoesäure dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (80:20, v/v)).

Ausbeute: 610 mg (84 %) als gelber Feststoff, Reinheit > 99 %

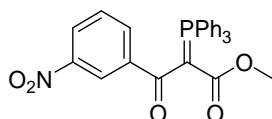
$C_{28}H_{22}NO_5P$, $M = 483,45$ g/mol

mp 206-208 °C

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8,20 (d, $J = 10$ Hz, 2H, NO_2 -Ph), 7,78-7,48 (m, 17H, NO_2 -Ph, PPh_3), 3,10 (s, 3H, Me).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 190,8 (d, $J_{C-P} = 5$ Hz), 167,6 (d, $J_{C-P} = 13$ Hz), 149,2 (d, $J_{C-P} = 9$ Hz), 148,0, 133,4, 133,3, 132,3, 128,9, 128,7, 128,6, 125,8, 124,6, 122,8, 49,9 (d, $J_{C-P} = 1$ Hz), 45,5.

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 484,5 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 484,2 $[M+H]^+$

Methyl-3-(3-nitrophenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)-propanoat**3b**

Verbindung **3b** wird unter Verwendung der Prozedur **IA** mit 3-Nitrobenzoesäure dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (80:20, v/v)).

Ausbeute: 660 mg (91 %) als gelber Feststoff, Reinheit > 99 %

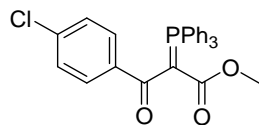
$C_{28}H_{22}NO_5P$, $M = 483,45$ g/mol

mp 149-151 °C

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8,20 (d, $J = 10$ Hz, 2H, NO_2 -Ph), 7,78-7,48 (m, 17H, NO_2 -Ph, PPh_3), 3,10 (s, 3H, Me).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 190,3 (d, $J_{C-P} = 5$ Hz), 167,6 (d, $J_{C-P} = 14$ Hz), 147,4, 144,5 (d, $J_{C-P} = 9$ Hz), 134,2, 133,4, 133,3, 132,2, 128,8, 128,7, 128,2, 126,0, 124,7, 124,0, 123,5, 49,8 (d, $J_{C-P} = 1$ Hz).

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 484,5 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 484,2 $[M+H]^+$

Methyl-3-(4-chlorphenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)-propanoat**3c**

Verbindung **3c** wird unter Verwendung der Prozedur **IA** mit 4-Chlorbenzoesäure dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (40:60, v/v)).

Ausbeute: 350 mg (50 %) als farbloser Feststoff, Reinheit > 99 %

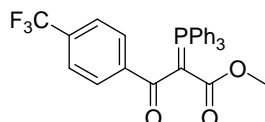
$C_{28}H_{22}ClO_3P$, $M = 472,90$ g/mol

mp 131-132 °C

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7,75-7,37 (m, 19H, Cl-Ph, PPh₃), 2,96 (s, 3H, Me).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 190,4 (d, $J_{C-P} = 6$ Hz), 166,5 (d, $J_{C-P} = 14$ Hz), 141,6 (d, $J_{C-P} = 10$ Hz), 133,8, 132,9, 132,8, 132,1, 131,1, 129,9, 128,9, 128,7, 127,1, 126,0, 124,8, 49,2 (d, $J_{C-P} = 2$ Hz).

MS (ESI): ber. [m/z] 473,9 [M+H]⁺, gef. [m/z] 473,3 [M+H]⁺

Methyl-3-(4-(trifluormethyl)phenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)-propanoat 3d

Verbindung **3d** wird unter Verwendung der Prozedur **IA** mit 4-Trifluormethylbenzoesäure dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (67:33, v/v)).

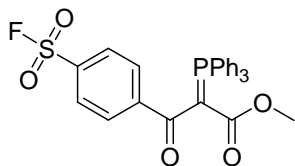
Ausbeute: 522.5 mg (69%) als gelber Feststoff, Reinheit > 99 %

$C_{29}H_{22}F_3O_3P$, $M = 506,45$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7,8-7,44 (m, 19H, CF_3 -Ph, PPh₃), 3,11 (s, 3H, Me).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 191,7 (d, $J_{C-P} = 5$ Hz), 167,7 (d, $J_{C-P} = 14$ Hz), 143,6, 133,4, 133,3, 132,1, 130,7, 128,8, 128,6, 128,3, 126,2, 125,0, 124,4, 124,3, 49,8 (d, $J_{C-P} = 1$ Hz).

MS (ESI): ber. [m/z] 507,5 [M+H]⁺, gef. [m/z] 507,3 [M+H]⁺

Methyl-3-(4-fluorsulfonylphenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)-propanoat 3e

Verbindung **3e** wird unter Verwendung der Prozedur **IB** mit 4-Fluorosulfonylbenzoylchlorid dargestellt.

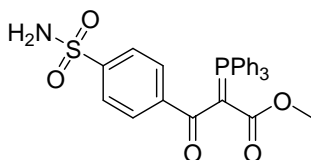
Ausbeute: 469 mg (60%) als farbloser Feststoff, Reinheit > 90 %

$C_{28}H_{22}FO_5PS$, $M = 520,51$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8,00-7,46 (m, 19H, FSO_2 -Ph, PPh_3), 3,10 (s, 3H, Me).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 190,6 (d, $J_{C-P} = 6$ Hz), 167,6 (d, $J_{C-P} = 13$ Hz), 150,4 (d, $J_{C-P} = 9$ Hz), 135,0, 134,1, 134,0, 133,4, 133,3, 132,3, 132,2, 130,3, 130,1, 128,9, 128,8, 128,7, 127,7, 125,8, 124,5, 118,9, 117,7, 49,8 (d, $J_{C-P} = 1$ Hz).

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 521,5 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 521,3 $[M+H]^+$

Methyl-3-(4-aminosulfonylphenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)-propanoat 3f

3f wurde unter Verwendung von 3-(4-Chlorosulfonylphenyl)-3-oxo-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)-propionat in trockenem THF und $NH_3/EtOH$ (2M) dargestellt [123]. Die Reaktionsmischung wurde bei RT 1 h gerührt. Aufgrund der geringen Ansatzmenge wurde das Rohprodukt ohne weitere Reinigung verwendet.

Ausbeute: 45,3 mg (Rohprodukt) als farbloser Feststoff, Reinheit 89 %

$C_{28}H_{24}NO_5PS$, $M = 517,53$ g/mol

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 518,1 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 518,2 $[M+H]^+$

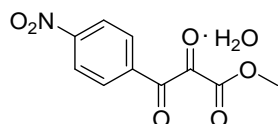
6.2.1.2 Darstellung der 2,3-Diketoester

Synthese von Dimethyldioxiran

In einen 250-ml-Dreihalskolben mit kräftigem Magnetrührkern gibt man eine Mischung aus dest. H₂O (60 ml), Aceton (39 ml, 531 mmol), NaHCO₃ (36 g, 143 mmol). Anschließend wird das Tripelsalz Oxon (75 g, 123 mmol) dazugegeben. Die Apparatur wird an ein Vakuumgerät mit 240 mbar angeschlossen und mit einem Aceton/Trockeneis-Gemisch gekühlt (-78 °C). Es wird für 30 min destilliert. Pro Kolben werden ca. 30 ml DMDO in Aceton (entspricht 3,6 mmol) erhalten.

Prozedur II: Zu einer Lösung aus dem Edukt **3a-3e** (1 eq) in DCM wird Dimethyldioxiran (3 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei RT 1 h gerührt, dabei tritt eine Entfärbung der Reaktionsmischung auf. Anschließend wird die Lösung im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Silicagel gereinigt.

Methyl-3-(4-nitrophenyl)-2,3-dioxopropanoat Hydrat 4a



Verbindung **4a** wird unter Verwendung von **Prozedur II** dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (40:60, v/v)).

Ausbeute: 250 mg (86 %) als gelber Feststoff, Reinheit > 99 %

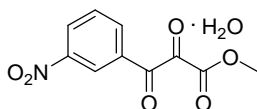
C₁₀H₇NO₆, M = 237,17 (+ 18,02) g/mol

mp 110-112 °C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8,35-8,23 (m, 4H, arom.), 3,65 (s, 3H, Me).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 193,0, 169,8, 149,9, 137,8, 130,9, 123,6, 94,7, 52,5.

MS (ESI): ber. [m/z] 238,2 [M+H]⁺, gef. [m/z] 238,1 [M+H]⁺

Methyl-3-(3-nitrophenyl)-2,3-dioxopropanoat Hydrat 4b

Verbindung **4b** wird unter Verwendung von **Prozedur II** dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (50:50, v/v)).

Ausbeute: 170 mg (90 %) als farbloser Feststoff, Reinheit > 99 %

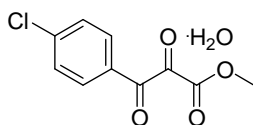
$C_{10}H_7NO_6$, $M = 237,17 (+ 18,02)$ g/mol

mp 80-82 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,85 (s, 1H, arom.), 8,49-8,40 (m, 2H, arom.), 7,86-7,80 (m, 1H, arom.), 3,66 (s, 3H, Me).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 192,2, 169,8, 147,7, 135,6, 133,9, 130,4, 127,8, 124,2, 94,8, 52,5;

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 238,2 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 238,2 $[M+H]^+$

Methyl-3-(4-chlorphenyl)-2,3-dioxopropanoat Hydrat 4c

Verbindung **4c** wird unter Verwendung von **Prozedur II** dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (30:70, v/v)).

Ausbeute: 120 mg (94 %) als farbloser Feststoff, Reinheit > 99 %

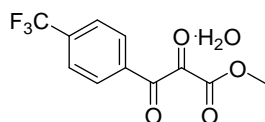
$C_{10}H_7ClO_4$, $M = 226,61 (+ 18,02)$ g/mol

mp 92-94 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,05-7,57 (m, 4H, arom.), 3,62 (s, 3H, Me).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 192,6, 170,1, 138,5, 131,5, 128,7, 94,4, 52,4.

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 227,6 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 227,1 $[M+H]^+$

Methyl-3-[4-(trifluormethyl)phenyl]-2,3-dioxopropanoat Hydrat 4d

Verbindung **4d** wird unter Verwendung von **Prozedur II** dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (67:33, v/v)).

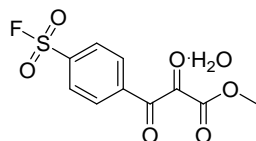
Ausbeute: 55.3 mg (quantitativ) als gelber Feststoff, Reinheit > 99 %

$C_{11}H_7F_3O_4$, $M = 260,17 (+ 18,02)$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8,20-8,17 (d, $J = 9$ Hz, 2H, arom.), 7,75-7,72 (d, $J = 9$ Hz, 2H, arom.), 3,75 (s, 3H, Me), 1,55 (s, OH).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 190,8, 169,9, 130,5, 125,1, 121,5, 91,8, 77,4, 77,0, 76,6.

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 261,1 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 261,0 $[M+H]^+$

Methyl-3-[4-(fluorsulfonyl)phenyl]-2,3-dioxopropanoat Hydrat 4e

Verbindung **4e** wird unter Verwendung von **Prozedur II** dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (50:50, v/v)).

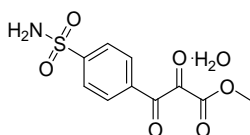
Ausbeute: 181.7 mg (78%) als gelber Feststoff, Reinheit > 99 %

$C_{10}H_7FO_6S$, $M = 274,22 (+ 18,02)$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8,32-8,29 (d, $J = 9$ Hz, 2H, arom.), 8,13-8,10 (d, $J = 6$ Hz, 2H, arom.), 3,76 (s, 3H, Me).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 190,6, 169,4, 136,9, 128,8, 92,2, 77,4, 77,8, 58, 0, 54,1.

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 275,2 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 275,0 $[M+H]^+$

Methyl-3-[4-(aminosulfonyl)phenyl]-2,3-dioxopropanoat Hydrat 4f

Verbindung **4f** wird unter Verwendung von **Prozedur II** dargestellt (Chromatographie: Ethylacetat/Hexan (50:50, v/v)).

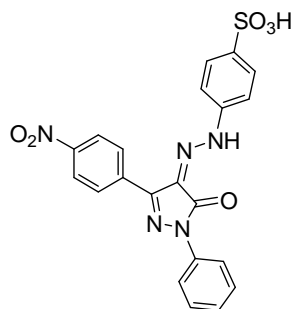
Ausbeute: 33 mg (90 %) als gelbes Öl, Reinheit > 95 %

C₁₀H₉NO₆S, M = 271,25 (+ 18,02) g/mol

MS (ESI): ber. [m/z] 270,0 [M-H]⁻, gef. [m/z] 269,8 [M-H]⁻

6.2.1.3 Darstellung von 3-Aryl-4-Hydrazonopyrazol-5-one via 2-Hydrazonderivate

Prozedur III: Die entsprechende Tricarbonylverbindung **4a-4f** (1 eq) wird in Ethanol gelöst. Anschließend wird HCl (1 % in Lösung, katalytisch) dazugetropft und mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure Hemihydrat (1,2 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei 85 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung zum entsprechenden Hydrazonderivat (Analyse *via* LC/MS) wird das Rohprodukt mit dem entsprechenden Hydrazinderivat (1,2 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei 85 °C erhitzt. Der entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert und dreimal mit Ethanol und einmal mit Hexan gewaschen. Der Niederschlag wird am Hochvakuum getrocknet.

4-((2Z)-2-[3-(4-Nitrophenyl)-5-oxo-1-phenyl-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-yliden]hydrazino)benzolsulfonsäure 1 PHPS1

Verbindung **4a** wird gemäß **Prozedur III** mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure Hemihydrat umgesetzt. Anschließend wird Phenylhydrazin dazugegeben, um das Produkt **1** zu erhalten.

Ausbeute: 213 mg (48 %) als oranger Feststoff, Reinheit 95 %

$C_{21}H_{15}N_5O_6S$, $M = 465,44$ g/mol

mp 340-342 °C

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 13,74 (s, 1H, NH), 8,49-8,40 (m, 4H, NO_2 -Ph), 8,06-8,03 (d, $J = 9$ Hz, 2H, SO_3H -Ph), 7,74-7,64 (m, 4H, SO_3H -Ph und Ph), 7,54-7,49 (m, 2H, Ph), 7,16-7,10 (m, 1H, Ph).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 146,4, 143,9, 136,0, 129,1, 128,1, 127,0, 124,0, 120,5, 118,5, 116,4.

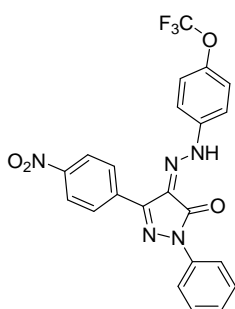
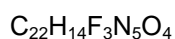
HRMS (ESI): ber. [m/z] 464,067 [$M-H$]⁻, gef. [m/z] 464,0668 [$M-H$]⁻

Verbindungen **4b-f** wurden gemäß **Prozedur III** mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure Hemihydrat umgesetzt. Anschließend wird Phenylhydrazin dazugegeben, um die entsprechenden Produkte **5-9** zu erhalten.

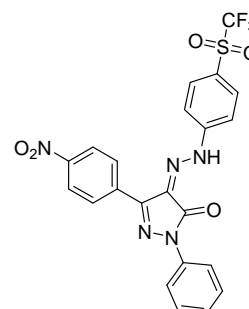
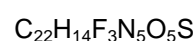
Tabelle 21: Übersicht der Reste der Verbindungen 5-9

Verbindung	R ¹	R ²	R ³
5	4b (-Ph-3-NO ₂)	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
6	4c (-Ph-4-Cl)	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
7	4d (-Ph-4-CF ₃)	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
8	4e(-Ph-4-SO ₂ F)	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph
9	4f (-Ph-4-SO ₂ NH ₂)	-Ph-4-SO ₃ H	-Ph

Darstellung der Verbindungen (4Z)-3-(4-Nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4,5-dion-4-[[4-(trifluormethoxy)phenyl]hydrazon] **10** und (4Z)-3-(4-Nitrophenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4,5-dion-4-({4-[(trifluormethyl)sulfonyl]phenyl}hydrazon) **11**

**10**

M = 469,37 g/mol

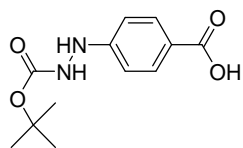
**11**

M = 517,44 g/mol

Verbindung **4a** wird gemäß **Prozedur III** mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure Hemihydrat umgesetzt. Anschließend wird 4-Trifluormethoxyphenylhydrazin Hydrochlorid dazugegeben um das Produkt **10** zu erhalten bzw. [4-(Trifluormethyl)sulfonylphenyl]hydrazin dazugegeben, um das Produkt **11** zu erhalten.

6.2.1.4 Synthese des Hydrazinderivates 16

Boc-Schützung zur Darstellung von 4-[2-*tert*-Butoxycarbonyl]hydrazin]benzoesäure 13



4-Hydrazinbenzoesäure **12** wird in Dioxan gelöst und mit Na₂CO₃-Lösung (5 % in Wasser) unter Eiskühlung versetzt (1:2). Anschließend wird das Boc-Anhydrid (1,2 eq) in Dioxan langsam dazugeben und für 16 h ohne Eisbad gerührt. Nachfolgend wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit HCl (konz.) vorsichtig angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert.

Ausbeute: 380 mg (92 %) als gelber Feststoff, Reinheit 90 %

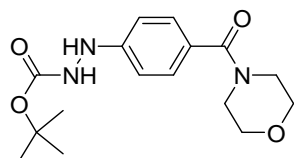
C₁₂H₁₆N₂O₄, M = 252,27 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8,89 (s, 1H, NH), 8,20 (s, 1H, NH), 7,73 (d, 2H, arom., *J* = 9 Hz), 6,65 (d, 2H, arom., *J* = 9 Hz), 1,40 (s, 9H, *tert*-Butylgruppe).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 167,3, 155,6, 153,5, 130,9, 119,7, 110,5, 79,2, 28,1.

MS (ESI): ber. [*m/z*] 253,1 [M+H]⁺, gef. [*m/z*] 253,0 [M+H]⁺

Amidkupplung zur Darstellung von *tert*-Butyl-2-[4-(morpholin-4-yl)carbonyl]phenyl]hydrazincarboxylat 15



Die Verbindung **13** wird in DCM gelöst, Morpholin **14** (1,1 eq) dazugegeben und anschließend EDC (1,1 eq) und DMAP (0,1 eq) versetzt. Es wird für 16 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in Wasser wieder aufgenommen und unter Eiskühlung mit HCl angesäuert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silikagel mit Ethylacetat/Hexan (90:10, v/v) gereinigt.

Ausbeute: 134 mg (66 %) als hellgelbes Öl, Reinheit 96 %

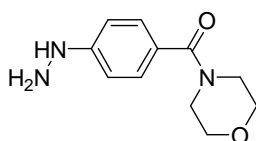
$C_{16}H_{23}N_3O_4$, $M = 321,37$ g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,82 (s, 1H, Hydrazin), 7,92 (s, 1H, Hydrazin), 7,23 (d, 2H, arom., $J = 8$ Hz), 6,65 (d, 2H, arom., $J = 8$ Hz), 5,57-3,47 (m, 8H, Morpholinrest), 1,40 (s, 9H, tert. Butylgruppe).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 170,6, 156,4, 150,6, 129,36, 127,5, 112,4, 81,6, 67,2, 28,3.

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 322,2 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 322,4 $[M+H]^+$

Boc-Entschützung zur Darstellung von 4-(4-Hydrazinbenzoyl)morpholin **16**



Die Verbindung **15** wird in DCM mit TFA (6:1) gelöst. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei RT gerührt. Nach Untersuchung der vollständigen Umsetzung durch LC/MS-Analyse wird das Hydrazinderivat in DCM in der nächsten Reaktion aus Stabilitätsgründen *in situ* eingesetzt (zur Verbindung **18**).

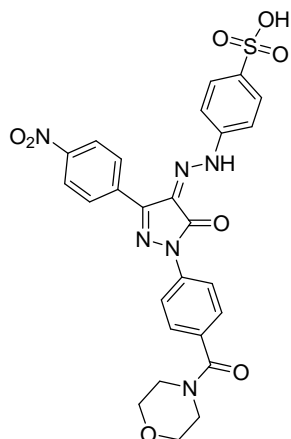
$C_{11}H_{15}N_3O_2$, $M = 221,26$ g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7,36 (d, 2H, arom., $J = 8$ Hz), 6,85 (d, 2H, arom., $J = 8$ Hz), 3,82-3,54 (m, 8H, Morpholinrest).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 170,1, 148,8, 129,5, 128,8, 114,0, 67,1.

MS (ESI): ber. $[m/z]$ 222,1 $[M+H]^+$, gef. $[m/z]$ 222,1 $[M+H]^+$

Umsetzung mit Verbindung 17 zur Darstellung von 4-((2Z)-2-[1-[4-(Morpholin-4-ylcarbonyl)phenyl]-3-(4-nitrophenyl)-5-oxo-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-yliden]hydrazino)benzolsulfonsäure 18



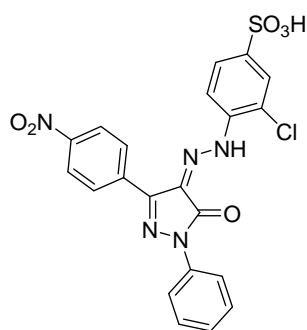
Verbindung **16** wurde mit dem Hydrazonderivat **17** umgesetzt, um Verbindung **18** darzustellen.

Ausbeute 57,3 mg (53 %) als oranger Feststoff, Reinheit 97 %

$C_{26}H_{22}N_6O_8S$, $M = 578,55 \text{ g/mol}$

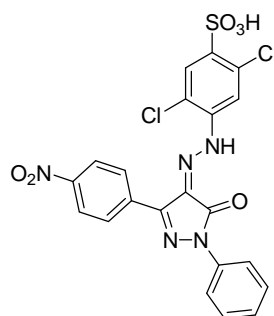
HRMS (ESI): ber. $[m/z] 577,1147 [M-H]^+$, gef. $[m/z] 577,1145 [M-H]^+$

Darstellung der Verbindungen 3-Chlor-4-((2Z)-2-[3-(4-nitrophenyl)-5-oxo-1-phenyl-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-yliden]hydrazino)benzolsulfonsäure 21 und 2,5-Dichlor-4-((2Z)-2-[3-(4-nitrophenyl)-5-oxo-1-phenyl-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-yliden]hydrazino)benzolsulfonsäure 22



21

$C_{21}H_{14}ClN_5O_6S$, $M = 499,88 \text{ g/mol}$



22

$C_{21}H_{13}Cl_2N_5O_6S$, $M = 534,33 \text{ g/mol}$

Verbindungen **21** und **22** wurden ausgehend von Verbindung **4a** gemäß **Prozedur III** mit 3-Chlor-4-hydrazinobenzolsulfonsäure bzw. 2,5-Dichlor-4-hydrazinobenzolsulfonsäure umgesetzt. Anschließend wird zu beiden Reaktionsmischungen Phenylhydrazin dazugegeben um das Produkt **21** bzw. **22** zu erhalten.

Die folgenden Verbindungen (**23-63**) wurden ausgehend von Verbindung **4a** gemäß **Prozedur III** mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure Hemihydrat umgesetzt. Anschließend wurde das entsprechende Hydrazinderivat dazugegeben um die Produkte **23-63** zu erhalten. Nachfolgend werden die im negativen Modus gemessenen ToF-Daten gezeigt ($[M-H]^-$) (Tabelle 22).

Tabelle 22: ToF-Daten für die Verbindungen 23-63

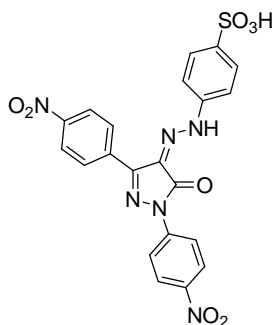
Name	Summenformel	ber. $[m/z]$ $[M-H]^-$	gef. $[m/z]$ $[M-H]^-$
5	$C_{21}H_{15}N_5O_6S$	464,067	464,0675
6	$C_{21}H_{15}ClN_4O_4S$	453,043	453,0446
7	$C_{22}H_{15}F_3N_4O_4S$	487,0693	487,0696
8	$C_{21}H_{15}FN_4O_6S_2$	501,0344	501,0359
9	$C_{21}H_{17}N_5O_6S_2$	498,0547	498,0547
10	$C_{22}H_{14}F_3N_5O_4$	468,0998	468,0944
11	$C_{22}H_{14}F_3N_5O_5S$	516,0668	516,0600
21	$C_{21}H_{14}ClN_5O_6S$	498,0353	498,0276
22	$C_{21}H_{13}Cl_2N_5O_6S$	531,9891	531,9915
23	$C_{21}H_{21}N_5O_6S$	470,114	470,116
24	$C_{22}H_{17}N_5O_6S$	478,0827	478,0848
25	$C_{24}H_{21}N_5O_6S$	506,114	506,1143
26	$C_{25}H_{23}N_5O_6S$	520,1369	520,1271
27	$C_{22}H_{17}N_5O_6S$	478,0827	478,0845
28	$C_{22}H_{17}N_5O_7S$	494,0776	494,0783
29	$C_{24}H_{19}N_5O_8S$	536,0954	536,0842
30	$C_{22}H_{15}N_5O_8S$	508,0569	508,0563
31	$C_{22}H_{17}N_5O_7S$	494,0776	494,0799
32	$C_{23}H_{19}N_5O_6S$	492,1056	492,0977

33	$C_{21}H_{14}ClN_5O_6S$	498,0281	498,0285
34	$C_{21}H_{14}ClN_5O_6S$	498,0281	498,0291
35	$C_{21}H_{14}ClN_5O_6S$	498,0281	498,0287
36	$C_{22}H_{14}F_3N_5O_6S$	532,0544	532,0546
37	$C_{21}H_{14}BrN_5O_6S$	541,9775	541,9744
38	$C_{21}H_{14}BrN_5O_6S$	541,9775	541,9778
39	$C_{21}H_{14}N_6O_8S$	511,0667	511,0669
40	$C_{21}H_{13}Cl_2N_5O_6S$	531,9891	531,9898
41	$C_{22}H_{16}ClN_5O_7S$	528,0386	528,0392
42	$C_{23}H_{19}N_5O_8S$	524,0882	524,0888
43	$C_{22}H_{12}Cl_2F_3N_5O_6S$	601,9837	601,9766
44	$C_{21}H_{10}F_5N_5O_6S$	554,0199	554,0214
45	$C_{28}H_{21}N_5O_7S$	570,1089	570,1097
46	$C_{21}H_{22}N_6O_7S$	501,1198	501,121
47	$C_{26}H_{22}N_6O_8S$	577,1147	577,1145
48	$C_{28}H_{20}N_6O_6S$	567,1092	567,1088
49	$C_{23}H_{17}N_5O_8S$	524,0871	524,0873
50	$C_{22}H_{15}N_5O_8S$	510,0714	510,0713
51	$C_{22}H_{14}N_6O_6S_2$	521,0343	521,034
52	$C_{22}H_{13}ClN_6O_6S_2$	554,9954	554,9942
53	$C_{22}H_{14}N_6O_7S$	505,0645	505,0594
54	$C_{24}H_{16}N_6O_6S_2$	547,05	547,0523
55	$C_{19}H_{12}ClN_7O_6S$	500,0186	500,0194
56	$C_{16}H_{11}N_9O_6S$	456,048	456,0485
57	$C_{19}H_{12}N_{10}O_6S$	507,0589	507,0598
58	$C_{23}H_{15}N_7O_6S$	516,0732	516,074
59	$C_{26}H_{26}N_{10}O_8S$	637,1583	637,1585
60	$C_{22}H_{14}N_6O_8S_2$	553,0315	553,0264
61	$C_{18}H_{15}N_7O_6S$	456,0732	456,0741
62	$C_{24}H_{20}N_8O_6S$	547,1154	547,1165
63	$C_{25}H_{19}N_7O_6S_2$	576,0087	576,0838

Alle getesteten Verbindungen besitzen eine Reinheit > 90 %.

Die Verbindungen **39**, **49** und **50** werden ausführlich gezeigt.

Darstellung von 4-{{(2Z)-2-[1,3-Bis(4-nitrophenyl)-5-oxo-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-yliden]hydrazino}benzolsulfonsäure 39



Verbindung **4a** wird gemäß **Prozedur III** mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure Hemihydrat umgesetzt. Anschließend wird 4-Nitrophenylhydrazin (97 %, ≥ 30 % zur Stabilisierung) dazugegeben um das Produkt **39** zu erhalten.

Ausbeute: 99,5 mg (92 %) als oranger Feststoff, Reinheit 95 %

$C_{21}H_{14}N_6O_8S$, $M = 510,44$ g/mol

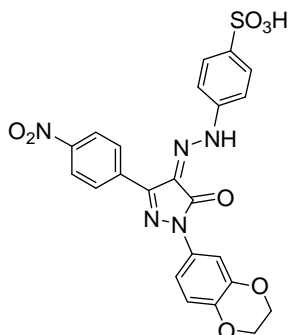
mp 304-306 °C

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 9,19 (s, 1H, NH), 8,58-8,49 (m, 8H, arom.), 7,76-7,70 (m, 4H, arom.).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 161,7, 157,3, 148,7, 143,2, 141,6, 140,8, 133,1, 128,3, 127,1, 124,1, 117,8, 116,4.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 511,0667 [M-H] $^-$, gef. [m/z] 511,0669 [M-H] $^-$

Darstellung von 4-{{(2Z)-2-[1-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-3-(4-nitrophenyl)-5-oxo-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-yliden]hydrazino}benzolsulfonsäure 49



Verbindung **4a** wird gemäß **Prozedur III** mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure

Hemihydrat umgesetzt. Anschließend wird (2,3-Dihydro-benzo[1,4]dioxin-6-yl)hydrazin Hydrochlorid dazugegeben um das Produkt **49** zu erhalten.

Ausbeute: 83,7 mg, (75 %) als rot-brauner Feststoff, Reinheit 98 %

$C_{23}H_{17}N_5O_8S$, $M = 523,47$ g/mol

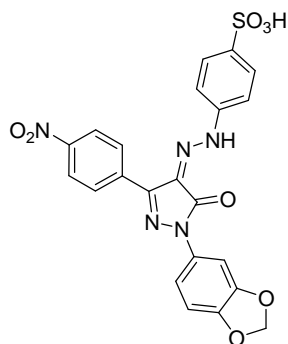
mp 281-283 °C

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 9,90 (s, 1H, NH), 8,47-8,40 (m, 4H, arom.), 7,72-7,51 (m, 5H, arom.), 7,01-6,81 (m, 2H, arom.), 4,29 (m, 4H, 2x CH_2).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 161,0, 153,9, 146,1, 143,4, 140,4, 136,1, 134,6, 131,3, 128,1, 127,2, 126,5, 124,2, 120,6, 118,5, 118,1, 116,2, 112,1, 64,17.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 524,0871 [$M-H$] $^-$, gef. [m/z] 524,0873 [$M-H$] $^-$

Darstellung von 4-((2Z)-2-[1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-(4-nitrophenyl)-5-oxo-1,5-dihydro-4H-pyrazol-4-yliden]hydrazino)benzolsulfonsäure **50**



Verbindung **4a** wird gemäß **Prozedur III** mit 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure Hemihydrat umgesetzt. Anschließend wird 1,3-Benzodioxol-5-ylhydrazine dazugegeben um das Produkt **50** zu erhalten.

Ausbeute: 53,4 mg (53 %) als brauner Feststoff, Reinheit 96 %

$C_{22}H_{15}N_5O_8S$, $M = 509,45$ g/mol

mp 301-303 °C

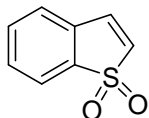
1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,48-8,40 (m, 6H, arom.), 7,68 (d, arom., $J = 5$ Hz), 7,06 (d, arom., $J = 9$ Hz), 6,09 (s, 2H, CH_2).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 161,3, 157,0, 147,7, 145,3, 143,6, 141,2, 128,3, 127,4, 124,3, 119,6, 116,4, 112,6, 101,8, 101,1.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 510,0714 [$M-H$] $^-$, gef. [m/z] 510,0713 [$M-H$] $^-$

6.2.2 Fragmentsynthese

Synthese von Benzo[*b*]thiophen-1,1-dioxid 75



Das Benzothiophen (1 eq) wird mit Natriumperborat Tetrahydrat (4 eq) in Eisessig für 16 h bei RT gerührt.

Ausbeute: 70 % als weißer Feststoff, Reinheit 98 %

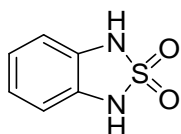
$C_8H_6O_2S$, $M = 166,20$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7,83 (d, 1H, arom., $J = 7$ Hz), 7,70-7,57 (m, 4H), 7,36-7,34 (d, 1H, arom., $J = 7$ Hz).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 136,3, 134,1, 132,9, 131,1, 130,8, 126,0, 121,1.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 167,0161 [$M-H$] $^-$, gef. [m/z] 167,0161 [$M-H$] $^-$

Synthese von 1,3-Dihydro-2,1,3-benzothiadiazol-2,2-dioxid 78



Das *o*-Phenylendiamin (1 eq) wird mit Schwefelsäurediamid (1,2 eq) in Diglyme gelöst und zu auf 100 °C erwärmtes Diglyme langsam zugetropft und für 45 min bei 100 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Die Etherphase wird einmal mit wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung und einmal mit H₂O gewaschen. Es wird über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 99,6 mg (quantitativ) als hellrosa Feststoff, Reinheit 95 %

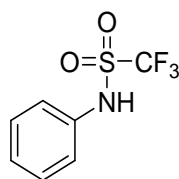
$C_6H_6N_2O_2S$, $M = 170,189$ g/mol

mp 226-228 °C

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 6,83-6,77 (m, 4H, arom.), 2,51 (s, 2H, NH).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 133,6, 118,7, 108,9.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 169,0077 [$M-H$] $^-$, gef. [m/z] 169,0077 [$M-H$] $^-$

Synthese von 1,1,1-Trifluor-*N*-phenylmethansulfonamid 84

Unter Stickstoff wird Anilin **82a** (1 eq) in trockenem DCM gelöst und mit NaHCO₃ (4 eq) versetzt. Anschließend wird Trifluormethansulfonsäureanhydrid (2 eq) langsam zugetropft und die Reaktionsmischung für 16 h bei RT gerührt. Danach wird H₂O dazugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Es wird über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 440 mg (71 %) als weißer Feststoff, Reinheit 94 %

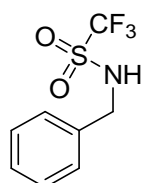
C₇H₆F₃NO₂S, M = 225,19 g/mol

mp 66-68 °C

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,41-7,28 (m, 5H, arom.), 6,92 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 133,7, 129,7 127,6, 123,7, 121,9, 117,6.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 223,9999 [M-H]⁻, gef. [m/z] 224,0003 [M-H]⁻

Synthese von *N*-Benzyl-1,1,1-trifluormethansulfonamid 85

Unter Stickstoff wird Benzylamin **82b** (1 eq) in trockenem DCM gelöst und mit NaHCO₃ (4 eq) versetzt. Anschließend wird Trifluormethansulfonsäureanhydrid (2 eq) langsam zugetropft und die Reaktionsmischung für 16 h bei RT gerührt. Danach wird H₂O dazugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Es wird über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 270 mg (46 %) als gelber Feststoff, Reinheit 93 %

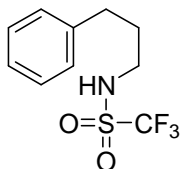
C₈H₈F₃NO₂S, M = 239,22 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,39-7,31 (m, 5H, arom.), 5,09 (s, 1H, NH), 4,44 (s, 2H, CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 135,1, 129,1, 128,7, 127,9, 121,8, 117,6, 48,29.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 238,0155 [M-H^-], gef. [m/z] 238,0158 [M-H^-]

Synthese von 1,1,1-Trifluor-*N*-(3-phenylpropyl)methansulfonamid **86**



Unter Stickstoff wird 3-Phenylpropylamin **82c** (1 eq) in trockenem DCM gelöst und mit NaHCO_3 (4 eq) versetzt. Anschließend wird Trifluormethansulfonsäureanhydrid (2 eq) langsam zugetropft und die Reaktionsmischung für 16 h bei RT gerührt. Danach wird H_2O dazugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Es wird über MgSO_4 getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 216 mg (44 %) als gelbes Öl, Reinheit 90 %

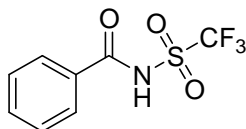
$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_2\text{S}$, $M = 267,27$ g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7,33-7,16 (m, 5H, arom.), 4,79 (s, 1H, NH), 3,35-3,30 (t, 2H, CH_2 , $J = 7$ Hz), 2,72-2,67 (t, 2H, CH_2 , $J = 8$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 140,6, 128,7, 128,3, 126,4, 117,5, 44,0, 32,6.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 266,0468 [M-H^-], gef. [m/z] 266,0474 [M-H^-]

Synthese von *N*-[(Trifluormethan)sulfonyl]benzamid **89**



Benzoessäure **87** (1 eq) wird mit Trifluormethansulfonamid **88** (1,1 eq), EDC (1,1 eq) und DMAP (0,1 eq) in DCM gelöst. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei RT gerührt und anschließend mit Wasser versetzt. Die organische Phase wird dann einmal mit wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 95,7 mg (63 %) als weißer Feststoff, Reinheit 95 %

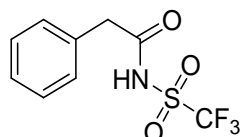
$C_8H_6F_3NO_3S$, $M = 253,20$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7,95-7,93 (d, 2H, arom., $J = 7$ Hz), 7,62-7,44 (m, 3H, arom.), 3,83 (s, 1H, NH).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166,6, 140,1, 133,7, 128,8, 128,7, 106,5.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 254,0093 [$M-H$]⁻, gef. [m/z] 254,0085 [$M-H$]⁻

Synthese von 2-Phenyl-*N*-[(trifluormethan)sulfonyl]acetamid **91**



Unter Stickstoff wird Trifluormethansulfonamid **88** mit Et_3N (2 eq) in Aceton gelöst. Das Phenylacetylchlorid **90a** wird langsam zu der Reaktionsmischung dazugetropft. Anschließend wird für 1 h bei 56 °C gerührt. Die Lösung wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 252 mg (76 %) als weißer Feststoff, Reinheit 98 %

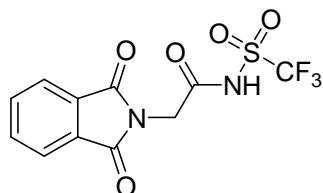
$C_9H_8F_3NO_3S$, $M = 267,23$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7,40-7,23 (m, 5H), 5,38 (s, 1H, NH), 3,80 (s, 2H, CH_2).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167,9, 131,2, 129,5, 128,5, 43,7.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 290,0069 [$M+Na$]⁺, gef. [m/z] 290,0071 [$M+Na$]⁺

Synthese von 2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-*N*-[(trifluormethan)sulfonyl]acetamid **92**



Unter Stickstoff wird Trifluormethansulfonamid **88** mit Et_3N (2 eq) in Aceton gelöst. Das Phthalylglycylchlorid **90b** wird langsam zu der Reaktionsmischung dazugetropft. Anschließend wird für 1 h bei 56 °C gerührt. Die Lösung wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit

wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 209 mg (51 %) als weißer Feststoff, Reinheit 94 %

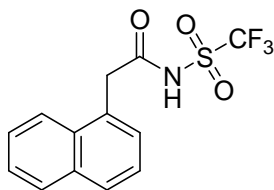
C₁₁H₇F₃N₂O₅S, M = 336,24 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8,92 (s, 1H, NH), 7,94-7,86 (m, 4H, arom.), 4,31 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 168,8, 167,2, 134,8, 131,4, 123,3, 112,5, 40,1.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 337,0101 [M-H]⁻, gef. [m/z] 337,01 [M-H]⁻

Synthese von 2-(1-Naphthyl)-N-[(trifluormethan)sulfonyl]acetamid 93



Unter Stickstoff wird Trifluormethansulfonamid **88** mit Et₃N (2 eq) in Aceton gelöst. Das Naphth-1-ylacetylchlorid **90c** wird langsam zu der Reaktionsmischung zugegeben. Anschließend wird für 1 h bei 56 °C gerührt. Die Lösung wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 273 mg (51 %) als gelber Feststoff, Reinheit 96 %

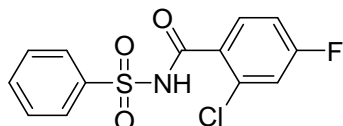
C₁₃H₁₀F₃NO₃S, M = 317,28 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,98-7,81 (m, 3H, arom.), 7,55-7,38 (m, 4H, arom.), 4,04 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 172,8, 133,3, 132,0, 128,3, 128,0, 127,5, 127,2, 125,9, 125,5, 125,4, 124,2, 124,2, 121,9, 117,5, 42,2.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 316,0261 [M-H]⁻, gef. [m/z] 316,0271 [M-H]⁻

Synthese von 2-Chlor-4-fluor-N-(phenylsulfonyl)benzamid 96



Benzolsulfonamid **94** (1,1 eq) wird mit 2-Chloro-4-fluorobenzoessäure **95a** (1eq), EDC (1,1 eq) und DMAP (0,1 eq) in DCM gelöst. Die Reaktionsmischung wird bei RT für 16 h gerührt. Die Lösung wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 77 mg (42 %) als weißer Feststoff, Reinheit 95 %

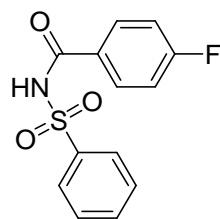
C₁₃H₉ClFNO₃S, M = 313,73 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8,00-7,97 (m, 2H, 2CH arom.), 7,69-7,50 (m, 5H, arom.), 7,33-7,25 (m, 1H, -CH₂-CF-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 164,2, 161,1, 160,0, 140,0, 135,6, 132,9, 132,1, 131,7, 128,9, 125,5, 117,6, 117,3, 114,7, 114,4.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 314,0048 [M+H]⁺, gef. [m/z] 314,0047 [M+H]⁺

Synthese von 4-Fluor-N-(phenylsulfonyl)benzamid **97**



Benzolsulfonamid **94** (1,1 eq) wird mit 4-Fluorobenzoessäure **95b** (1eq), EDC (1,1 eq) und DMAP (0,1 eq) in DCM gelöst. Die Reaktionsmischung wird bei RT für 16 h gerührt. Die Lösung wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

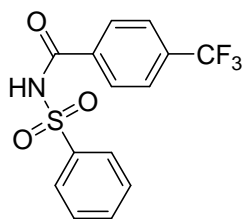
Ausbeute: 61 mg (38 %) als weißer Feststoff, Reinheit 95 %

C₁₃H₁₀FNO₃S, M = 279,29 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8,00-7,91 (m, 4H), 7,74-7,61 (m, 3H, arom.), 7,34-7,28 (m, 2H, arom.-F).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 166,3, 164,3, 163,3, 139,4, 133,7, 132,1, 131,5, 131,3, 129,1, 127,6, 115,8, 115,5.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 280,0438 [M+H]⁺, gef. [m/z] 280,0437 [M+H]⁺

Synthese von 4-Trifluormethyl-N-(phenylsulfonyl)benzamid 98

Benzolsulfonamid **94** (1,1 eq) wird mit 4-(Trifluormethyl)benzoesäure **95c** (1eq), EDC (1,1 eq) und DMAP (0,1 eq) in DCM gelöst. Die Reaktionsmischung wird bei RT für 16 h gerührt. Die Lösung wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit wässriger HCl, einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

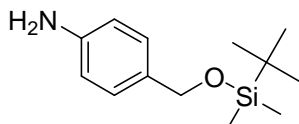
Ausbeute: 41 mg (22 %) als weißer Feststoff, Reinheit 95 %

C₁₄H₁₀F₃NO₃S, M = 329,29 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,18-8,15 (d, 2H, arom. CF₃, J = 8 Hz), 7,95-7,02 (d, 2H, arom. CF₃, J = 8 Hz), 7,71-7,52 (m, 5H, arom.).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 163,2, 138,1, 135,2, 134,4, 129,1, 128,7, 128,4, 126,0, 125,1, 121,5.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 330,0406 [M+H]⁺, gef. [m/z] 330,0408 [M+H]⁺

6.2.3 Synthese des Aldehyds 103**Schützung von (4-Aminophenyl)methanol mit *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe 100**

Unter Stickstoff wird *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (2,5 eq) mit Imidazol (9 eq) in THF vorgelegt. Nach 30 min wird (4-Aminophenyl)methanol dazugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit DCM aufgenommen und mit NaHCO₃-Lösung gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Silicagel mit Ethylacetat/Hexan (20:80, v/v) gereinigt.

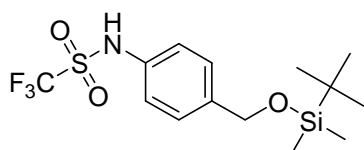
Ausbeute: 1,7597 g (91 %) als braunes Öl, Reinheit 85 %

$C_{13}H_{23}NOSi$, $M = 237,41$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 6,97 (d, 2H, arom., $J = 9$ Hz), 6,69 (d, 2H, arom., $J = 9$ Hz), 4,69 (s, 2H, CH_2), 4,50 (s, 2H, NH_2), 0,91 (s, 9H, *tert*-Butylgr.), 0,17 (s, 6H, 2 CH_3).

MS (ESI): ber. [m/z] 238,2 [$M+H$] $^+$, gef. [m/z] 238,2 [$M+H$] $^+$

Umsetzung mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid zur Verbindung 101



Unter Stickstoff wird die geschützte Säure **100** in DCM gelöst und mit Et_3N (2,5 eq) versetzt. Bei -78 °C wird Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1,1 eq) langsam zugetropft. Es wurde für 3 h gerührt, mit Wasser versetzt und anschließend mit DCM extrahiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Silicagel mit Ethylacetat/Hexan (25:75, v/v) gereinigt.

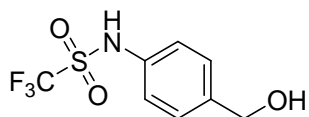
Ausbeute: 242 mg (31 %) als braunes Öl, Reinheit 90 %

$C_{14}H_{22}F_3NO_3SSi$, $M = 369,48$ g/mol

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7,73 (d, 2H, arom., $J = 9$ Hz), 7,07 (d, 2H, arom., $J = 9$ Hz), 4,68 (s, 2H, CH_2), 0,90 (s, 9H, *tert*-Butylgr.), 0,07 (s, 6H, 2 CH_3).

MS (ESI): ber. [m/z] 368,1 [$M-H$] $^-$, gef. [m/z] 367,9 [$M-H$] $^-$

Entschützung zur Verbindung 102



Das Edukt **101** wird in THF gelöst und mit Tetrabutylammoniumfluorid (2 eq) bei 0 °C versetzt. Die Reaktionsmischung wird bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wird die Reaktion mit Wasser versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

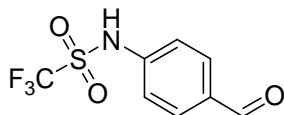
Ausbeute: 146 mg (quantitativ) als gelbes Öl, Reinheit 90 %

$C_8H_8F_3NO_3S$, $M = 255,21$ g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,28 (d, 2H, arom., *J* = 8 Hz), 7,15 (d, 2H, arom., *J* = 8 Hz), 5,24 (s, 1H, OH), 4,45 (s, 2H, CH₂).

MS (ESI): ber. [*m/z*] 254,0 [M-H]⁻, gef. [*m/z*] 254,1 [M-H]⁻

Oxidation zur Verbindung 103



Das Edukt **102** wird in CHCl₃ gelöst und mit Mangandioxid (5 eq) für 3 h auf 65 °C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 87 mg (quantitativ) als braunes Öl, Reinheit 95 %

C₈H₆F₃NO₃S, M = 253,20 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9,93 (s, 1H, NH), 7,86-7,84 (d, 2H, CH arom.-COH, *J* = 9 Hz), 7,44-7,41 (d, 2H, CH arom., *J* = 9 Hz).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 191,1, 142,4, 133,3, 131,2, 121,6, 115,4, 112,5, 105,3, 102,6.

HRMS (ESI): ber. [*m/z*] 251,9948 [M-H]⁻, gef. [*m/z*] 251,9946 [M-H]⁻

6.2.4 Roboterunterstützte Synthese einer Verbindungsbibliothek

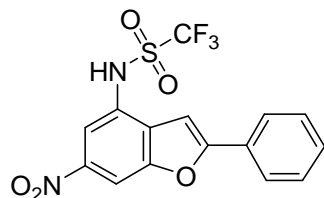
Die Durchführung der Synthese am Roboter und anschließende Analytik der Bibliothek wurde von Dr. Boo Geun Kim (AG Rademann, FMP) durchgeführt. Unter Stickstoff werden 1 eq Amin (5 μM) und 2 eq Et₃N (10 μM) in trockenem 1,2-Dichlorethan gelöst. Anschließend werden 5 eq des Trifluormethansulfonsäureanhydrids (25 μM) bei 2 °C langsam zugegeben. Es wird für 8 h bei einer Temperatur von 2 °C geschüttelt. Die LC/MS-Analytik der Produkte wird ohne weitere Reinigung durchgeführt.

6.2.5 Triflatsynthese

Die Synthesen der folgenden drei Verbindungen werden nach folgender Methode mit verschiedenen Basen durchgeführt. Unter Stickstoff wird das Amin (1 eq) im jeweiligen Lösungsmittel gelöst und mit der jeweiligen Base versetzt. Bei 0 °C wird Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1,2 eq) langsam zugetropft.

Es wurde bei RT gerührt, anschließend mit Wasser versetzt und mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

6-Nitro-2-phenylbenzofuran-4-trifluormethylsulfonamid 117_isoliert



Das Amin **129** (1 eq) wird in DCM mit NaHCO₃ (4 eq) gelöst, mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1,2 eq) versetzt und für 40 min gerührt.
Ausbeute: 33,0 mg (quantitativ) als gelber Feststoff, Reinheit 98 %

C₁₅H₉F₃N₂O₅S, M = 386,30 g/mol

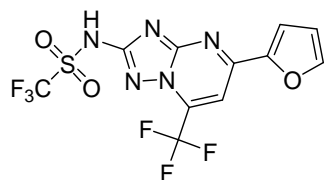
mp 185-187 °C

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,08-8,07 (m, 1H, arom.), 7,95-7,93 (m, 1H, arom.), 7,89 (s, 1H, arom.), 7,74 (s, 1H, arom.), 7,55-7,42 (m, 3H, arom.).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 161,7, 157,3, 149,4, 140,3, 130,3, 129,2, 128,5, 125,8, 120,9, 119,3, 115,8, 113,2, 108,1, 104,7, 101,1, 96,1.

HRMS (ESI): ber. [m/z] 387,0257 [M+H]⁺, gef. [m/z] 387,0267 [M+H]⁺

7-(Trifluormethyl)-5-(furan-2-yl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyrimidin-2-trifluormethylsulfonamid 118_isoliert



Das Amin **130** (1 eq) wird in 1,2-Dichlorethan mit Et₃N (2 eq) gelöst, mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid (5 eq) versetzt und für 30 min gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt.

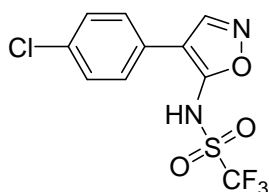
Ausbeute: 12,3 mg (81 %) als gelber Feststoff, Reinheit 96 %

C₁₁H₅F₆N₅O₃S, M = 401,24 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,79 (s, 1H, CH, heterozkl.), 7,23 (s, 1H, CH-O, Furanrest), 7,06 (s, 1H, CH, Furanrest), 6,81-6,78 (m, 1H, CH, Furanrest).

HRMS (ESI): ber. [*m/z*] 399,9945 [M-H]⁻, gef. [*m/z*] 399,9953 [M-H]⁻

4-(4-Chlorphenyl)isoxazol-5-trifluormethylsulfonamid 122_isoliert



Das Amin **131** (1 eq) wird in 1,2-Dichlorethan mit Et₃N (2 eq) gelöst, mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid (5 eq) versetzt und 16 h gerührt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Silicagel mit Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:10, v/v) gereinigt.

Ausbeute: 106 mg (63 %) als gelbes Öl, Reinheit 98 %

C₁₀H₆ClF₃N₂O₃S, M = 326,68 g/mol

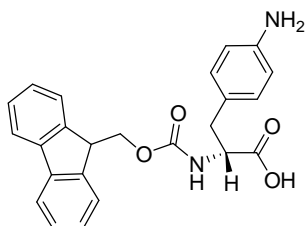
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,75-7,72 (d, 2H, arom. Cl, *J* = 9 Hz), 7,49-7,46 (d, 2H, arom., *J* = 9 Hz), 5,82 (s, 1H, CH, heterozkl.).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 171,7, 161,0, 133,9, 129,2, 128,9, 127,8, 124,8, 119,1, 81,9.

HRMS (ESI): ber. [*m/z*] 326,9813 [M-H]⁻, gef. [*m/z*] 326,9816 [M-H]⁻

6.2.6 Synthese des Bausteins für die die Festphasensynthese

Fmoc-Phe(-4-NO₂)-NH₂ 133



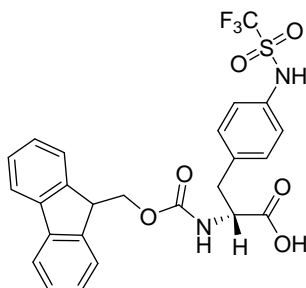
Das Fmoc-Phe(-4-NO₂)-OH **132** wird in EtOH gelöst und mit SnCl₂ x H₂O (9 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf 60 °C für 90 min in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wird wässrige NaHCO₃-Lösung dazugegeben und der entstehende weiße Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, mit HCl angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 97,1 mg (quantitativ) als weißer Feststoff, Reinheit 95 %

C₂₄H₂₂N₂O₄, M = 402,44 g/mol

MS (ESI): ber. [m/z] 403,4 [M+H]⁺, gef. [m/z] 403,1 [M+H]⁺

Fmoc-Phe(-4-NO₂)-NHSO₂CF₃ 134



Das Edukt **133** wird in DCM gelöst und NaHCO₃ dazu gegeben. Unter Stickstoff und Eiskühlung wird das Anhydrid langsam zugetropft. Nach 40 min wird die Reaktionsmischung mit H₂O versetzt und mit DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 36,3 mg (85 %) als weißer Feststoff, Reinheit 93 %

C₂₅H₂₁F₃N₂O₆S, M = 534,50 g/mol

HRMS (ESI): ber. [m/z] 535,1145 [M-H]⁻, gef. [m/z] 535,1157 [M-H]⁻

6.2.7 Festphasensynthese

Mit Hilfe der Fmoc-Strategie wurde die Sequenz „AEAVGRSPDPAK“ um drei Aminosäuren verlängert. Die Fmoc-Abspaltung wird mit Piperidin/DMF durchgeführt (1x1 min, 2x10 min). Anschließend wird das Harz jeweils mit DMF, THF und DCM gründlich gewaschen. Als Kupplungsbedingung wird DIC/HOBt (4,9:5 eq) in DMF verwendet. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wird eine Acetylierung der Sequenz mit DMF:Ac₂O:DIPEA (1,4:0,2:0,4) für 15 min durchgeführt. Die Peptidsequenz wird durch TFA/H₂O (20:1) für 3 h vom Harz abgespalten.

Die Vollständigkeit der Acylierungsreaktionen auf primäre Amine bei der Bildung von Peptidbindungen wurde mittels Kaiser-Test (Nachweis primärer Amine mit Ninhydrin) untersucht. Für den Kaiser-Test wurden folgende Reagenzlösungen verwendet:

- Lösung I: 1 ml aq. KCN (1 mM)+ 49 ml Pyridin
- Lösung II: 2 g Ninhydrin in 40 ml *n*-Butylalkohol
- Lösung III: 80 g Phenol in 20 ml *n*-Butylalkohol

Zur Durchführung werden wenige Harzkugeln in einem Eppendorf-Gefäß mit je einem Tropfen der drei Reagenzlösungen versetzt und die Suspension für 5 min bei 110 °C erhitzt. Sind freie Amino-Gruppen vorhanden, so tritt eine Blaufärbung der Lösung auf.

Synthese der Peptidsequenz 135

Ac-EF-4-NO₂-FAEAVGRSPDPAK

61,5 mg (45 %) als weißer Feststoff, Reinheit > 95 %

C₇₇H₁₁₃N₂₁O₂₅, M = 1732,85 g/mol

HRMS (ESI): ber. [*m/z*] 1732,8289 [M-H]⁻, gef. [*m/z*] 1732,8266 [M-H]⁻

Synthese der Peptidsequenz 136

Ac-EF-4-NH₂SO₂CF₃-FAEAVGRSPDPA

25,4 mg (31 %) als weißer Feststoff, Reinheit > 95 %

C₇₈H₁₁₄F₃N₂₁O₂₅S, M = 1834,93 g/mol

HRMS (ESI): ber. [*m/z*] 1834,804 [M-H]⁻, gef. [*m/z*] 1834,8036 [M-H]⁻

6.3 Biologische Methoden

Die verwendeten Zellmedien, Lösungen und weiteren Bestandteile für die nachfolgenden Zelleexperimente wurden, wenn nicht anderes beschrieben, von den Firmen Sigma Aldrich, Invitrogen, Santra Cruz, Perkin Elmer bezogen.

6.3.1 Verwendete Protein-Tyrosin-Phosphatasen beim Phosphatase-Assay

Die rekombinanten und enzymatisch aktiven Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-2, SHP-1, PTP1B, sowie die SHP-2 Mutante E76K und die katalytische Domäne von SHP-2 wurden in *E. coli* SCS1 Rosetta und *E. coli* SCS1 Rosetta T1R exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Kerstin Böhm, AG Prof. Heinemann, MDC) [124]. Prof. Stefan Knapp (Oxford, UK) stellte ebenfalls die katalytische Domäne von SHP-2 zur Verfügung. Das Protein SHP-1 wurde von Klaus Hellmuth (AG Prof. W. Birchmeier, MDC) bereitgestellt.

Tabelle 23: Übersicht der verwendeten Lösungen und Puffer beim SDS-PAGE und Westernblot

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Laemmli Laufpuffer (10-fach)	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Probenladungspuffer (4-fach)	240 mM Tris/HCl (pH 6,8), 40 % Glycerol, 8 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol, 0,04 % Bromphenolblau
Marker	Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ (Bio-Rad)
Coomassie Blue	80 mg Coomassie-Brillant-Blau G250 in 1 l H ₂ O, 3 % HCl (konz.)
Blotpuffer (10-fach)	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin (pH 8,6)
Ponceau-Färbelösung	0,5 % Ponceau S in 5 % Essigsäure
Blockingpuffer	PBS mit 0,1 % Tween 20, 1 % Magermilchpulver
Primärantikörper	monoklonaler Antikörper, Rabbit anti Human SHP-2, Verdünnung 1:2000 im Blockingpuffer
Sekundärantikörper	polyklonaler Antikörper, Goat anti Rabbit (Antikörper POD markiert) Verdünnung 1:2000 im Blockingpuffer

SDS-PAGE und Westernblot

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese wird ein SDS-Puffer (Natriumdodecylsulfat-Puffer), ein Gradientengel (4-20 %) Criterion™ Precast Gel von (Bio-Rad) und als Größen-Standard Precision Plus Dual Color (Bio-Rad) verwendet. Die Gelkammer ist eine Criterion (Bio-Rad) mit Power Supply (Bio-Rad). Die Probe wird mit Probenladungspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend werden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 160 V für 90 min.

Nach der Elektrophorese werden die Proteine im Gel mit dem Farbstoff Coomassie Blue gefärbt und das Molekulargewicht anhand der Laufweite der Proteine im Gel mittels Markerproteinen bestimmt.

Für den anschließenden Westernblot wird das Gel in den Blotpuffer überführt. Die Transfermembran Polyvinylidenfluorid (PVDF) Immobilon-P™ wird für 10 s in 100 % Methanol aktiviert und anschließend mit Hilfe einer Criterion Blotter Kammer für 1 h mit 90 mA vom Gel auf die Membran transferiert. Danach führt man eine Kontrolle des Transfers durch Ponceau-Färbung durch, als Entfärbelösung benutzt man PBS. Darauffolgend wird die Membran für 1 h bei RT geblockt. Die Membran wird mit dem Primärantikörper für 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nachfolgend wird die Membran 3 x 10 min mit PBS/Tween 20 gewaschen. Im Anschluss wird die Membran mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach wird für 3 x 10 min mit PBS/Tween 20 gewaschen. Die Membran wird mit Western Lightning Plus- ECL (Perkin Elmer) entwickelt. Die Aufnahmen werden mit einem Imaging System, dem LAS-4000 von Fujifilm Life Science USA gemacht.

6.3.2 Bestimmung der IC₅₀-Werte mittels Phosphatase-Assay

6.3.2.1 pNPP-Assay

Tabelle 24: Übersicht der verwendeten Enzyme und Puffer im pNPP-Assay

Enzym	Puffer im pNPP-Assay
SHP-2	1 M Tris-HCl (pH 7.0), 5 M NaCl,
MptpA	Glycerol, 500 mM EDTA (pH 8.0), 10 % Brij 35, 1 M DTT

Die Verbindungen werden zu 10 mM oder 100 mM in DMSO gelöst. Die zu testenden Verbindungen in Puffer werden mit dem Enzym MptpA (50 ng/Well) oder SHP-2 (500 ng/Well) für 1 h bei RT inkubiert. Zum Starten der Enzymreaktion wird die pNPP-Lösung dazugegeben (Endkonzentration: 10 mM). Die Reaktion erfolgt mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Die Reaktionskinetik der Absorption wird bei 405 nm mit dem Genios Pro Reader gemessen (400 nm Filter mit 35 nm Bandbreite). Die Platten werden über 12 Zyklen mit 3 Wiederholungen per Well bei 37 °C vermessen. Die Bestimmung der Aktivitäten und Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm Excel (2007, Microsoft).

6.3.2.2 DiFMUP-Assay

Tabelle 25: Übersicht der verwendeten Enzyme und Puffer im DiFMUP-Assay

Enzym	Puffer im DiFMUP-Assay	K_M -Wert
SHP-2 SHP-2 (E76K)	TrisBis (pH 6,5)	25 μ M
SHP-1	TrisBis (pH 6,5)	25 μ M
PTP1B	MOPSO (pH 6,5)	15,5 μ M
MptpA	Bicine (pH 7,5)	15 μ M
Pufferzusätze: 50 mM des jeweiligen Puffers, 10 mM NaCl, 0,03 % Tween 20, 0,1 % BSA, 25 mM DTT (frisch dazugegeben)		

Die Verbindungen werden zu 10 mM oder 100 mM in DMSO gelöst. Die Arbeitsplatte (Greiner, schwarz, Flachboden) wird mit Puffer und mit Testverbindungen per Roboter ausgehend von einer Vorverdünnungsplatte beladen. Anschließend wird die Platte zentrifugiert und geschüttelt. Die zu testenden Verbindungen in Puffer werden mit dem jeweiligen Enzym für 1 h bei RT inkubiert. Danach wird die Enzymreaktion mit einer DiFMUP-Lösung gestartet. Die Reaktion erfolgt mit einem Gesamtvolumen von 30 μ l. Die Positivkontrolle beinhaltet das Enzym und DiFMUP ohne Verbindung und die Negativkontrolle nur DiFMUP ohne weitere Komponenten. Es wird mit dem Genios Pro Reader und der folgenden Methode gemessen (Abb. 91):

360 nm – 460 nm
 SAFIRE II, Instrument serial number: 512000014
 Measurement mode: **Fluorescence Top**
 Excitation wavelength: **360 nm**, Excitation bandwidth: **20.0 nm**
 Emission wavelength: **460 nm**, Emission bandwidth: **20.0 nm**
 Gain (Manual): **60**
 Number of reads: **8**
 FlashMode: **High sensitivity**
 Integration time: **40 µs**
 Lag time: **0 µs**
 Plate definition file: **GRE384fb.pdf**
 Z-Position (Manual): **13900 µm**
 Number of kinetic cycles: **5**, Kinetic interval: **135 s**
 Shake duration (Orbital Low): **5 s**, Shake duration between cycles (Orbital Low): **5 s**
 Unit: **RFU**
 Total kinetic run time: **9 min**

Abbildung 91: Übersicht der verwendeten Reader-Methode im DiFMUP-Assay

Mit dem Programm Prism 5 (für Windows, Version 5.01, Graph Pad Software, Inc.) werden die ermittelten Aktivitäten gegen die Konzentration aufgetragen und auf diese Weise der IC_{50} -Wert der Verbindungen mit dem jeweiligen Enzym berechnet.

6.3.3 Zell-Experimente

Die Zellexperimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, von Chris Eckert (AG Prof. W. Birchmeier) in Zusammenarbeit mit der Screening Unit (Dr. Jens von Kries) durchgeführt und dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 26: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Art	Verwendung
MDCK-C	canine Nierenepithelzellen	HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation
HPAF II	humane Pankreastumorzellen	HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation
LXFA 526L	humane Lungen-Großzeller, Adenokarzinom	Proliferations-Assay Softagar-Assay siRNA-Experiment
LXFL 1647L	humane Lungen-Großzeller	Proliferations-Assay
LXFL 1121L	humane Lungen-Großzeller	Softagar -Assay siRNA-Experiment

6.3.3.1 Kultivierung der Zellen

Tabelle 27: Zusammensetzung des Zellmediums

Medium	Zusammensetzung
Zellmedium	DMEM (Invitrogen) mit 10 % FCS, 1 % Penicilin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)

MDCK-C und HPAF-II Zellen werden in Zellmedium im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz der Zellen wird das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 0,05 % Trypsin/EDTA und Inkubation für 5-10 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt voneinander und von der Oberfläche gelöst. Nach Zugabe von mindestens zwei Volumen Medium werden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in ein geeignetes Volumen mit Medium resuspendiert. Die Zellzahl wird durch Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

6.3.3.2 HGF/SF-stimulierte Zelldissoziation

In eine 96-Well Zellkulturplatte werden 2000 Zellen/Well in einem Volumen von 100 µl ausgesät und für 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Ablauf der 24 h werden die Testverbindungen in den Konzentrationen 10 µM, 5 µM und 2,5 µM in dreifach-Bestimmung in einem Volumen von 1 µl zugegeben. Nach einstündiger Inkubation wird HGF/SF in einer Konzentration von 3 U/ml zugegeben. Die Zellen werden erneut 24 h im Inkubator kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen durch 4 % Paraformaldehyd für 15 min bei RT fixiert. Unter Verwendung des BIO-TEK microplate washer ELx405™ wird einmal mit PBS gewaschen (Programm COR96). Danach wird 5 min eine Permeabilisierung mit 0,1 % Triton® X-100 in PBS durchgeführt und noch einmal mit PBS gewaschen. Für die Kernfärbung wird Hoechst 33258 (Absorption λ_{\max} =343 nm, Sigma-Aldrich) mit der Endkonzentration von 10 µM und 0,25 µg/ml TRITC-Phalloidin (λ_{ex} =540-545 nm, λ_{em} = 570-573 nm, Sigma-Aldrich) für die Actinfärbung verwendet. Nach 20 min wäscht man wieder mit PBS. Bis zur Auswertung mit einem Arrayscan mit Bioapplication Morphology (Cellomics) können die Proben in PBS bei 4 °C gelagert werden.

6.3.3.3 Proliferations-Assay

Der Proliferations-Assay wurde in Freiburg bei der Firma Oncotest durchgeführt.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Zellmediums

Medium	Zusammensetzung
Zellmedium	RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Penicilin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)

Bei der Bestimmung der Proliferationsrate der Zellen wird Propidiumiodid, ein Fluoreszenzfarbstoff, verwendet. Diese Substanz kann in die DNS toter Zellen interkalieren [125]. Durch eine Messung vor und nach dem Lysieren der Zellen, wird die Anzahl der lebenden Zellen zu den toten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Basierend auf diesem Wert zusammen mit dem spezifischen Proliferationsfaktor der verschiedenen Zelllinien und der bestehenden Korrelation der Fluoreszenzunits mit der Zellzahl, kann die Wirkung der Inhibitoren auf die Proliferationsrate ermittelt werden [126].

Der Assay wird in 96-well Platten durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien LXFA 526L und LXFL 1647L werden mit 5000 Zellen/Well ausgesät und anschließend für 24 h im Brutschrank kultiviert. Die Verbindung **50** wird in 10 Konzentrationen beginnend bei 100 µM in DMSO/Medium dazugegeben (Abb. 92). Man verwendet Taxol, ein bekanntes Zytostatikum, als Positivkontrolle, die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen.

CELL LINE	EXP	CTR	raw data	control	Test/Control [%] at Drug Concentration [µM]						Coefficient of Variation				
TYPE	NAME	NO	FU	file	0,00316	0,01	0,0316	0,1	0,316228	1	3,16228	10	31,6228	100	
LXFA	526L	JA337A	1447	APR21_66	100	99	98	103	99	98	104	103	96	76	55
					0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,01	0,03	0,02	0,02	0,04	0,05
LXFL	1647L	JB337A	1994	APR21_66	100	100	97	97	97	96	94	94	97	86	70
					0,03	0,05	0,03	0,01	0,03	0,00	0,01	0,04	0,02	0,02	0,06

XF Xenograft Freiburg derived cell line; CL Cell Line; BXF Bladder, CEXF Cervix, CXF Colorectal, GXF Gastric, LXF Lung, MAXF Breast, MEXF Melanoma, OVXF Ovarian, PRXF Prostate, PXF Pleuramesothelioma, RXF Renal, UXF Uterus Body, XF Miscellaneous Cancer Xenograft

CELL LINE	EXP	CTR	raw data	control	Test/Control [%] at Drug Concentration [µM]						Coefficient of Variation				
TYPE	NAME	NO	FU	file	9,5E-06	3E-05	9E-05	0,0003	0,000949	0,003	0,00949	0,03	0,09487	0,3	
LXFA	526L	JA337B	1375	APR21_67	100	96	99	98	99	96	89	42	21	22	20
					0,02	0,01	0,04	0,02	0,06	0,04	0,07	0,18	0,06	0,08	0,03
LXFL	1647L	JB337B	1962	APR21_67	100	96	97	99	99	100	92	65	28	19	22
					0,04	0,02	0,07	0,01	0,03	0,02	0,01	0,06	0,06	0,08	0,11

XF Xenograft Freiburg derived cell line; CL Cell Line; BXF Bladder, CEXF Cervix, CXF Colorectal, GXF Gastric, LXF Lung, MAXF Breast, MEXF Melanoma, OVXF Ovarian, PRXF Prostate, PXF Pleuramesothelioma, RXF Renal, UXF Uterus Body, XF Miscellaneous Cancer Xenograft

Abbildung 92: Konzentrationen der verwendeten Verbindung 50 und Taxol

6.3.3.4 Durchführung des siRNA-Experimentes

Die Experimente wurden in Freiburg bei der Firma Oncotest durchgeführt. Es werden vier verschiedene siRNA gegen SHP-2 (HP GenomeWide siRNA Hs_PTPN11_1 (A), _5 (B), _6 (C), _7 (D) von Quiagen) in den Konzentrationen 15 und 50 nM an den Zelllinien LXFA 526L und LXFL 1121L getestet. Nach Behandlung der Zellen werden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE (Gel 10 %) aufgetrennt. Als Negativkontrolle wird eine Behandlung ohne siRNA nur mit den Reagenzien durchgeführt. Für den anschließenden Kolonie-Assay wird die siRNA A verwendet (*Kapitel 6.3.3.5*)

6.3.3.5 Softagar-Assay

Der Softagar-Assay wurde in Freiburg bei der Firma Oncotest durchgeführt. Der Softagar-Assay auch TCA (für Tumor Colony Assay) ist ein Modellsystem für das Wachsen und die Inhibition von Tumor- und Stammzellen im dreidimensionalen Raum [127]. Bei diesem Experiment wird ein Agarose-basiertes Zellkultur-System verwendet, welches ausschließlich das Wachstum von Tumor- und Stammzellen unterstützt (Abb. 93). Die unterste Agaroseschicht (0,75 % Agarose) verhindert aufgrund der hohen Konzentration von Agarose das Wachstum der Zellen als Monolayer am Boden. Die nächste Schicht beinhaltet nur 0,4 % Agarose und wird als semisofter Schicht bezeichnet. Die Zellen können hier ihre Kolonien ausbilden. In die oberste Schicht wird die Verbindung in dreifacher Konzentration gegeben. Als Kontrolle wird 5-Fluorouracil (5-FU), ein bekanntes Zytostatikum, verwendet [128].

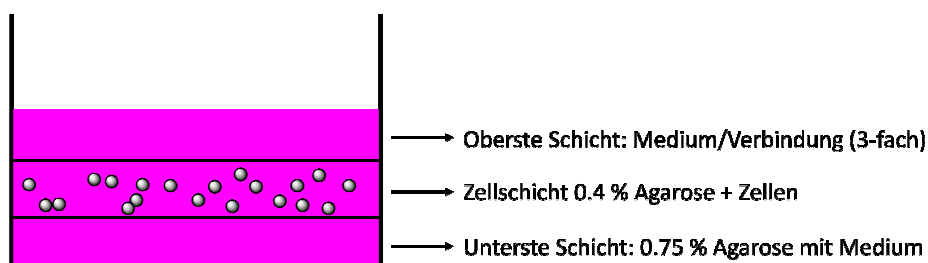


Abb. 93: Schematischer Aufbau eines Softagar-Assays

Tabelle 29: Übersicht der verwendeten Produkte im Kolonieassay

Lösung	Zusammensetzung
Enzymgemisch	Collagenase Typ IV (41 U/ml), DNase I (125 U/ml), Hyaluronidase (100 U/ml), Dispase II (1,0 U/ml) in RPMI 1640-Medium (25 mM HEPES Puffer, mit L-Glutamin)
Zellmedium	IMDM (Iscove`s Modified Dulbeccos`s Medium) mit 20 % (v/v) fetalem Kälberserum, 0,01 % (w/v) Gentamicin)
Unterste Schicht	0,75 % (w/v) Bacto Agar in Zellmedium
Mittlere Schicht (mit Zellen)	4·10 ⁴ Zellen in 0,2 ml Zellmedium mit 0,4 % (w/v) Bacto Agar
Oberste Schicht (mit Testverbindung)	Testsubstanz (3-fache Konzentration) in Zellmedium
2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazoliumchlorid	(1 mg/ml, 100 µl/Well)

Die Verbindungen **50** und **39** werden gegen das Lungen-Adenokarzinom Xenograft LXFL 526 und LXFL 1121 getestet. Solide humane Tumoxenografts wachsen subkutan in fortlaufenden Passagen auf Thymus aplastischen Nacktmäusen (NMRI nu/nu). Die Tumore werden unter sterilen Bedingungen den Mäusen entnommen, mechanisch zerkleinert und anschließend mit dem Enzymgemisch bei 37 °C für 45 min inkubiert. Die Zellen werden anschließend durch Siebe (Maschenweiten: 200 µm und 50 µm) weiter vereinzelt und zweimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Mit Hilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode und einer Neubauer Zählkammer wird die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt.

Der Softagar-Assay wird in 24-Well Platten, variiert nach Hamburger und Salmon, durchgeführt [127]. Die untere Schicht wird 200 µl je Well ausplattiert. Die Zellschicht wird auf diese Schicht gegeben. Die Verbindung **50** und **39** werden in DMSO nach 24 h im Medium dazugegeben (Endkonzentration: 40 µM). Die Platten werden bei 37 °C und 7,5 % CO₂ für bis zu 20 Tage inkubiert. Während dieser Periode beobachtet man ein *in vitro* Koloniewachstum von > 50 µm im Durchmesser. Nach der maximalen Koloniausbildung wird die Anzahl der Kolonien mit Hilfe eines automatisierten Bildanalyse-systems (BIOREADER 5000 PRO-XI, Biosys GmbH) bestimmt. 24 h vor der Evaluierung werden die lebenden Kolonien mit einer sterilen

wässrigen Lösung von 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyl-tetrazoliumchlorid gefärbt [129].

Der Kolonie-Assay gilt als auswertbar, wenn folgende Kriterien erfüllt werden: die Kontrollen müssen ≥ 20 Kolonien mit einem Durchmesser $> 50 \mu\text{m}$ besitzen, der Abweichungskoeffizient der Kontroll-Wellen jeder Platte muss $\leq 50 \%$ aufweisen und die Positivkontrolle 5-Fluorouracil muss eine Reduktion der Koloniezahl $< 30 \%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufweisen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Zhang, Z.-Y.** Chemical and Mechanistic Approaches to the Study of Protein Tyrosine Phosphatases. *Acc. Chem. Res.* 2003, 36, 385-392.
- [2] **Stoker, A.** Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J. Endocrinol.* 2005, 185, 19-33.
- [3] **Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T.** Protein tyrosine phosphatase in the human genome. *Cell.* 2004, 117, 699-711.
- [4] **Tonks, N.K.** Protein tyrosine phosphatase: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, 833-846.
- [5] **Guan, K.L., Dixon, J.E.** Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 17026-17030.
- [6] **Burke, T., Zhang, Z.-Y.** Protein-Tyrosine Phosphatase: Structure, Mechanism, and Inhibitor Discovery. *Biopolymers (Peptide Science)*. 1998, 47, 225-337.
- [7] **Zhang, Z.Y.** Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1998, 33, 1-52.
- [8] **Vintonyak, V.V., Antonchick, A.P., Rauh, D., Waldmann, H.** The therapeutic potential of phosphatase inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13, 272-283.
- [9] **Jia, Z., Barford, D., Flint, A.J., Tonks, N.K.** Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science.* 1995, 268, 1754-1758.
- [10] **Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K., Møller, N.P.** Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21, 7117-7136.
- [11] **Huang, P., Ramphal, J., Wei, J., Liang, C., Jallal, B., McMahon G., Tang, C.** Structural-Based Design and Discovery of Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 1835-1849.
- [12] **Neel, B.G., Gu, H., Pao, L.** The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 2003, 28, 284-293.

- [13] **Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M.J., Shoelson, S.E.** Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*. 1998, 92, 441-450.
- [14] **Barford, D., Neel, B.** Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine Phosphatase SHP-2. *Structure*. 1998, 6, 249-254.
- [15] **Lu, W., Gong, D., Bar-Sagi, D., Cole, P.A.** Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol. Cell*. 2001, 8, 759-769.
- [16] **Tartaglia, M., Gelb, B.D.** Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005, 6, 45-68.
- [17] **Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S., Gelb, B.D.** Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 2001, 29, 465-468.
- [18] **Tartaglia, M., Niemeyer, C.M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., Hahlen, K., Hasle, H., Licht, J.D., and Gelb, B.D.** Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 2003, 34, 148-150.
- [19] **Östmann, A., Hellberg, C., Böhmer, F.D.** Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, 6, 307-320.
- [20] **Miyamoto, D., Miyamoto, M., Takahashi, A., Yomogita, Y., Higashi, H., Kondo, S., Hatakeyama, M.** Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic RAS-like transforming activity from solid tumors. *Oncogene*. 2008, 27, 3508-3515.
- [21] **Kharitonov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J., Ullrich, A.** A family of proteins that inhibit signalling through tyrosins kinase receptors. *Nature*. 1997, 386, 181-186.
- [22] **Agazie, Y.M., Hayman, M.J.** Development of an efficient "substrate-trapping" mutant of Src homology phosphotyrosine phosphatase 2 and identification of the epidermal growth factor receptor, Gab1, and three other proteins as target substrates. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 13952-13958.
- [23] **Rosário, M., Birchmeier, W.** How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 2003, 13, 328-335.

- [24] **Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G.F.** Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003, 4, 915-925.
- [25] **Qu, C.K.** Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, 1592, 297-301.
- [26] **Grossmann, K.S., Rosário, M., Birchmeier, C., Birchmeier, W.** The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer. *Adv. Cancer. Res.* 2010, 106, 53-89.
- [27] **Gorlin, R.J., Anderson, R.C., Moller, J.H.** The Leopard (multiple lentigines) syndrome revisited. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 1971, 7, 110-115.
- [28] **Digilio, M.C., Pacileo, G., Sarkozy, A., Limongelli, G., Conti, E., Cerrato, F., Marino, B., Pizzuti, A., Calabrò, R., Dallapiccola, B.** Familial aggregation of genetically heterogeneous hypertrophic cardiomyopathy: a boy with LEOPARD syndrome due to PTPN11 mutation and his nonsyndromic father lacking PTPN11 mutations. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2004, 70, 95-98.
- [29] **Keren, B., Hadchouel, A., Saba, S., Sznajer, Y., Bonneau, D., Leheup, B., Boute, O., Gaillard, D., Lacombe, D., Layet, V., Marlin, S., Mortier, G., Toutain, A., Beylot, C., Baumann, C., Verloes, A., Cavé, H. et al.** PTPN11 mutations in patients with LEOPARD syndrome: a French multicentric experience. *J. Med. Genet.* 2004, 41, e117.
- [30] **Tartaglia, M., Martinelli, S., Iavarone, I., Cazzaniga, G., Spinelli, M., Giarin, E., Petrangeli, V., Carta, C., Masetti, R., Aricò, M., Locatelli, F., Basso, G., Sorcini, M., Pession, A., Biondi, A.** Somatic PTPN11 mutations in childhood acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2005, 129, 333-339.
- [31] **Tartaglia, M., Martinelli, S., Cazzaniga, G., Cordeddu, V., Iavarone, I., Spinelli, M., Palmi, C., Carta, C., Pession, A., Aricò, M., Masera, G., Basso, G., Sorcini, M., Gelb, B.D., Biondi, A.** Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood.* 2004, 104, 307-313.
- [32] **Bentires-Alj, M., Gil, S.G., Chan, R., Wang, Z.C., Wang, Y., Imanaka, N., Harris, L.N.** A role for the scaffolding adapter GAB2 in breast cancer. *Nat. Med.* 2006, 12, 114-121.
- [33] **Xu, R., Yu, Y., Zheng, S., Zhao, X., Dong, Q., He, Z., Liang, Y., Lu, Q., Fang, Y., Gan, X., Xu, X., Zhang, S., Dong, Q., Zhang, X., Feng, G. S.** Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia. *Blood.* 2005, 106, 3142-3149.

- [34] **Scherr, M., Chaturvedi, A., Battmer, K., Dallmann, I., Schultheis, B., Ganser, A., and Eder, M.** Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML). *Blood*. 2005, 107, 3279-87.
- [35] **Feng, G.S.** Shp2 as a therapeutic target for leptin resistance and obesity. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2006, 10, 135-142.
- [36] **Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z.J., Zhou, G.W.** Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem*. 2003, 278, 6516-6520.
- [37] **Naing, A., Reuben, J.M., Verschraegen, C.F., Camacho, L.H., Stephen, S., Hong, D.S., Wheler, J.J., Fu, S., Martinez, M., Akinsanmi, L., Kurzrock, R.** Phase I dose-escalation study of sodium stibogluconate (SSG), a protein tyrosine phosphatase inhibitor, combined with interferon-alfa for patients with solid tumors. *J. Clin. Oncol*. 2008, 26, 3001 (Abstr.).
- [38] **Tonks, N.K., Diltz, C.D., Fischer, E.H.** Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem*. 1988, 263, 6731-6737.
- [39] **Barford, D., Flint, A.J., Tonks, N.K.** Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*. 1994, 263, 1397-1404.
- [40] **Asante-Appiah, E., Kennedy, B.P.** Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2003, 284, E663-670.
- [41] **Zabolotny, J.M., Bence-Hanulec, K.K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Elmquist, J.K., Tartaglia, L.A., Kahn, B.B., Neel, B.G.** PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell*. 2002, 2, 489-495.
- [42] **Bence, K.K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S., Neel, B.G., Kahn, B.B.** Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med*. 2006, 12, 917-924.
- [43] **Dubé, N., Tremblay M.,L.** Beyond the Metabolic function of PTP1B. *Cell Cycle*. 2004, 3, 550-553.
- [44] **Julien, S.G., Dubé, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y., Kennedy, B.P., Muller, W.J., Tremblay, M.L.** Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat. Genet*. 2007, 39, 338-346.
- [45] **Han, Y., Belley, M., Bayly, C.I., Colucci, J., Dufresne, C., Giroux, A., Lau, C.K., Leblanc, Y., McKay, D., Therien, M., Wilson, M.C., Skorey, K., Chan, C.C.,**

- Scapin, G., Kennedy, B.P.** Discovery of [(3-bromo-7-cyano-2-naphthyl)(difluoro)methyl]phosphonic acid, a potent and orally active small molecule PTP1B inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 3200-3205.
- [46] **Madhurantakam, C., Rajakumara, E., Mazumdar, P.A., Saha, B., Mitra, D., Wiker, H.G., Sankaranarayanan, R., Das, A.K.** Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 2175-2181.
- [47] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>.
- [48] **Bach, H., Papavinasundaram, K.G., Wong, D., Hmama, Z., Av-Gay, Y.** *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe.* 2008, 3, 316-322.
- [49] **Zhang, Z.-Y.** Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5, 416-423.
- [50] **Combs, A., Yue, E., Bower, M., Ala, P., Wayland, B., Douty, B., Takvorian, A., Polam, P., Wasserman, Z., Zhu, W., Crawley, M., Pruitt, J., Sparks, R., Glass, B., Modi, D., McLaughlin, E., Bostrom, L., Li, M., Galya, L., Blom, K., Hillman, M., Gonneville, L., Reid, B., Wei, M., Becker-Pasha, M., Klabe, R., Huber, R., Li, Y., Hollis, G., Burn, T., Wynn, R., Liu, P., Metcalf, B.** Structure-Based Design and Discovery of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors Incorporating Novel Isothiazolidinone Heterocyclic Phosphotyrosine Mimetics. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 6544-6548.
- [51] **Nören-Müller, A., Reis-Corrêa, I. Jr., Prinz, H., Rosenbaum, C., Saxena, K., Schwalbe, H.J., Vestweber, D., Cagna, G., Schunk, S., Schwarz, O., Schiewe, H., Waldmann, H.** Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, 103, 10606-10611.
- [52] **Chen L., Sung S.S., Yip M.L., Lawrence H.R., Ren Y., Guida W.C., Sebt S.M., Lawrence N.J., Wu J.** Discovery of a Novel Shp2 Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor. *Mol. Pharmacol.* 2006, 70, 562-570.
- [53] **Hellmuth, K., Grosskopf, S., Lum, C.T., Wurtele, M., Roder, N., von Kries, J.P., Rosario, M., Rademann, J., and Birchmeier, W.** Specific inhibitors of the protein tyrosine phosphatase Shp2 identified by high-throughput docking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 7275-7280.
- [54] **Lawrence, H.R., Pireddu, R., Chen, L., Luo, Y., Sung, S.S., Szymanski, A.M., Yip, M.L., Guida, W.C., Sebt, S.M., Wu, J., Lawrence, N.J.** Inhibitors of Src

- Homology-2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2 (Shp2) Based on Oxindole Scaffolds. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 4948-4956.
- [55] **Geronikaki, A., Eleftheriou, P., Vicini, P., Alam, I., Dixit, A., Saxena, A.K.** 2-Thiazolylimino/heteroarylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as new agents with SHP-2 inhibitory action. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 5221-5228.
- [56] **Yu, W.M., Guvench, O., Mackerell, A.D., Qu, C.K.** Identification of small molecular weight inhibitors of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) via in silico database screening combined with experimental assay. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 7396-7404.
- [57] **Wu, D., Pang, Y., Ke, Y., Yu, J., He, Z., Tautz, L., Mustelin, T., Ding, S., Huang, Z., Feng, G.S.** A conserved Mechanism for Control of Human and Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation by Shp2 Tyrosine Phosphatase. *PLoS One.* 2009, 4, e4914-e4925.
- [58] **Zhang, X., He, Y., Liu, S., Yu, Z., Jiang, Z.-X., Yang, Z., Dong, Y., Nabinger, S.C., Wu, L., Gunawan, A.M., Wang, L., Chan, R.J., Zhang, Z.-Y.** Salicylic Acid Based Small Molecule Inhibitor for the Oncogenic Src Homology-2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2 (SHP2). *J. Med. Chem.* 2010, 53, 2482-2493.
- [59] **Miski, M., Shen, X., Cooper, R., Gillum, A.M., Fisher, D.K., Miller, R.W., Higgings, T.J.** Aporphine alkaloids, CD45 protein tyrosine phosphatase inhibitors, from *Rollinia ulei*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995, 5, 1519-1522.
- [60] **Bialy, L., Waldmann, H.** Inhibitoren der Proteintyrosinphosphatasen: Kandidaten für zukünftige Wirkstoffe? *Angew. Chem.* 2005, 117, 3880-3906.
- [61] **Burke, T.R. Jr., Kole, H.K., Roller, P.P.** Potent inhibition of insulin receptor dephosphorylation by a hexamer peptide containing the phosphotyrosyl mimetic F2Pmp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 204, 129-134.
- [62] **Blaskovich, M.A.** Drug discovery and protein tyrosine phosphatases. *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 2095-2176.
- [63] **Xie, J., Comeau, A.B., Seto, C.T.** Squaric Acids: A New Motif for Designing Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Org. Lett.* 2004, 6, 83-86.
- [64] **Puius, Y.A., Zhao, Y., Sullivan, M., Lawrence, D.S., Almo, S.C., Zhang, Z.Y.** Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 13420-13425.

- [65] **Boutselis, I.G., Yu, X., Zhang, Z.Y., Borch, R.F.** Synthesis and cell-based activity of a potent and selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor prodrug. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 856-864.
- [66] **Mustelin, T., Vang, T., Bottini, N.** Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 2005, 5, 43-57.
- [67] **Druker, B., Lydon, N.** Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* 2000, 105, 3-7.
- [68] **Druker, B.** Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell.* 2002, 1, 31-36.
- [69] **Schmidt, M.F., Rademann, J.** Dynamic template-assisted strategies in fragment-based drug discovery. *Trends Biotechnol.* 2009, 27, 512-521.
- [70] **Schmidt, M., Isidro-Llobet, A., El-Dahshan, A., Lisurek, M., Tan, J., Hilgenfeld, R., Rademann, J.** Sensitized detection of inhibitory fragments and iterative development of non-peptidic protease inhibitors by Dynamic Ligation Screening. *Angew Chem Int Ed.* 2008, 47, 3275-3278.
- [71] **Sun, J.P., Fedorov, A.A., Lee, S.Y., Guo, X.L., Shen, K., Lawrence, D.S., Almo, S.C., Zhang, Z.Y.** Crystal structure of PTP1B complexed with a potent and selective bidentate inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 12406-12414.
- [72] **Grosskopf, Stefanie.** *Synthese und Evaluierung von Inhibitoren der Phosphatase SHP-2.* Berlin 2006.
- [73] **McCain DF, Wu, L., Nickel, P., Kassack, M.U., Kreimeyer, A., Gagliardi, A., Collins, D.C., Zhang, Z.Y.** Suramin derivatives as inhibitors and activators of protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 14713-14725.
- [74] **Stein, C.A.** Suramin: a novel antineoplastic agent with multiple potential mechanisms of action. *Cancer Res.* 1993, 53, 2239-2248.
- [75] **Barr, A. J., Ugochukwu, E., Lee, W. H., King, O. N. F., Filippakopoulos, P., Alfano, I., Savitsky, P., Burgess-Brown, N. A., Müller, S., and Knapp, S.** Large-Scale Structural Analysis of the Classical Human ProteinTyrosine Phosphatome. *Cell.* 2009, 136, 352-363.
- [76] **Weik, S., Luksch, T., Evers, A., Böttcher, J., Sotriffer, C.A., Hasilik, A., Löffler, H.G., Klebe, G., Rademann, J.** The potential of P1 site alterations in peptidomimetic protease inhibitors as suggested by virtual screening and explored by the use of C-C-coupling reagents. *ChemMedChem.* 2006, 1, 445-457.

- [77] **Wasserman, H. H., Baldino, C. M., Coats, S. J.** Selective Oxidation of Phosphorus Ylides by Dimethyldioxirane. Application to the Formation of Vicinal Tricarbonyls. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 8231-8235.
- [78] **Adam, W., Chan, Y.-Y., Cremer, D., Gauss, J., Scheutzow, D., Schindler, M.** Spectral and Chemical Properties of Dimethyldioxirane as Determined by Experiment and ab Initio Calculations. *J. Org. Chem.* 1986, 52, 2800-2803.
- [79] **Adam, W., Hadjiarapoglou, L., Smerz, A.** Dioxirane Epoxidation of α -b-Unsaturated Ketones. *Chem. Ber.* 1990, 124, 227-232.
- [80] **Murray, R. W., Jeyaraman, R.** Dioxiranes: Synthesis and Reactions of Methyl dioxiranes. *J. Org. Chem.* 1985, 50, 2847-2853.
- [81] **Wasserman, H. H., Amici, R., Frechette, R., Van Duzer, J. H.** The Chemistry of Vicinal Tricarbonyl Compounds. Applications in the Synthesis of Isoquinoline Alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 869-872.
- [82] **Wasserman, H. H., Fukuyama, J., Murugesan, N., Van Duzer, J., Lombardo, L., Rotello, V., McCarthy, K.** The Chemistry of Vicinal Tricarbonyls. A Stable Vinyl Tricarbonyl Hydrate as a Di- and Trielectrophile. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 371-372.
- [83] **Wasserman, H. H., Rotello, V. M., Williams, D. R., Benbow, J. W.** Synthesis of the "Tricarbonyl" Region of FK-506 through an Amidophosphorane. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 2785-2786.
- [84] **Wasserman, H. H., Vu, C. B.** Formation of Vicinal Tricarbonyl Compounds by Selective Oxidation of Ylides Using Potassium Peroxymonosulfate. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 5205-5208.
- [85] **Webb, K.S., Ruskay, S.J.** Oxidation of aldehydes with Oxone® in aqueous acetone. *Tetrahedron.* 1998, 54, 401-410.
- [86] **Svenstrup, N., Simonsen, K.B., Thorup, N., Brodersen, J., Dehaen, W. Becher, J.** A Pyrazole to Furan Rearrangement. Thermolysis of 5-Azido-4-formylpyrazoles. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 2614-2620.
- [87] **Norman, M.H., Rigdon, G.C., Hall, W.R., Navas, F. III.** Structure-activity relationships of a series of substituted benzamides: potent D2/5-HT2 antagonists and 5-HT1a agonists as neuroleptic agents. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1172-1188.
- [88] **Baykov, A.A., Evtushenko, O.A., Avaeva, S.M.** A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 1988, 171, 266-270.

- [89] **Welte, S., Baringhaus, K.H., Schmider, W., Müller, G., Petry, S.** 6,8-Difluoro-4-methylumbiliferyl phosphate: a fluorogenic. *Anal. Biochem.* 2005, 338, 32-38.
- [90] **Herr, R.J.** 5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods. *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 3379-3393.
- [91] **Dourlat, J., Valentin, B., Liu, W.Q., Garbay, C.** New syntheses of tetrazolymethylphenylalanine and O-malonyltyrosine as pTyr mimetics for the design of STAT3 dimerization inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 3943-396.
- [92] **Stoker, M.** Effect of scatter factor on motility of epithelial cells and fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 1989, 139, 565-569.
- [93] **Birchmeier, C., Birchmeier, W., Brand-Saberi, B.** Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta. Anat. (Basel).* 1996, 156, 217-226.
- [94] **Birchmeier, W., Behrens, J., Weidner, K.M., Hülsken, J., Birchmeier, C.** Epithelial differentiation and the control of metastasis in carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, 213, 117-135.
- [95] **Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A.** Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009, 139, 871-890.
- [96] **Roth, T., Burger, A.M., Dengler, W., Willmann, H., Fiebig, H.H.** Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. [Buchverf.] H.H., Burger, A.M. Fiebig. *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development.* Basel : Karger, 1999, Bd. 54, 145-156.
- [97] **Sachs, L.** *Angewandte Statistik.* Heidelberg : Springer-Verlag GmbH; Auflage: 8., 1998. ISBN 3-540-60494-4.
- [98] **Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M.** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics.* 2002, 1, 376-386.
- [99] **Balani, S.K., Miwa, G.T., Gan, L.S., Wu, J.T., Lee, F.W.** Strategy of utilizing in vitro and in vivo ADME tools for lead optimization and drug candidate selection. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005, 5, 1033-1038.
- [100] **Stewart, B.H., Chan, O.H., Lu, R.H., Reyner, E.L., Schmid, H.L., Hamilton, H.W., Steinbaugh, B.A., Taylor, M.D.** Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharm. Res.* 1995, 12, 693-699.

- [101] **Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K.** Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 1007-1010.
- [102] **Guengerich, F.P.** Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2008, 21, 70-83.
- [103] **Burke, T.R., Lee, K.** Phosphotyrosyl mimetics in the development of signal transduction inhibitors. *Acc. Chem. Res.* 2003, 36, 426-433.
- [104] **Combs, A.P.** Structure-based drug design of new leads for phosphatase research. *IDrugs.* 2007, 10, 112-115.
- [105] **Black, E., Breed, J., Breeze, A.L., Embrey, K., Garcia, R., Gero, T.W., Godfrey, L., Kenny, P.W., Morley, A.D., Minshull, C.A., Pannifer, A.D., Read, J., Rees, A., Russell, D.J., Toader, D., Tucker, J.** Structure-based design of protein tyrosine phosphatase-1B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 2503-2507.
- [106] **Sparks, R.B., Polam, P., Zhu, W., Crawley, M.L., Takvorian, A., McLaughlin, E., Wei, M., Ala, P.J., Gonneville, L., Taylor, N., Li, Y., Wynn, R., Burn, T.C., Liu, P.C., Combs, A.P.** Benzothiazole benzimidazole (S)-isothiazolidinone derivatives as protein tyrosine phosphatase-1B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 736-740.
- [107] **Douty B, Wayland B, Ala PJ, Bower MJ, Pruitt J, Bostrom L, Wei, M., Klabe, R., Gonneville, L., Wynn, R., Burn, T.C., Liu, P.C., Combs, A.P., Yue, E.W.** Isothiazolidinone inhibitors of PTP1B containing imidazoles and imidazolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 66-71.
- [108] **McKillop, A., Kemp, D.** Further functional group oxidations using sodium perborate. *Tetrahedron.* 1989, 45, 3299-3306.
- [109] **Winum, J.Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.T.** Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. *Med. Res. Rev.* 2006, 26, 767-792.
- [110] **Nuckolls, C., Hof, F., Martín, T., Rebek, J.** Chiral Microenvironments in Self-Assembled Capsules. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 10281-10285.
- [111] **Flaherty, P.T., Greenwood, T.D., Manheim, A.L., Wolfe, J.F.** Synthesis and Evaluation of N-(Phenylacetyl)trifluoromethanesulfonamides as Anticonvulsant Agents. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1509-1513.
- [112] **Liu, D.G., Gao, Y., Voigt, J.H., Lee, K., Nicklaus, M.C., Wu, L., Zhang, Z.Y., Burke, T.R. Jr.** Acylsulfonamide-containing PTP1B inhibitors designed to mimic an enzyme-bound water of hydration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3005-3007.

- [113] **de Groot, F.M., Loos, W.J., Koekkoek, R., van Berkom, L.W., Busscher, G.F., Seelen, A.E., Albrecht, C., de Bruijn, P., Scheeren, H.W.** Elongated Multiple Electronic Cascade and Cyclization Spacer Systems in Activatable Anticancer Prodrugs for Enhanced Drug Release. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 8815-8830.
- [114] **Biot, C., Pradines, B., Sergeant, M.H., Gut, J., Rosenthal, P.J., Chibale, K.** Design, synthesis, and antimalarial activity of structural chimeras of thiosemicarbazone and ferroquine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 6434-6438.
- [115] **Yamamoto, H., Miura, M., Nojima, M., Kusabayashi, S.** Oxidation of alkenes and sulphides with a series of hydroperoxides having electron-withdrawing substituents at the α -position. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 1986, 173 - 182.
- [116] **Tanaka, A., Terasawa, T., Hagihara, H., Sakuma, Y., Ishibe, N., Sawada, M., Takasugi, H., Tanaka, H.** Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT). Part 1: identification and structure-activity relationships of a novel series of substituted N-alkyl-N-biphenylmethyl-N'-arylureas. *Bioorg. Med. Chem.* 1998, 6, 15-30.
- [117] **Vogel, H.J.** Phosphorus-31 NMR of phosphoproteins. *Methods Enzymol.* 1989, 177, 263-282.
- [118] **Domchek, S.M., Auger, K.R., Chatterjee, S., Burke, T.R. Jr., Shoelson, S.E.** Inhibition of SH2 domain/phosphoprotein association by a nonhydrolyzable phosphonopeptide. *Biochemistry.* 1992, 31, 9865-9879.
- [119] **Artursson, P., Karlsson, J.** Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 175, 880-885.
- [120] **Wälchli, S., Espanel, X., Harrenga, A., Rossi, M., Cesareni, G., Hooft van Huijsduijnen, R.** Probing protein-tyrosine Phosphatase Substrate Specificity Using a Phosphotyrosine-containing Phage Library. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 311-318.
- [121] **Chen, L., Wu, L., Otake, A., Smyth, M.S., Roller, P.P., Burke, T.R. Jr, den Hertog, J., Zhang, Z.Y.** Why is phosphonodifluoromethyl phenylalanine a more potent inhibitory moiety than phosphonomethyl phenylalanine toward protein-tyrosine phosphatases? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 216, 976-984.
- [122] **Leung, C., Grzyb, J., Lee, J., Meyer, N., Hum, G., Jia, C., Liu, S., Taylor, S.D.** The difluoromethylenesulfonic acid group as a monoanionic phosphate surrogate for obtaining PTP1B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 2309-2323.

- [123] **Hussain, M., Ahmed, V., Hill, B., Ahmed, Z., Taylor, S.D.** A re-examination of the difluoromethylenesulfonic acid group as a phosphotyrosine mimic for PTP1B inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 6764-6777.
- [124] **Böhm, Kerstin.** *Structural insight into dephosphorylation: Klebsiella sp. ASR1 phytase PhyK and human protein tyrosine phosphatase SHP2.* Dissertation, Berlin 2009.
- [125] **Pollack, A., Ciancio, G.** Zellzyklus-Phasen-spezifische Analyse der Lebensfähigkeit von Zellen. *Methods Cell Biol.* 1990, 33, 19-24.
- [126] **Dengler, W.A., Schulte, J., Berger, D.P., Mertelsmann, R., Fiebig, H.H.** Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs.* 1995, 6, 522-532.
- [127] **Hamburger, A.W., Salmon, S.E.** Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 1977, 197, 461-463.
- [128] **Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevan, E., Scheiner, J.** Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.* 1957, 179, 663-666.
- [129] **Alley MC, Uhl CB, Lieber MM.** Improved detection of drug cytotoxicity in the soft agar colony formation assay through use of a metabolizable tetrazolium salt. *Life Sci.* 1982, 31, 3071-3078.