

Präklinische Entwicklung und Charakterisierung selektiver Januskinase 3 Inhibitoren

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat.)

Vorgelegt von

Julian Laux

Aus Balingen

Tübingen

2023

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

Tag der mündlichen Qualifikation: 26.05.2023

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan A. Laufer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Lämmerhofer

Vorwort

Danksagung

Ich bedanke mich bei...

Prof. Dr. Stefan Laufer für die Möglichkeit zur Promotion, die Vergabe eines so interessanten Themas und die Erstellung des Erstgutachtens. Ebenfalls bedanke ich mich für die konstruktiven Meetings mit exzellentem Kaffee und für viele unterhaltsame und lehrreiche Vorlesungen, die das Interesse für die Forschung in mir geweckt haben.

Prof. Dr. Michael Lämmerhofer für die Chance, während des Studiums einen Blick in die Welt der Analytik werfen zu dürfen und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Pierre Koch für die S9-Metabolismus Experimente in seinem AK, die Zusammenarbeit in diversen Projekten und für viele angenehme Mails und Besuche.

Jun.-Prof. Dr. Matthias Gehringer für sein ermutigendes Interesse am Verlauf des Projekts, die langen Unterhaltungen an der Uni und den Austausch über gute Musik.

Prof. Dr. Stefan Knapp und **Lena Kilian** für die nette Zusammenarbeit und die Durchführung der nanoBRET-Assays.

Dr. Dieter Schollmeyer für die Hilfe bei der Strukturaufklärung zweier wichtiger Intermediate per Röntgenkristallographie.

Dr. Michael Forster für die exzellente Arbeit, auf der das mir vergebene Thema aufbaut, für die vielen freundlichen Korrespondenzen wenn es mal Fragen gab und für die hilfreichen Anhaltspunkte bei den Projektmeetings an der Uni.

Dr. Raimund Nieß für die interessanten Vorlesungen während des Studiums, die unkomplizierte Bestellung von Chemikalien im Master und für gelegentlichen Tratsch und Neuigkeiten „von dr Alb“.

Dr. Niklas Tormählen für die freundliche Betreuung des Wahlpflichtfachs und die Ermutigung zum Praxissemester in der organischen Chemie.

Mark Kudolo für das durchgeführte Mikrosomen-Experiment und den netten Austausch wann immer wir uns getroffen haben.

Katharina Bauer für die Ausführung der JAK3-Assays, die unkomplizierte Kommunikation und ihre herzliche Art.

Gerd Helms für die Aufnahme der NMR Spektren und viele nette Gespräche, wenn ich mal wieder auf „Uni-Besuch“ war.

Dr. Michael Burnet für die Vergabe der Stelle, die stete Erreichbarkeit rund um die Uhr wenn es mal wieder „brannte“, für viele sinnvolle Vorschläge und Denkanstöße, die unermüdliche Unterstützung des JAK-Projekts und zuletzt für die immer interessanten Unterhaltungen übers Kochen, Messer und andere Freuden der Kulinarik.

Renate Burnet für ihr offenes Ohr bei organisatorischen, vertraglichen und sonstigen bürokratischen Fragen.

Dr. Jan-Hinrich Guse für die Betreuung auf chemischer Seite, die Instandhaltung schwächelnder Geräte und hilfreiche Tipps im Laboralltag.

Dr. Martin Reißer für viele interessante Anekdoten und die unkomplizierte und entspannte Zusammenarbeit.

Meinen engen Kollegen **Simon Straß, Tina Fischer, Nadja Späth, Sophia Geiger, Kim Gohlke, Katharina Schatz, Natascha Cloos** und **Anna Schwamborn** für die Zusammenarbeit in zahlreichen Projekten, die vielen Feiern und lustigen gemeinsamen Abende und für die aus unserer gemeinsamen Zeit hervorgegangenen Freundschaften.

Mariella Martorelli für die Partnerschaft in den EAE- und Histologieprojekten und vielen Gelegenheiten zum Lachen, trotz „besonderer“ Kommunikationsprobleme.

Manuel Keppler für die Lösung aller erdenklicher IT-Probleme, durchgeführte *in vitro* Experimente und für seine besondere Art von Humor.

Matthias Dengler für die Zusammenarbeit beim EAE-Projekt, die Aufbereitung aller Arten von Blutprodukten und jede Menge unterhaltsamer Geschichten.

Meiner Lieblings-Minijobberin **Aylin Riethmüller** für die langjährige Freundschaft, die Unterstützung beim Nachkochen und Upscaling der Schlüsselintermediate und für ihre Zuverlässigkeit, besonders dann wenn eine Feier oder andere „*extracurricular R&R Meetings*“ anstanden.

Dr. Florian Maier für die Hilfestellung bei allen Fragen rund ums Publizieren, Kongresse und sonstiges zum Doktorandenleben sowie zum Thema ZNS und Bildgebung. Nicht zu vergessen die zahlreichen unterhaltsamen Diskussionen über kulinarische Meisterwerke, Oldschool Heavy Metal und Pen and Paper Erlebnisse.

Dr. Agne Klein für ihre angenehme Art, ihren Humor und die Anfertigung wunderschöner Graphen für diverse Publikationen und andere Projekte.

Dr. Sabrina Hoffmann für die netten Unterhaltungen beim Kaffee zu allen möglichen Themen.

Nina Grigouridi für die Instandhaltung und Pflege des wichtigsten Geräts der ganzen Firma und den Austausch von Koch-Inspirationen.

Yvonne Sauermann für den steten Nachschub an Chemikalien und Verbrauchsmaterialien und ihr scharfes Auge beim Bestellen.

Mareike Flassak für die selbst früh morgens stets gute Laune und die Versorgung des ganzen Teams mit Backwaren und Getränken.

Laura Riexinger, Dr. Jamil Guezguez für die Messung der Analytik-Proben.

Dr. Ulrike Hahn und **Dr. Lara Wohlbold** für die offenen Ohren bei Fragen zu allerlei praktischen Problemen im *in vivo* bzw. *in vitro* Bereich.

Dem Synovo Tierstall-Team: **Dr. Luciano Oliveira, Dr. Thaisa Luca-Sandri, Thilo Weinstein, Santiago Cruzes, Johanna Geiger, Katharina Sauter, Klaudia Eisel**

und **Osman Can** für zahlreiche durchgeführte in vivo Studien und die zugehörigen lustigen Unterhaltungen sowohl im Tierstall, als auch vor der Kaffeemaschine.

Allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Synovo GmbH: **Dr. Mary Eggers, Dr. Christiane Bäuerlein, Dr. Marie Dorier, Beatrix Rittinger, Timo Göhler, Eva-Maria Holocher, Sabine Wellerdiek, Thomas Wolf, Elisabeth Frech, Denis Canjuga, Christina Pokoj** und allen Praktikanten und Minijobbern für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsame Zeit.

Meinen Eltern für die stete Unterstützung in allen Lebenslagen, die vielen schönen Erinnerungen und dass sie mich zu dem gemacht haben, der ich bin.

Dr. Clara Gotthard für viele glückliche Jahre zusammen und für die, die noch folgen werden.

Zusammenfassung der Dissertation

Proteinkinasen stellen ein hochrelevantes Target zur Behandlung vieler Erkrankungen, darunter Autoimmunerkrankungen und Tumore, dar. Die Januskinasen (JAKs) gehören zu den zytosolischen Tyrosinkinase und sind von großer Bedeutung für die Bildung von Blutzellen und eine geregelte Funktion des Immunsystems. Die JAK3 zeichnet sich gegenüber den anderen drei JAKs durch diverse strukturelle Alleinstellungsmerkmale aus, vor allem durch die auf Immunzellen beschränkte Expression. Sie spielt insbesondere für die Entwicklung und Funktion der Lymphozyten eine tragende Rolle.

Bisher wurden überwiegend JAK-Inhibitoren zugelassen, die mehrere JAKs zugleich hemmen. Es gibt noch keine zugelassenen selektiven JAK3-Hemmer. Von diesen erhofft man sich – durch die erwähnte Lokalisation in Immunzellen – ein günstigeres Sicherheitsprofil, da die unselektive Hemmung der JAKs in anderen Zellen bzw. Geweben zu unerwünschten und mitunter schwerwiegenden Nebenwirkungen führt. Es ist noch unklar, ob die alleinige Inhibition der JAK3 für ausreichende therapeutische Wirksamkeit genügt, da diese als Dimer mit der JAK1 an die Zytokinrezeptoren assoziiert. Die nicht inhibierte JAK1 könnte unter Umständen noch immer gewisse Aktivität zeigen.

Im Rahmen der Arbeit von Dr. Michael Forster wurde durch Ausnutzen der JAK3-spezifischen Strukturmerkmale ein hochselektiver und –potenter niedermolekularer JAK3-Hemmer (**FM-381**) dargestellt. Die Substanz adressiert eine zuvor unbekannte induzierbare Tasche und erzielt dadurch, in Kombination mit einem C909 adressierenden Michael-Akzeptor, hohe Selektivität über das Kinom hinweg.

FM-381 war für den Gebrauch als „*in vitro* JAK3 probe“ bereits optimiert worden, über die *in vivo* Wirksamkeit und die Pharmakokinetik (PK) des Stoffes war aber zu Beginn der Arbeit noch nichts bekannt. Zunächst wurden diese Eigenschaften in Mäusen untersucht und parallel dazu strukturell verwandte Derivate synthetisiert und getestet. Ziel war es, unter Erhalt der Grundstruktur und des elektrophilen Cyanacrylamid-Warheads die Selektivität und Aktivität beizubehalten, während Modifikationen der Seitenketten die – noch unzulänglichen - PK-Eigenschaften des Stoffes optimieren sollten. Zudem wurden die Testsubstanzen weiter charakterisiert, z. B. deren Aufnahme in Immunzellen und Verteilung innerhalb von Organen (u. a. über Fluoreszenzmikroskopie), metabolische Stabilität und die Effekte der Stoffe auf Lipopolysaccharide-basierte Entzündungsreaktionen. Zuletzt wurden die vielversprechendsten Substanzen in *in vivo* Krankheitsmodellen getestet.

Als Ergebnis der Arbeit gelang es für verschiedene Krankheitsmodelle optimierte Derivate der Leitsubstanz **FM-381** mit hoher anti-inflammatorischer Potenz zu identifizieren:

- Über die Einführung einer N-methylpiperidin-Seitenkette konnte ein ZNS-gängiger Wirkstoffkandidat (**18**) dargestellt werden. Dieser wurde bereits in einem murinen Krankheitsmodell zur Multiplen Sklerose getestet und zeigte gute Wirksamkeit.
- Die Kopplung des elektrophilen JAK-Warheads an Makrolid-basierte Carrier konnte wiederum genutzt werden, um die *in vivo* Stabilität der Stoffklasse, die Anreicherung in Organen und Immunzellen sowie die allgemeine anti-inflammatorische Wirksamkeit zu steigern. Die Stoffe waren unter anderem in LPS-basierten *in vivo* Modellen akuter Entzündung wirksam und steigerten das Verhältnis an freigesetztem IL-10 zu TNF α im Plasma.
- Durch Verwendung eines N-methyl,N-ethyl-acetamid-verlinkten Makrolid-Konjugats wurde eine besonders hohe Affinität für Darmgewebe erzielt. Ein Vertreter dieser Klasse (**38**) zeigte sich als wirksam in Studien der murinen Colitis und Arthritis.

Summary of the thesis

Protein kinases are a highly relevant pharmacological target for the treatment of several kinds of disease, including autoimmunity and malignancies. The Janus kinase (JAK) family contains four isoenzymes, all of which are cytosolic tyrosine kinases, and is of great importance for hematopoiesis and the regulation of the immune system. Among the JAKs, JAK3 stands out not only due to several unique structural features, but also due to being restricted to immune cells. Therefore, it is especially relevant for the development and function of lymphocytes.

As of now, most approved JAK inhibitors target more than one JAK isoenzyme, and none of them selectively inhibit JAK3. The latter compound class is sought after in the hopes of attaining an improved safety profile, as the unselective inhibition of JAKs in other cell types or tissues leads to adverse effects, some of which are severe and potentially life-threatening. However, it has not been clarified yet whether the inhibition of JAK3 alone leads to sufficient efficacy; as JAK3 forms dimers with JAK1 when binding to a cytokine receptor, it is possible that there will be residual signaling activity by the uninhibited JAK1. This question has, to date, been largely ignored by the scientific community and warrants further investigation.

Within the scope of Dr. Michael Forster's thesis, a highly selective and potent small-molecule JAK3 inhibitor (**FM-381**) was obtained by exploiting unique structural elements of the isoenzyme. Its covalent-reversible binding mode to the kinase was also demonstrated. The compound addresses an – as of then – unknown inducible pocket. This, combined with an electrophilic Michael acceptor interacting with C909, leads to impressive selectivity within the human kinome.

FM-381 was already optimized for use as an „*in vitro* JAK3 probe“ to a great degree. However, its *in vivo* efficacy and pharmacokinetics were yet unknown at the start of this thesis. The first step was thus to investigate these properties in mice; simultaneously, derivatives of the structure were synthesized and then characterized in the same manner. The aim was to improve pharmacokinetics – which were found to be unsatisfactory in **FM-381** – by modifying noncritical side chains. Concurrently, the core scaffold and the electrophilic cyanoacrylamide warhead were kept in order to retain potency and selectivity for JAK3. The compounds were then further characterized, e.g. their uptake and accumulation in immune cells and distribution within organs (by fluorescence microscopy), metabolic stability and their efficacy at attenuating LPS-induced inflammatory reactions. Lastly, the most promising substances were then tested in *in vivo* models of inflammatory disease.

Within this work, we succeeded at identifying derivatives of the lead compound **FM-381** which were optimized for use in various disease models:

- For example, by introduction of an N-methyl piperidine residue, a candidate with effective CNS penetration was obtained (**18**). The compound was already tested in a murine model of multiple sclerosis, demonstrating good efficacy.
- On the other hand, by coupling the electrophilic JAK warhead to a macrolide based carrier scaffold, we were able to greatly increase *in vivo* stability, accumulation in organ tissues and within immune cells and general anti-inflammatory potency. They were effective in LPS based *in vivo* models of acute inflammation and caused a favorable shift in the cytokine response, increasing the ratio of IL-10 to TNF α in plasma.
- An especially high affinity for gut tissue was achieved by employing an N-methyl,N-ethyl acetamide linked macrolide conjugate. A representative of that class (**38**) demonstrated efficacy in murine models of colitis and arthritis.

Publikationsliste

Originalarbeiten in Fachzeitschriften

Laux, J.; Forster, M.; Riexinger, L.; Schwamborn, A.; Guezguez, J.; Pokoj, C.; Kudolo, M.; Berger, L.; Knapp, S.; Schollmeyer, D.; Guse, J.; Burnet, M.; Laufer, S.: Pharmacokinetic optimization of small molecule Janus Kinase 3 inhibitors to target immune cells. *ACS Pharmacology & Translational Science* **2022** 5 (8), 573-602.

Laux, J.; Martorelli, M.; Späth, N.; Maier, F.; Burnet, M.; Laufer, S.: Selective inhibitors of Janus kinase 3 modify responses to LPS by increasing the IL-10 to TNF α ratio. (*ACS Pharmacology & Translational Science* **2023 Article ASAP**)

Laux, J.; Martorelli, M.; Strass, S.; Maier, F.; Burnet, M.; Laufer, S.: Inherent fluorescence demonstrates immunotropic properties for novel Janus kinase 3 inhibitors (*Zur Publikation eingereicht*)

Martorelli, M.; **Laux, J.;** Dengler, M.; Maier, F.; Keppler, M.; Fischer, T.; Burnet, M.; Laufer, S.: Influence of diet and MOG₃₅₋₅₅ peptide preparation on severity, survival, incidence rate and body weight in experimental autoimmune encephalomyelitis (*Manuskript in Vorbereitung*)

Poster

Laux, J.; Strass, S.; Späth, N.; Fischer, T.; Schwamborn, A.; Guse, J.; Burnet, M.; Laufer, S. A.: Modification of Azithromycin: Synthesis of SCFA donors, covalently linked Macrolide Conjugates and non-antibiotic Immunomodulators. *Frontiers in Medicinal Chemistry 2022 (online), Poster P009*

Martorelli, M.; **Laux, J.;** Dengler, M.; Fischer, T.; Maier, F.; Burnet, M.: Influence of diet and MOG₃₅₋₅₅-peptide preparation on severity, survival, incidence and body weight in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *ECTRIMS 2022 (Amsterdam), Poster P135*

Patente

J. Laux, J.H. Guse, S. Laufer, M.W. Burnet: Targeted modulators of JAK3 for treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *US Application No. 63/355,065*

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Äq.	(molare) Äquivalente
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
AUMC	<i>Area Under the Moment Curve</i>
BALF	<i>Bronchoalveolar Lavage Fluid</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
BV	Bioverfügbarkeit
CDI	Carbonyldiimidazol
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CYP	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin / Hünig-Base
DMARD	<i>Disease-modifying Antirheumatic Drug</i>
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	<i>Dextrane Sulfate Sodium</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC ₅₀	Halbmaximale effektorische Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat

ges.	gesättigt
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBC	<i>Human Buffy Coat</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IBuOH	Isobutanol
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IPrOH	Isopropanol
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IR	Infrarot
JAK	Januskinase
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MLM	Murine Lebermikrosomen
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	<i>Mean Residence Time</i>
MS	Massenspektrometrie, Multiple Sklerose
MW	Molekulargewicht
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PK	Pharmakokinetik
p.o.	Peroral
PTX	Pertussistoxin

qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Smp	Schmelzpunkt
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TOF	<i>Time Of Flight</i>
TPO	Thrombopoietin
UV	Ultraviolett
γ_c	<i>common gamma chain</i>

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Danksagung	I
Zusammenfassung der Dissertation.....	IV
Summary of the thesis	V
Publikationsliste	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Inhaltsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Proteinkinasen	1
1.2 Aufbau der Proteinkinasen	2
1.3. Aufbau der Januskinasen	6
1.4 JAK: Biologische Funktionen und der JAK-STAT Signalweg.....	7
1.4.1 Rezeptorassoziation der JAKs.....	7
1.4.2 Signaltransduktion des JAK-STAT Wegs.....	8
1.4.3 Regulation des JAK-STAT Wegs	10
1.4.4 Mit JAK-Mutationen assoziierte Erkrankungen	10
1.5 Die Katalyse-Tasche der JAK3	12
1.6 Kinase-Inhibitoren	15
1.6.1 Klassifizierung der Kinaseinhibitoren.....	15
1.6.2 Kovalente Inhibitoren	16
1.6.3 Zugelassene niedermolekulare JAK-Inhibitoren	19
1.6.4 Tofacitinib	20
1.7 FM-381.....	22
1.7.1 Bindemodus von FM-381 in der JAK3.....	22
1.7.2 Aktivität und Selektivität.....	23
1.8 Azithromycin	25
1.9 Makrolidbasierte Konjugatwirkstoffe	29
2 Aufgabenstellung	31
3 Chemischer Teil	33
3.1 Synthese der JAK3-Inhibitoren vom Cyanacrylamid-Typ.....	33

3.1.1	Synthese von 4-Chlor-5-nitro-1-tosyl-1 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>b</i>]pyridin	33
3.1.2	SN _{Ar} zur Einführung der Seitenkette, Reduktion zum vicinalen Diamin	34
3.1.3	Alternative Reduktionsmethode (c) mit Natriumdithionit	36
3.1.4	Ringschlussreaktion zu 2-(5-hydroxymethylfuryl)imidazolen, Dess-Martin-Oxidation und Tosyl-Entschützung	36
3.1.5	Knoevenagel-Kondensation zu Cyanacrylamiden	38
3.1.6	Reduktion des elektrophilen Warheads	39
3.2	Synthese der Cyanacetamid-Bausteine zur Einführung des Michael-Akzeptors	41
3.3	Synthese von Azithromycin-basierten Trägermolekülen.....	42
3.3.1	Synthese von 2'-deoxy-3'-dedimethylamino-2',3'-epoxyazithomycin (58).	43
3.3.2	Nukleophiler Angriff am 2'-/3'-Epoxid	49
3.3.3	Amidbildung mit Cyanessigsäure zu Cyanacetamiden	50
3.3.4	Darstellung des Knoevenagel-Partners 63:.....	51
3.3.5	Weitere Syntheseansätze für Makrolid-Spacer:.....	52
3.4	Synthese neuer Cycloalkylamine zur Einführung metabolisch stabiler Seitenketten	54
3.4.1	Synthese von Bicyclo[3.1.0]hexan-6-amin (70)	55
3.4.2	Synthese von 1-Methyl-cyclohexylamin und Folgereaktionen.....	58
3.5	Synthese von FITC-Dextran (75)	59
3.6	Synthese des Fluorophor-Konjugats 76.....	60
4	Biologische Tests und Ergebnisse	63
4.1	JAK3-Aktivität und pharmakokinetische Eigenschaften	63
4.2	Weitere in vitro Testverfahren.....	86
4.2.1	Selektivität innerhalb der JAK-Familie	86
4.2.2	Zelluläre Aktivität gegen die JAK3.....	88
4.2.3	Zytokinausschüttung nach LPS-Stimulus	90
4.2.4	Toxizitäts-Assays.....	100
4.2.5	Fluoreszenzverhalten, Zellaufnahme-Experimente	104
4.2.6	Metabolische Stabilität	111
4.2.7	Stabilität in menschlichem Vollblut und Plasma.....	113
4.2.8	Löslichkeit bei pH 7,4	115
4.3	Weitere <i>in vivo</i> Studien.....	118
4.3.1	Zusätzliche PK-Studien:	118
4.3.2	LPS challenge Modell	148
4.3.3	Psoriasis Modell.....	158
4.3.4	MOG/PTX-induzierte EAE	164

4.3.5 DSS-Colitis Modell	170
4.3.6 Collagen-induced arthritis Modell.....	191
5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	198
6 Experimenteller Teil.....	201
6.1 Materialien und allgemeine Methoden.....	201
6.2 <i>In vitro</i> Testverfahren.....	203
6.3 <i>In vivo</i> Studien.....	207
6.4 Allgemeine Synthesevorschriften	215
6.5 Synthese und Analytik der beschriebenen Verbindungen.....	218
7 Anhänge.....	290
7.1 Liste der Testverbindungen nach Serie	290
7.2 weitere experimentelle Daten.....	315
7.2.1 2D NMR Spektren.....	315
7.2.2 Absorptionsspektren ausgewählter Testverbindungen.....	326
7.2.3 Zytotoxizitäts-Assays	328
7.2.4 Weitere <i>in vitro</i> LPS-Assays.....	332
7.2.5 Röntgenkristallographische Daten	336
8 Literaturverzeichnis.....	341
9 Offenlegung	357

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen

Die Übertragung von Phosphat auf Proteine zählt zu einem der wichtigsten und häufigsten Schritte bei der Übertragung und Amplifizierung extrazellulärer Signale in den Zellkern. Bei dieser sogenannten Phosphorylierung wird der γ -Phosphatrest eines Nukleotids (meist ATP) auf eine spezifische OH-Gruppe des Substrats übertragen. Die Reaktion wird durch Proteinkinasen katalysiert, die man – je nach phosphorylierter Aminosäure – in Tyrosin- sowie Serin/Threoninkinasen unterteilt. Nach Phosphorylierung des Substrats ändert sich dessen Konformation, es ist sozusagen „angeschaltet“ und kann seinerseits seine angedachte Funktion erfüllen. Auf diesem Weg stellen Kinasen eine essentielle regulatorische Einheit für die Zellen dar. Die involvierten Signalwege sind in vielen Fällen quervernetzt und können sich gegenseitig verstärken bzw. hemmen. Durch die kaskadenartige Weitergabe des Signals kommt es zudem zu dessen Verstärkung mit jeder Stufe. Der genaue Hergang und dessen Auswirkungen sind dabei auch von der für den Zelltyp spezifischen Expression der beteiligten Kinasen und Transkriptionsfaktoren abhängig. Heutzutage stellen Proteinkinasen, neben den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, eine der wichtigsten Zielgruppen für Arzneistoffe dar.¹⁻³

Es existieren verschiedene Möglichkeiten zur Gegenregulation der Signalpfade, um eine für die Zelle sinnvolle Homöostase einzuhalten: So kann es, nach Bindung eines Transkriptionsfaktors, durch Feedback Loops zu einer verminderten Expression der beteiligten Kinasen oder bestimmter Substrate kommen. Eine andere Methode ist die (induzierte) Bildung von Phosphatasen, welche die phosphorylierten Substrate durch Abspaltung der übertragenen Phosphatgruppen wieder inaktivieren.³ Auf weitere, für die Familie der Januskinasen spezifische Gegenspieler wird in Kapitel **1.4.3** näher eingegangen.

Das menschliche Kinom umfasst 518 für Proteinkinasen codierende Gene. Durch alternatives Splicing liegt die Zahl an exprimierten Kinasen allerdings noch höher. Etwa ein Zehntel dieser Kinasen wird auch als Pseudokinasen bezeichnet, da sie nur über schwache oder gar keine katalytische Aktivität verfügen. Es handelt sich aber nicht etwa um (mittlerweile funktionslose?) evolutionäre Relikte, sondern v.a. um regulatorische Proteine, die wichtige physiologische Funktionen ausüben.^{4,5}

Neben der bereits erwähnten Einteilung nach dem Substrat lassen sie sich zudem auch auf Basis ihrer genetischen Gemeinsamkeiten (bzw. Sequenzhomologien der katalytischen Domäne) unterteilen. Man unterscheidet dabei zwischen sieben Superfamilien typischer Proteinkinasen sowie der Familie der atypischen Proteinkinasen:

- **Tyrosin-Kinasen (TK)**
- **Tyrosin-Kinase-like (TKL)**
- **cyclin-dependent kinases, MAP kinases, glycogen synthase kinases, casein kinases 2 (CMGC)**
- **Proteinkinase A, Proteinkinase G und Proteinkinase C Familien (ACG)**
- **Calcium/Calmodulin-dependent kinases (CAMK)**
- **Homologues of yeast sterile 7, sterile 11 and sterile 20 kinases (STE)**
- **Casein Kinase 1 Familie (CK1)**
- **Atypische** Proteine ohne strukturelle Ähnlichkeit zu obigen Familien, die ebenfalls Kinase-Aktivität zeigen

Man unterteilt die Tyrosinkinasen ferner noch in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK, z.B. der EGFR oder PDGFR) und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (nRTK, meist cytosolische Kinasen, z.B. die Januskinasen oder p38 MAP-Kinasen).^{4,6}

Die RTKs sind membranständig und verfügen sowohl über eine (N-terminale) extrazelluläre, als auch (C-terminale) intrazelluläre Domänen. Erstere ist Bindestelle für Signalmoleküle, typischerweise Zytokine oder (Peptid-)Hormone. Auf cytosolischer Seite befinden sich sowohl die Kinasedomäne, die für die katalytische Phosphorylierung zuständig ist, als auch Domänen mit regulatorischen und unterstützenden Funktionen. Eine transmembranäre Helix verbindet beide Teile der RTKs und dient der Verankerung in der Zellmembran.⁷

Die nRTKs verfügen über keine eigene als Rezeptor agierende Domäne. Stattdessen binden sie, meist auf cytosolischer Seite, an zugehörige Rezeptoren ohne eigene katalytische Aktivität und geben deren Signale entsprechend weiter. Manche Kinasen können dabei an mehrere unterschiedliche Rezeptoren binden, deren jeweilige Expression vom Zelltyp abhängt. Strukturell verfügen die nRTKs zusätzlich zu den katalytischen und regulatorischen Domänen noch über eine weitere Domäne, die die Rezeptorbindung ermöglicht.⁸

1.2 Aufbau der Proteinkinasen

Die Proteinkinasen weisen generell hohe Ähnlichkeiten im allgemeinen Aufbau auf, gerade innerhalb der jeweiligen Familien. Insbesondere Teile der katalytischen Domäne sind i. d. R. stark konserviert – dies ist nicht weiter verwunderlich, da zur Übertragung der Phosphatgruppe auf ein Substrat erst ATP (seltener GTP) gebunden werden muss. Strukturelle Unterschiede zwischen den Kinasen existieren dennoch, sie

sind u.a. für die Differenzierung bzw. Bindung der jeweiligen Substrate von Bedeutung. Auch regulatorisch agierende Domänen, z.B. die Pseudokinase-Domänen der JAK-Familie (s. **1.3**), können ein weiteres Alleinstellungsmerkmal mancher Kinasen sein.^{6,9}

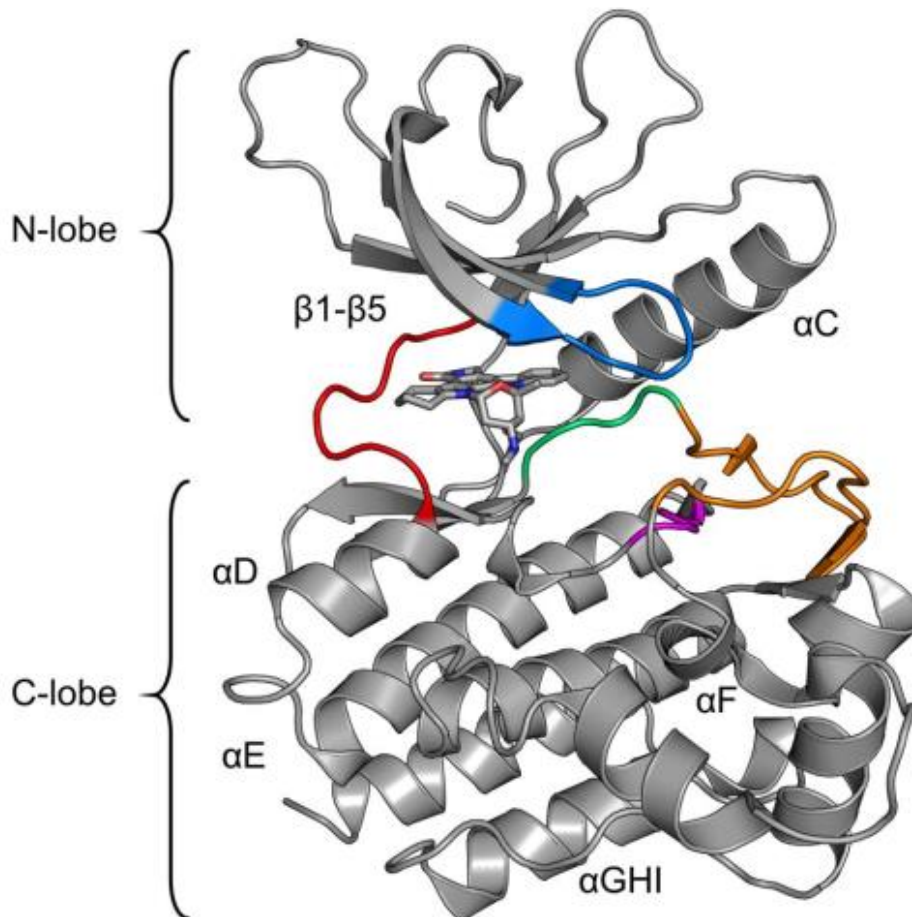


Abbildung 1.1: Röntgenkristallstruktur der JAK3, einer nRTK (PDB: 1YVJ).¹⁰ Typisch für eine Proteinkinase ist der Aufbau aus zwei Lobes, die über die rot eingefärbte hinge-region verbunden sind. Weitere für die Funktion der Kinase wichtige Elemente sind u.a. die activation loop (orange), Mg^{2+} -binding loop (grün), catalytic loop (violett) und die glycin-rich loop (blau). Zentral ist ein komplexiertes Derivat des promiskuitiven Kinaseinhibitors Staurosporin dargestellt. Verwendet mit freundlicher Genehmigung von Michael Forster.

Als Beispiel ist der Aufbau der JAK3 in **Abbildung 1.1** dargestellt. Grob lässt diese sich, wie die meisten Kinasen, in zwei Abschnitte („lobes“) aufteilen: Der verhältnismäßig größere C-terminale lobe sowie der kleinere N-terminale lobe. Beide sind über die flexible hinge region verbunden. Die für die Phosphorylierung des Substrats wichtige katalytische Tasche, in der auch ATP gebunden wird (**Abbildung 1.2**), befindet sich zwischen den lobes.^{10,11} Der C-loben beinhaltet viele Elemente die zur regulativen oder katalytischen Funktion beitragen. Die wichtigsten Motive sollen nun in Kürze zusammengefasst werden:

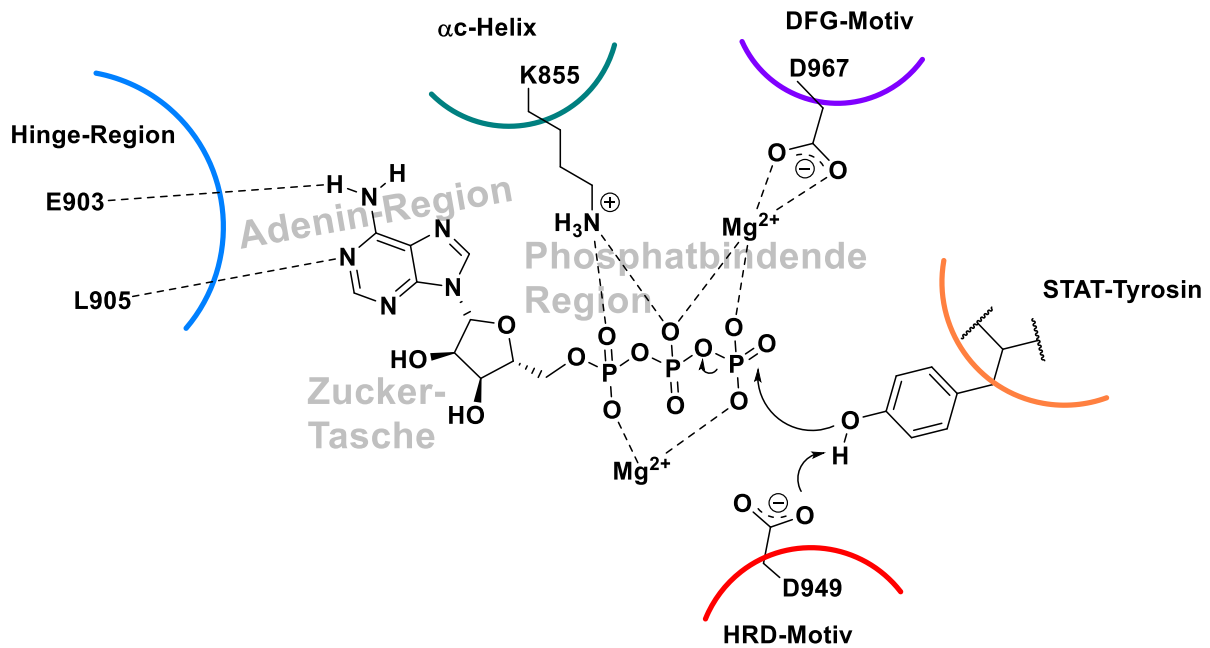


Abbildung 1.2: Bindemodus des natürlichen Substrats ATP in der ATP-Bindungstasche der JAK3. Der Adenin-Ring kommt in der Adenin-Region zum liegen und geht zwei Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren der Hinge-Region (blau) ein. Der Ribose-Rest wird in der hydrophilen Zuckertasche positioniert. In der Phosphatbindenden Region wird der Triphosphat-Rest über Wechselwirkungen mit zwei Mg²⁺-Ionen und einem konservierten Lysin, K855 der αC-Helix (grün), koordiniert. Das dem HRD-Motiv (rot) zugehörige D949 dient bei der Phosphorylierung des Substrats als Base und fängt das abgespaltene Proton des STAT-Tyrosins (orange) ab. Adaptiert nach Forster.⁴

Die sogenannte **Mg²⁺-binding loop** befindet sich auf der dem Solvens fernen Seite der ATP-Bindetasche. Ihr wichtigstes Element ist das konservierte **DFG-Motiv**, dessen Konformation sich in Abhängigkeit vom Zustand der Kinase ändert. In der „DFG-out“ Konformation ist die aromatische Seitenkette des F968 in die ATP-Bindetasche hinein orientiert. Dadurch ist die Bindung von ATP nicht möglich, die Kinase ist inaktiv. Wird die Kinase aktiviert, tritt dagegen der „DFG-in“ Zustand ein: Während der Phenylrest nun eher nach außen verschoben wird, ragt nun der zu D967 zugehörige Rest in die Bindetasche hinein. Dies ermöglicht die Komplexierung eines Mg²⁺-Ions, welches seinerseits mit den β- und γ-Phosphatresten von ATP wechselwirkt und sie an die richtige Stelle platziert. Der im DFG-in Zustand verschobene Phenylrest ist nun außerdem in der Lage, die nötigen Wechselwirkungen zur Ausbildung der R-spine (s.u.) einzugehen.^{4,12,13}

Die **catalytic loop** befindet sich unterhalb der ATP-Bindetasche. Ihr ebenfalls hochkonserviertes HRD-Motiv (H947, R948, D949) ist wichtig für den Phosphorylierungsschritt: Das abgespaltene Proton des zu phosphorylierenden Tyrosin-Rests wird vom hier als Base agierenden Aspartat aufgenommen.^{4,14} Die Histidin-Seitenkette wiederum geht aromatische Wechselwirkungen mit der Phenylalanin-Seitenkette des DFG-Motivs ein, was für die Konformation der Bindetasche bzw. die Ausbildung der R-spine (s.u.) von Bedeutung ist.¹³

Die **activation loop** liegt, am Proteinstrang betrachtet, hinter dem DFG-Motiv. Sie ist zwischen den verschiedenen Kinasen weniger konserviert. Ein gemeinsames Element ist das Vorhandensein von „Schalter“-Aminosäuren, die im aktiven Zustand der Kinase phosphoryliert vorliegen. Bei der JAK3 sind dies die benachbarten Aminosäuren Y980

und Y981. Werden diese phosphoryliert ändert sich die Konformation der katalytischen Domäne insofern, dass sich die ATP-Bindetasche öffnet und die Bindung von ATP sowie dem Substrat erlaubt. Stabilisiert wird dieser Zustand durch Wechselwirkungen von pY981 zur basischen Seitenkette von K972 sowie über eine „indirekte“ (über ein zwischengeschaltetes Wassermolekül vermittelte) Wasserstoffbrücke von pY981 zu R870.^{10,11}

Die bereits erwähnte **hinge region** verbindet C- und N-lobe. Hier baut das Substrat ATP (bzw. ein niedermolekularer Inhibitor) Wasserstoffbrücken zu deren Aminosäuren (bei der JAK3 E903 und L905) auf. Im Falle von ATP gehen die Wasserstoffbrücken vom N1 und N6 des Adenin-Rings aus.¹⁵

N-terminale Strukturelemente von Interesse sind u.a. die **α C-Helix** und die glycine rich loop. Erstere ändert ihre Konformation nach Aktivierung der Kinase (durch Interaktion von pTyr981 der activation loop mit R866 und R870)¹⁰ und nähert sich dem C-lobe an, ein Zustand der als „ α C-in“ bezeichnet wird. In diesem Zustand wird über einen in der Helix befindlichen hochkonservierten Glutamat-Rest eine Salzbrücke zu einem (ebenfalls konservierten) Lysin (K855) aufgebaut. Dieses wird dadurch so positioniert, dass seine Aminogruppe mit den α - und β -Phosphaten von ATP interagiert und die Phosphatkette optimal für die Phosphorylierungsreaktion koordiniert. Für eine katalytische Aktivität sind sowohl die DFG-in (s.o.) als auch die α C-in Konformation nötig, der DFG-in Zustand alleine ist noch nicht ausreichend.^{4,11}

Die **glycine rich loop** ist äußerst flexibel, da aufgrund des hohen Anteils an Glycin weniger sterisch hinderliche Seitenketten vorliegen. Sie ist in der Literatur auch als P-loop bekannt und verleiht der Kinase die hier nötige Beweglichkeit, um optimal das gebundene ATP zu koordinieren. Ein konserviertes Phenylalanin schirmt die Phosphatkette in eine Richtung ab.^{4,11}

Auch der sogenannte „**Gatekeeper**“ befindet sich im N-terminalen lobe. Die dahinter befindliche Tasche wird von ATP nicht adressiert und ist damit für dessen Bindung wenig bedeutsam. Da die relevante Gatekeeper-Aminosäure aber weniger konserviert ist, hat sie durchaus Relevanz für die Entwicklung von Kinaseinhibitoren. Ist die Seitenkette des Gatekeepers klein (z.B. Threonin beim EGFR), kann die Tasche von Inhibitoren belegt werden, wodurch Selektivität gegenüber anderen Kinasen gewonnen wird. Hier kann es aber auch – v.a. im onkologischen Bereich – zur Bildung von Resistenzen kommen, indem die Gatekeeper-Aminosäure per Punktmutation durch eine größere ausgetauscht wird. Bei EGFR-abhängigen Tumoren kommt es so z.B. nach längerer Behandlung mit EGFR-Inhibitoren der ersten Generation zum Auftreten der T790M-Mutante. Durch die nun größere Seitenkette des Gatekeepers kann die Bindetasche nicht mehr adressiert werden, die Positionierung der Inhibitoren wird gestört und es kommt zu einem Verlust der Wirksamkeit.^{16,17} Bei der JAK3 ist der Gatekeeper das relativ sperrige M902.

Ein allen Kinasen eigenes, aus Aminosäuren beider lobes zusammengesetztes Strukturelement sind zwei hydrophobe, regulatorisch wichtige „**spines**“. Diese existieren nur in der aktiven Konformation der Kinase durch spezifische Wechselwirkungen von zueinander ausgerichteten Aminosäure-Resten. Die erste, auch R-spine (für „regulatory“) genannt, wird im aktiven Zustand ausgebildet und besteht aus je zwei hydrophoben Resten der N- und C-lobes. Es handelt sich im Falle der JAK3

um das H947 des HRD-Motivs, F968 des DFG-Motivs sowie L877 und Y886 aus Abschnitten des N-lobes. Diese gehen jeweils in der genannten Reihenfolge hydrophobe Wechselwirkungen miteinander ein und bilden gemeinsam ein Rückgrat, dessen Existenz kritisch für die katalytische Aktivität der Kinase ist. Die C-spine (für „catalytic“) wurde später entdeckt und wird erst durch die Bindung von ATP vollständig ausgebildet. Bei der JAK3 wird dessen Adenin-Ring von V836, A853 und L956 umschlossen, was die beiden lobes einander näherbringt und die Kinase in eine geschlossene Konformation versetzt, die die Phosphatübertragung auf das Substrat begünstigt. Beide spines sind mit einer ebenfalls hydrophoben, im C-lobe lokalisierten F-Helix verbunden.^{4,12,13}

1.3. Aufbau der Januskinasen

Die Familie der Januskinasen (JAKs) besteht aus vier Isoenzymen mit hoher struktureller Homologie, die Januskinasen 1 bis 3 sowie die Tyrosinkinase 2 (TYK2). Die JAKs gehören zu den nRTKs (s.o.) und sind im Cytosol angesiedelt. Sie verfügen über keine eigene Bindestelle für extrazelluläre Liganden, sondern binden an membranständige Rezeptoren. Deren Signale werden über die JAKs und weiter downstream befindliche Transkriptionsfaktoren in den Zellkern weitergegeben.

Die Januskinasen lassen sich strukturell in sieben JH (JAK Homologie) Domänen unterteilen:

Die **JH1** Domäne ist C-terminal lokalisiert und stellt die katalytisch aktive Kinase-Domäne dar, auf deren Beschaffenheit bereits an anderer Stelle näher eingegangen wird.

Bei der benachbarten **JH2** handelt es sich um eine Pseudokinase-Domäne. Sie ist von ähnlicher Sequenz und Struktur wie die JH1, besitzt selbst aber keine katalytische Aktivität. Grund hierfür ist vermutlich das Fehlen dazu nötiger (in der JH1 dagegen vorhandener) Aminosäuren, insbesondere des katalytisch wichtigen Aspartats des HRD-Motivs.¹⁸ Nur für die JAK2 wurde schwache Aktivität und die Fähigkeit zur Autophosphorylierung gezeigt. Diskutiert wird, dass sich die Bindung von Nukleotiden in der JH2 stabilisierend auf die Konformation der gesamten Kinase auswirkt.⁹ Generell wirkt sich die Pseudokinase-Domäne regulatorisch auf die JH1 aus, sowohl auf inhibierende als auch (seltener) auf aktivierende Art. Dies ist auch anhand diverser, auf veränderter JAK-Aktivität basierender Krankheitsbilder ersichtlich (s. **Kapitel 1.4.4**), denen z.B. eine Mutation in der für die JH2 codierenden Sequenz zugrunde liegen kann. Aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zur JH1 ist die Pseudokinase-Domäne zudem namensgebend für die Familie der Januskinasen.¹⁹

JH3 und **JH4** befinden sich weiter in Richtung N-Terminus gelegen und bilden zusammen die SH2-like (Src Homologie 2 like) Domäne. SH2 Domänen zeigen hohe Affinität zu Phosphotyrosinen und dienen üblicherweise (nicht bei den Januskinasen) der Erkennung anderer Proteine oder Peptide, wie es z.B. auch beim Transkriptionsfaktor STAT1 der Fall ist. Die genaue Funktion der SH2-*like* Domäne der JAKs ist aber noch nicht eindeutig geklärt.^{10,20}

N-Terminal befinden sich **JH5**, **JH6** und **JH7**, die zusammen die „band 4.1, ezrin, radixin, moesin“ (FERM) Domäne bilden. Die FERM Domäne hat vermutlich regulatorischen Einfluss auf die Kinase-Domäne, was bei FAK, einer weiteren Tyrosinkinase, gezeigt wurde.²¹ Sie dient außerdem der Bindung an die cytosolisch gelegenen Abschnitte der JAK-abhängigen Rezeptoren.²⁰

Tabelle 1.1: Einteilung der JAKs in sieben JAK Homologie Domänen.

No.	Bezeichnung	Rolle
JH1	Kinase-Domäne	katalytisch aktiv
JH2	Pseudokinase	regulatorisch
JH3 JH4	SH2 Domäne	Erkennung von pTyr (?)
JH5 JH6 JH7	FERM Domäne	Rezeptorbindung, regulatorisch

1.4 JAK: Biologische Funktionen und der JAK-STAT Signalweg

1.4.1 Rezeptorassoziation der JAKs

Die Januskinasen erfüllen wichtige Funktionen für Reifung, Wachstum, Differenzierung und Überleben bzw. Apoptose von Zellen, insbesondere bei der Erythropoese und bei Zellen des Immunsystems. Dabei binden an die meisten Rezeptoren verschiedene JAKs als Heterodimere oder -trimere, weswegen es lange Zeit schwer war, die Effekte einzelner Isoenzyme zu identifizieren. Die Kombination der JAKs ist jeweils vom Rezeptor abhängig. Interessanterweise gibt es Anhaltspunkte für eine hierarchische Anordnung innerhalb der JAKs, bei denen je eine der Kinasen als Aktivator für eine andere dient, welche dann den eigentlichen Effektor darstellt und den Rezeptor phosphoryliert. Gezeigt wurde dies z.B. beim IL-3 Rezeptor, der in JAK1^{-/-} Zellen noch (geschwächte) IL-3 Signale weitergibt, während bei JAK2^{-/-} Zellen keine entsprechende Antwort mehr festzustellen war. Auch für die JAK1/JAK3-Paarung wurde ähnliches Verhalten beobachtet, in diesem Fall nahm JAK1 eine dominante Rolle ein.^{9,22}

Allein die JAK2 bildet auch Homodimere, die z.B. an die Rezeptoren für EPO, TPO und GM-CSF assoziiert sind. Hierbei handelt es sich um Wachstumsfaktoren, die jeweils für die Blutbildung, Plättchenbildung und das Wachstum myeloischer Immunzellen von Bedeutung sind. Eine andere Gruppe von Signalmolekülen sind die Interferone, deren Rezeptoren meist von Dimeren aus JAK1/TYK2 (Typ I Interferone), bzw. für INF γ von JAK1/JAK2 (Typ II Interferon) gebunden werden. Die Interferone sind wichtig für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger (z.B. Viren, Staphylokokken, Mykobakterien) und haben entzündungsfördernde Eigenschaften. Die größte Gruppe der über JAK-

abhängige Rezeptoren signalisierenden Botenstoffe stellen die Interleukine dar. Die Signalpfade der Interleukine sind sehr heterogen und lassen sich keiner prädominanten JAK-Kombination zuordnen. Interessant sind die common γ chain Interleukine (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21), an deren Rezeptoren stets ein JAK1/JAK3 Heterodimer bindet. Eine Mutation der diesen Rezeptoren gemeinen γ chain führt zum identischen Phänotyp wie ein Defekt der assoziierten JAK3.^{23,24}

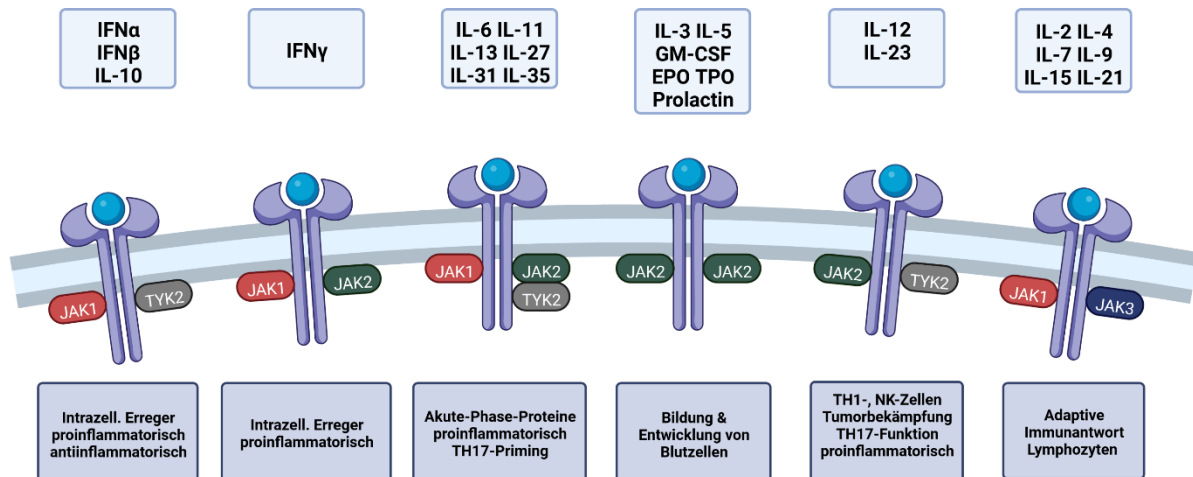


Abbildung 1.3: Di- bzw. Trimere der Januskinasen, ihre zugehörigen Rezeptoren und die wichtigsten physiologischen Effekte der jeweiligen Signalwege. Die Signale der Interferone (IFN α , IFN β , IFN γ) sowie des antiinflammatorisch wirksamen IL-10 sind dabei von JAK1 sowie TYK2 oder JAK2 (IFN γ) abhängig. Die JAK2 formt als einzige Januskinase Homodimere und bindet an Rezeptoren von Wachstumshormonen der Blutzellen (EPO, TPO, GM-CSF...). Die JAK3 bindet nur an Rezeptoren der γ_c Zytokine (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21) und formt Heterodimere mit der JAK1. Die γ_c Zytokine sind vor allem für Zellen der adaptiven Immunantwort relevant.^{23,24}

1.4.2 Signaltransduktion des JAK-STAT Wegs

Der JAK-STAT Signalweg (**Abbildung 1.4**) ist im Vergleich zu den meisten anderen Signalwegen von Kinasen deutlich kürzer und beinhaltet weniger Zwischenschritte. Nach Bindung eines extrazellulären Botenstoffes an den zugehörigen Rezeptor ändert dieser seine (intrazelluläre) Konformation. Die an seine intrazellulären Domänen assoziierten JAKs sind nun einander nah genug, um erst sich selbst und dann den Rezeptor zu phosphorylieren. Von der Transphosphorylierung der JAKs wird angenommen, dass diese strenggenommen nicht zu deren Aktivierung dient, wohl aber zur Stabilisierung eben jener aktiven Konformation. An den aktivierten Kinase-Rezeptorkomplex können nun die „signal transducers and activators of transcription“ (STAT) Proteine binden; die Erkennung erfolgt dabei über die SH2 Domänen. Die Struktur der SH2 Domänen einzelner STATs ist unterschiedlich genug, um die spezifische Erkennung verschiedener phosphorylierter Motive zu ermöglichen.^{9,20,24,25} Es sind sieben verschiedene STATs bekannt (STAT1-4, STAT5a, STAT5b, STAT6) die an verschiedene Kombinationen aus Rezeptor und JAK binden können. Im Falle der JAK3-abhängigen Rezeptoren binden entweder STAT3, STAT5a/b oder STAT6. Nach Phosphorylierung der STATs dimerisieren diese, wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere möglich sind. Die Dimerisierung erfolgt über Erkennung des Phosphotyrosins des jeweiligen Partnerproteins durch die eigene SH2-Domäne und umgekehrt. Ergebnisse anderer Forschungsgruppen legen wiederum nahe, dass die STATs auch schon vor ihrer Phosphorylierung als vorgeformte, inaktive Dimere

vorliegen.^{9,26} Mithilfe von Importinen und Ran werden die STATs zum Zellkern transportiert: Die Importine ermöglichen die Passage durch die den Zugang kontrollierenden nuclear pore complexes. Anschließend dissoziiert Ran die Importine wieder von den STATs ab, sodass diese an die entsprechenden Promotorregionen der DNA binden und die Genexpression modulieren können.²⁷

Der JAK-STAT Signalweg zeichnet sich auch durch seine hohe Geschwindigkeit aus: Innerhalb weniger Minuten nach Bindung eines Zytokins kann bereits die Bindung von STAT an die DNA beobachtet werden.²⁴

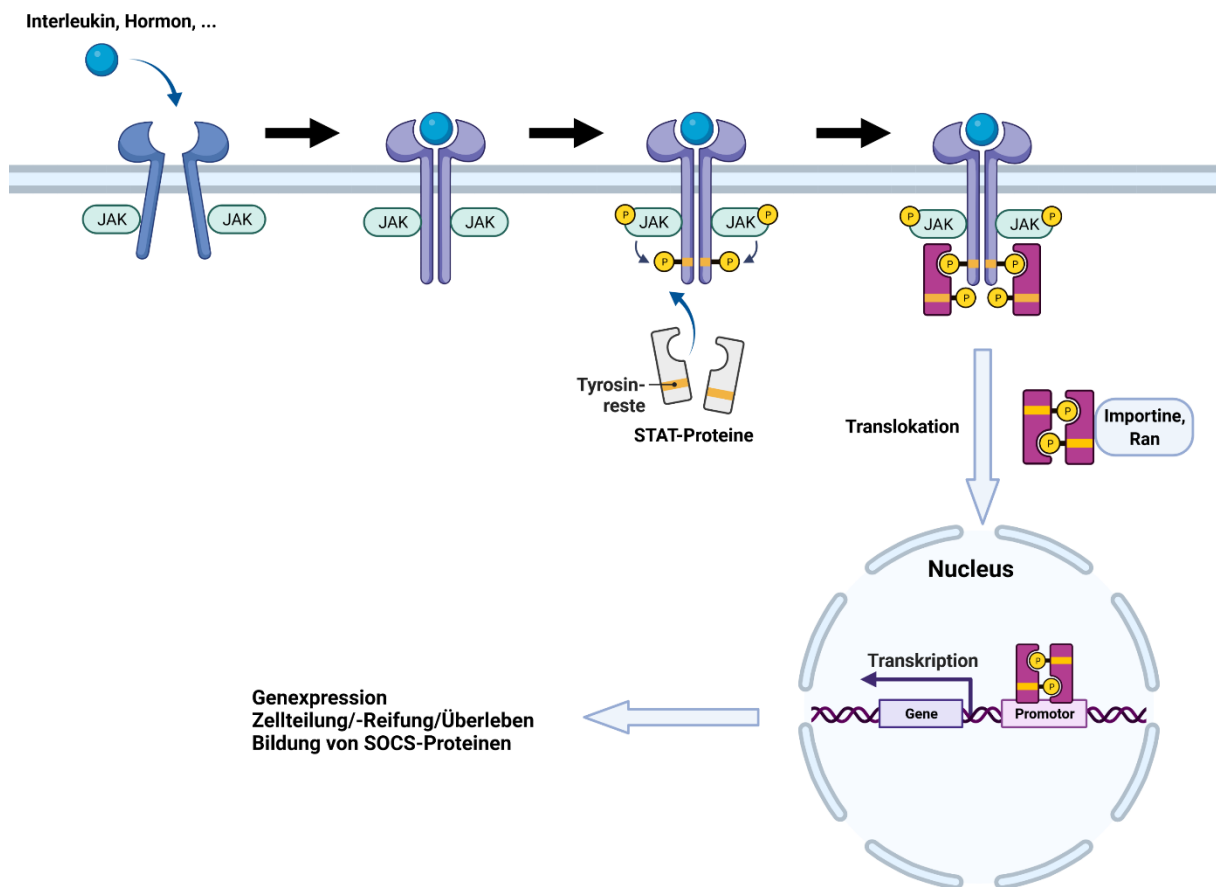


Abbildung 1.4: Schematischer Ablauf des JAK-STAT Signalwegs. Nach Bindung eines Botenstoffes an der extrazellulären Andockstelle eines Rezeptors ändert dieser seine intrazelluläre Konformation. Auf cytosolischer Seite am Rezeptor assoziierte JAKs bilden nun Di- oder Trimere. Sie sind dadurch in ausreichender Nähe, um erst sich gegenseitig und anschließend den Rezeptor an spezifischen Tyrosinresten zu phosphorylieren. Nun binden STAT-Proteine an den Kinase-Rezeptorkomplex, werden phosphoryliert und dimerisieren ebenfalls. Die STAT-Dimere wandern nun mithilfe von Importinen und Ran in den Zellkern, um dort ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren auszuüben.

Auch eine Quervernetzung der JAK-STAT Wege miteinander – im Sinne der gegenseitigen Beeinflussung, z.B. durch Expression regulativer Proteine (s.u.) – oder anderen Signalpfaden, z.B. NF- κ B, wird diskutiert.²⁸

1.4.3 Regulation des JAK-STAT Wegs

Um die Aktivität des JAK-STAT Wegs in physiologisch sinnvollem Rahmen zu halten, haben sich, zusätzlich zur intrinsischen Regulation durch die Pseudokinase, verschiedene extrinsische Mittel der Gegenregulation entwickelt. Man teilt diese negativ regulierenden Proteine in drei große Gruppen ein:

Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPs) deaktivieren Proteine des JAK-STAT Wegs, indem sie die Tyrosinreste von STATs, JAKs oder den JAK-abhängigen Rezeptoren wieder dephosphorylieren.²⁹

Die **Protein inhibitors of activated STATs** (PIAS) werden konstitutiv exprimiert und deaktivieren gezielt STAT Proteine durch Übertragung von small ubiquitin-related modifier (SUMO) auf sie. Dadurch werden Phosphorylierung und Translokation der STATs verhindert, ebenso wie ihre Fähigkeit als Transkriptionsfaktoren zu wirken. Für die PIAS werden auch andere Mechanismen der Hemmung, z.B. direkte Interaktion mit den STATs, diskutiert.^{30,31}

Suppressors of cytokine signaling (SOCS) können auf zwei Arten negativ regulierend wirken: Über ihre SH2 Domäne können sie die Phosphotyrosine aktivierter JAKs erkennen und direkt an diese binden, wodurch deren katalytische Aktivität gestört wird. Des Weiteren können SOCS zur Bildung von Ubiquitin-Ligase Komplexen beitragen, die den Degradationsmarker Ubiquitin auf Proteine übertragen und so deren Abbau herbeiführen. Die Expression der SOCS ist induzierbar und wird durch Binden von STATs an den Nukleus gesteigert (z.B. führt das STAT3-vermittelte Signal von IL-10 zu erhöhter Bildung von SOCS1 und SOCS3).³² Die wichtige Rolle der SOCS zeigte sich auch im Tiermodell: SOCS1 Defizienz durch Knockout führte zu exzessiver IFN- γ Antwort mit diversen entzündungsbedingten Gewebeschäden. Der gleiche Phänotyp resultierte ebenfalls, wenn Wildtyp-Tieren hohe Dosen an IFN- γ verabreicht wurden. Die Symptomatik ließ sich in beiden Fällen durch Verabreichung von anti-IFN- γ Antikörpern behandeln. Doppelter Knockout von sowohl für SOCS1 als auch für IFN- γ codierenden Genen führte zu lebensfähigen Tieren. Zusammengefasst ist eine funktionierende Expression von SOCS1 essentiell dafür, die Immunantwort auf IFN- γ im physiologischen Rahmen zu halten.³³

Auf Ebene der STATs existiert noch eine weitere, vierte Möglichkeit der – positiven oder negativen – Regulation durch gezielte Acetylierung bestimmter Lysin-Seitenketten. Die Reaktion wird durch Histon-Acetyltransferasen katalysiert, die hauptsächlich für die Beeinflussung der Gentranskription durch Acetylierung der Histone bekannt sind. Ihre biologischen Gegenspieler, die Histon-Deacetylasen, katalysieren die entsprechende Gegenreaktion und üben so ebenfalls einen Einfluss auf die STAT-Aktivität aus. Die detaillierten Geschehnisse, wie auch die Identifizierung der betroffenen Lysine, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und werden weiterhin beforscht.³⁴

1.4.4 Mit JAK-Mutationen assoziierte Erkrankungen

Die Funktionen der verschiedenen Januskinasen erschließen sich auch aus den durch JAK-Defekte entstehenden Krankheitsbildern. Ein kompletter Mangel an funktionsfähiger JAK1 oder JAK2 ist in der Wildbahn nicht zu beobachten, und deren

genetischer Knockout in Mäusen führt zu nicht lebensfähigen Tieren, die spätestens innerhalb eines Tages nach der Geburt versterben. Insbesondere bei JAK2-Knockouts ist dies nicht weiter verblüffend, da diese eine obligatorische Rolle bei der Erythropoese spielt. Späterer, systemischer Knockout verursacht bei Versuchstieren Anämie, Thrombozytopenie und Knochenmarksinsuffizienz mit eventueller Todesfolge. Bei JAK1^{-/-} Tieren wird als Todesursache gestörte Signaltransduktion des gp130 Rezeptors vermutet, was zu zahlreichen, insgesamt letalen Defekten führt.

JAK3 und TYK2 Knockout-Mäuse sind dagegen sowohl lebens- als auch reproduktionsfähig, verfügen aber über eine geschwächte Immunabwehr. Die JAK3 wird hauptsächlich von Lymphozyten exprimiert. Ein kompletter Knockout der JAK3 führt zum SCID (severe combined immune deficiency) Phänotyp, der auch beim Menschen beobachtet wurde. Es kommt zu einer schweren Beeinträchtigung der B-, T- und NK-Zellen und infolgedessen zu starker Infektanfälligkeit. Die B-Zellzahlen sind bei dieser Variante der SCID normal, allerdings ist deren Funktion gestört; dagegen kommt es zu einem absoluten Mangel an viablen T- und NK-Zellen. Ein weiterer Gendefekt, der die common γ -chain Zytokinrezeptoren (für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21) betrifft, führt zu einem identischen Phänotyp. Hier ist die Interaktion der mutierten Rezeptoren mit der nachgeschalteten Kinase gestört. Außerhalb der schwerwiegenden Immunschwäche weisen SCID-Patienten keine weiteren Beeinträchtigungen auf. Aufgrund dieser Beobachtungen konnte die Bedeutung der JAK3 für das Signaling der common γ -chain Zytokinrezeptoren erkannt werden. Zudem wird hieraus die funktionelle Begrenzung der JAK3 auf Immunzellen deutlich. Der Knockout von TYK2 erhöht vor allem die Anfälligkeit gegenüber intrazellulären Erregern aufgrund einer Beeinträchtigung des Interferon-Signalings.^{9,33,35}

Beim Menschen können Loss-of-Function Mutationen der TYK2 Ursache für das Hyper-IgE-Syndrom (auch als Hiob-Syndrom bekannt) sein, für welches hohe Blutspiegel an IgE Antikörpern kennzeichnend sind. Das klinische Erscheinungsbild äußert sich durch Ekzeme, wiederkehrende Staphylokokken-Infekte der Haut und Atemwege und auffällige, anomale Gesichtszüge.³⁶

Exzessive oder gar konstitutive Aktivität der JAKs, z.B. durch aktivierende Mutationen, führt ebenfalls zu einer Reihe von Krankheitsbildern, die von Autoimmunerkrankungen zu proliferativen Erkrankungen und Malignitäten reichen. Viele dieser Mutationen betreffen Aminosäuren der Pseudokinase-Domäne, was deren regulatorische Funktion verdeutlicht.³⁷

Eine die JAK1 betreffende Gain-of-Function Mutation kann zu einem sich durch Gedeihstörungen, Eosinophilie und diversen weiteren, mit Autoimmunität assoziierten Symptomen auszeichnenden Phänotyp führen.³⁸

Verstärkte Aktivität der JAK2 kann zur Polycythemia Vera führen. Es handelt sich um eine myeloproliferative Erkrankung, gekennzeichnet durch starke Vermehrung der Erythrozyten und - in geringerem Maße - Thrombozyten und Granulozyten. Die Erythrozytose führt u.a. zu Rötungserscheinungen, Schmerzen und in schwereren Stadien zu Ischämie (letztere aufgrund der gesteigerten Viskosität des Bluts). Grund ist eine konstitutiv aktive, dauersignalisierende JAK2, wodurch die Erythrozytenbildung von der EPO-Ausschüttung entkoppelt wird. Eine häufige genetische Ursache für die

erhöhte Aktivität ist eine Mutation in der Pseudokinase-Domäne (V617F), wodurch deren regulative Funktion gestört ist.³⁹

Gain-of-function Mutationen der JAK3 wurden in Verbindung mit Formen der Leukämie, insbesondere T- und NK-Zell-Lymphomen, in Verbindung gebracht. Der Einsatz selektiver JAK3-Inhibitoren bei diesen Krebsarten ist Gegenstand aktueller Forschung.^{40,41}

1.5 Die Katalyse-Tasche der JAK3

Die JAK3 grenzt sich durch mehrere Alleinstellungsmerkmale von den anderen Kinasen der Familie ab. So ist ihre Expression fast ausschließlich auf (sowohl myeloische als auch lymphatische, v.a. letztere) Immunzellen begrenzt, für welche sie eine essentielle Rolle spielt.^{9,10} Sie bindet dort, stets als Heterodimer mit JAK1, an Rezeptoren der common γ chain Zytokine (s.o.). Die Paarung mit JAK1 macht die JAK3 zu einem interessanten pharmakologischen Ziel: Es ist noch nicht hinreichend geklärt, ob ihre alleinige Inhibition zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen ausreicht, oder ob über die (bei der Signalweitergabe dominante) JAK1 noch immer zu viele Signale ins Zellinnere weitergeleitet werden.²² Teil dieser Arbeit war der *in vitro* und *in vivo* Vergleich selektiver JAK3 Inhibitoren mit Hemmstoffen, die andere oder sogar alle JAKs potent inhibieren.

Auch in ihrer Proteinstruktur bestehen feine, aber für die Entwicklung von Hemmstoffen relevante Unterschiede zwischen der JAK3 und den anderen Mitgliedern der JAK-Familie. Bevor auf die strukturellen Besonderheiten der JAK3 eingegangen wird, soll an dieser Stelle zunächst die allgemeine Beschaffenheit der ATP-Bindetasche erläutert werden. **Abbildung 1.5** zeigt die Einteilung der Bindetasche nach Traxler.¹⁵

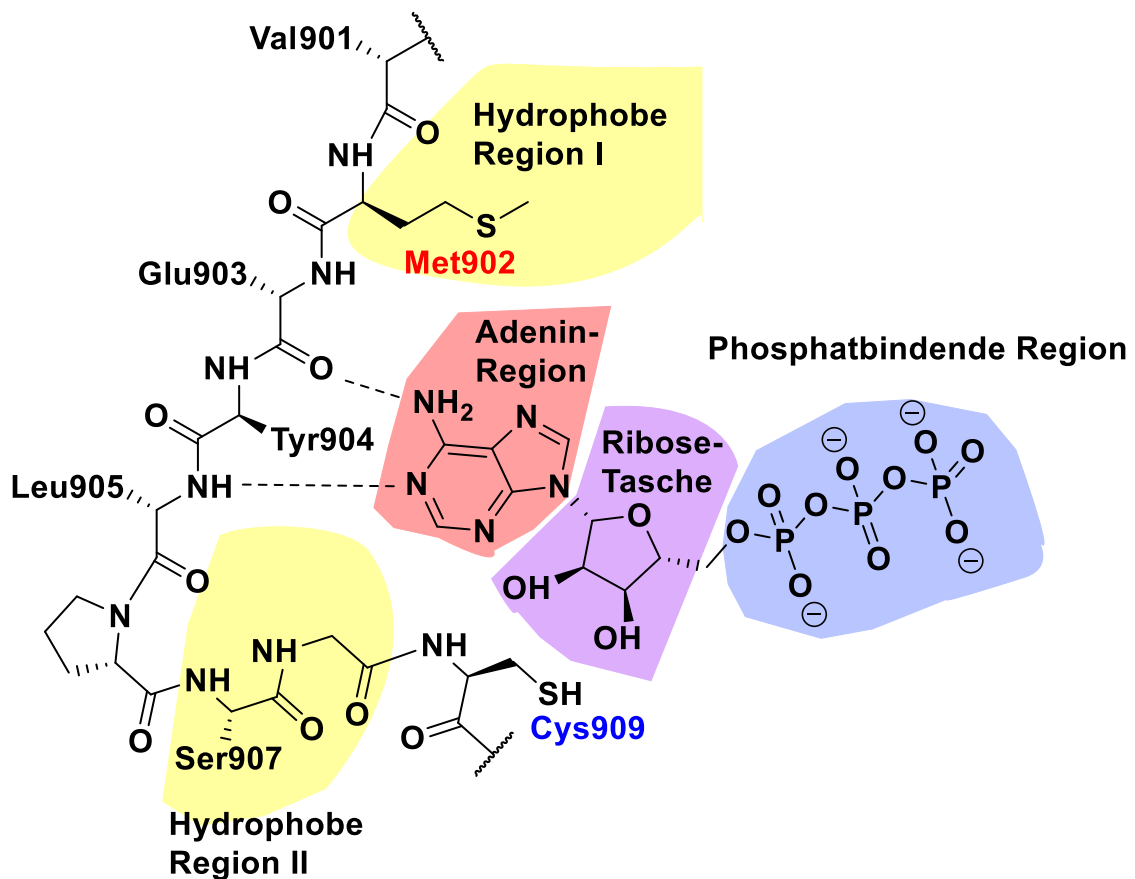


Abbildung 1.5: Unterteilung der ATP-Bindetasche der JAK3 nach Traxler.¹⁵ Rot beschriftet ist der Gatekeeper-Rest von Met902, der den Zugang zur Hydrophoben Region I blockiert. Das der JAK3 eigene Cys909 befindet sich nahe der Hydrophoben Region II und ist blau gekennzeichnet. Das natürliche Substrat ATP wird in der Adenin-Region (rötlich), Ribose-Tasche (violett) und Phosphat-bindenden Region (blau) positioniert. Es bildet zwei Wasserstoffbrücken zu Glu903 und Leu905 der Hinge-Region aus. Adaptiert nach Michael Forster.

Die Adenin-Region ist hydrophober Natur und dem Rückgrat der hinge region benachbart. Das natürliche Substrat ATP, dessen Adenin-Core in dieser Region positioniert wird, baut hier zwei Wasserstoffbrücken zur hinge auf. Üblicherweise verfügen (in der ATP-Bindetasche bindende) Kinasehemmer über ein „hinge-binding motif“, das ihnen ebenfalls die Ausbildung von Wasserstoffbrücken ermöglicht. Gegebenenfalls wird dabei noch eine dritte Wasserstoffbrücke mit einem in der Hydrophoben Region II befindlichen Wassermolekül eingegangen, wie es z.B. bei Tofacitinib der Fall ist (Kapitel **1.6.4**). Die Ribose-Tasche (oder „Zucker-Tasche“) ist hydrophiler beschaffen und beherbergt den Ribose-Rest des gebundenen Nukleotids. Dahinter liegt die Phosphat-bindende Region, in der der Triphosphat-Rest zu liegen kommt. Dieser wird durch die Seitenkette von L855 sowie durch ein (vom D967 des DFG-Motivs koordiniertes) Mg^{2+} -Ion für den Phosphorylierungsschritt positioniert. Die Region ist solvensexponiert, was beim Wirkstoffdesign die Einbringung von Resten ermöglicht, die der Optimierung von Löslichkeit oder Pharmakokinetik dienen. Aus dem Schema wird schnell ersichtlich, dass nur drei der fünf von Traxler definierten Regionen von ATP adressiert werden. Die beiden verbliebenen hydrophoben Regionen sind aber für die Wirkstoffentwicklung von hohem Interesse.

Der Zugang zur Hydrophoben Region I (HRI) wird durch den bereits unter Kapitel **1.2** beschriebenen Gatekeeper kontrolliert. Wie bereits erwähnt, ermöglicht die Adressierung der HRI bei Kinasen mit kleinen Gatekeeper-Resten einen Selektivitätsgewinn gegenüber jenen, bei denen die Seitenkette voluminöser ausfällt. Die HRII wird ebenfalls nicht von ATP belegt und ist, wie die Phosphat-bindende Region, dem Lösemittel zugewandt. Auch sie kann deswegen zur Optimierung diverser Stoffeigenschaften genutzt werden.^{4,15}

Insgesamt ist die Kinase-Domäne zwischen den JAKs hochkonserviert; wie bereits erwähnt bestehen aber kleine Unterschiede zwischen den Isoenzymen, die zum Selektivitätsgewinn genutzt werden können. Die der JAK3 ähnlichste Struktur hat die JAK2, während die Unterschiede zu JAK1 bzw. TYK2 vergleichsweise größer ausfallen. Allgemein bestehen deutlichere Unterschiede in den weniger konservierten nicht-katalytischen Domänen (SH2 bis SH7), was ggf. einen Einfluss auf die Zugänglichkeit niedermolekularer Inhibitoren zu bestimmten Konformationen haben kann, ansonsten aber eher für die Entwicklung allosterischer Hemmstoffe von Interesse ist.⁴²

Das wohl wichtigste Alleinstellungsmerkmal der JAK3 ist das in der ATP-Bindetasche befindliche C909. Die anderen Vertreter der JAKs besitzen an äquivalenter Stelle ein Serin.⁴³ Die Thiol-Seitenkette des Cysteins ist deutlich nukleophiler als Alkohole und kann durch Einsatz elektrophiler Inhibitoren kovalent gebunden werden. Da das Thiol auch vergleichsweise „weicher“ nach dem HSAB Konzept ist, eignen sich besonders weiche Elektrophile wie Michael-Akzeptoren hierfür.⁴⁴

Ein weiterer subtiler Unterschied der JAK3 ist die Präsenz eines Alanins an Position 966, nahe dem DFG-Motiv; bei den anderen JAKs liegt hier ein Glycin vor. Diskutiert wird, dass im Falle der JAK1/2 und TYK2 im inaktiven Zustand ein Tyrosin der activation loop in die ATP-Bindungstasche hineinragt und diese blockiert. Bei der JAK3 dagegen wird durch den – sterisch etwas anspruchsvolleren – Alaninrest die tyrosinhaltige Kette gestört, wodurch die Bindetasche frei bleibt und ATP auch im inaktiven Zustand der Kinase bereits gebunden werden kann.¹⁸

Eine vor kurzem erst beschriebene strukturelle Eigenheit der JAK3 ist die induzierbare „Arginin-Tasche“, die durch Cokristallisation der Kinase mit **FM-381** (Kapitel **1.7.1**) entdeckt wurde und einzigartig für die Stoffklasse der Cyanacrylamide zu sein scheint. Das Nitril des Inhibitors geht dort Wechselwirkungen mit R911 ein, wodurch sich die Ausrichtung der Guanidin-Seitenkette drastisch verändert. Diese bildet eine Wasserstoffbrücke zum Nitril aus und es formiert sich eine neue Einbuchtung, in der die Seitenkette des Warheads zu liegen kommt. Zu den anderen Seiten hin wird das Nitril von D912 und R953 umschlossen. Die anderen JAK-Isoenzyme verfügen in diesem Teil der katalytischen Domäne zwar über eine weitgehend ähnliche Sequenz, nicht aber über das nukleophile C909. Im Gegensatz dazu existieren zwar weitere nicht-JAK Kinasen mit einem Cystein in äquivalenter Position; ihnen fehlt aber das für die Ausbildung der Tasche nötige R911. Dieser doppelte Selektivitätsfilter trägt einen wesentlichen Beitrag zur Selektivität der Cyanacrylamide bei.^{4,45}

1.6 Kinase-Inhibitoren

Durch ihre Rollen in diversen Krankheitsbildern stellen viele Kinasen attraktive pharmazeutische Ziele dar und wurden insbesondere in den letzten Dekaden stark erforscht. Inzwischen sind eine Vielzahl an Kinasehemmern für unterschiedliche Targets im Einsatz oder in verschiedenen Stadien der (prä-)klinischen Entwicklung. Das Ideal, bei therapeutischen Dosen nur die intendierte Zielstruktur zu inhibieren, wurde bisher aber nur für wenige Targets realisiert. Durch die strukturell enge Verwandtschaft über das ganze Kinom - insbesondere bezogen auf die katalytischen Domänen - erfordert die Entwicklung von Proteinkinaseinhibitoren besonderes Augenmerk auf Selektivität.

Die diesbezüglichen Anforderungen an Kinasehemmer sind aber auch an das Krankheitsbild gebunden: Zur - oft lebenslangen - Behandlung chronischer Erkrankungen wird vor allem ein gutes Sicherheitsprofil mit minimalen Nebenwirkungen gewünscht, was Selektivität zur Priorität macht. Zur Behandlung von Tumoren dagegen werden auch schwerere Nebenwirkungen in Kauf genommen, wenn ausreichende Wirksamkeit bzw. Lebenszeitverlängerung gegeben sind; geringere Selektivität gegenüber anderen Kinasen kann hier sogar von Vorteil sein, da dies das Auftreten von Escape-Phänomenen und die Resistenzbildung mindert. Zudem muss eine Hemmung von off-Target Kinasen nicht zwingend dem Auftreten nicht tolerierbarer Nebenwirkungen einhergehen, was sich u.a. an der guten Verträglichkeit von Stoffen wie Imatinib⁴⁶ und dem verwandten Dasatinib⁴⁷ zeigt.

1.6.1 Klassifizierung der Kinaseinhibitoren

Niedermolekulare Proteinkinaseinhibitoren lassen sich, abhängig von ihrem Bindemodus und den adressierten Abschnitten der Kinase, in verschiedene Klassen unterteilen:

Die sogenannten **Typ I Inhibitoren** binden die Kinase in der DFG-in Konformation, also im aktiven Zustand. Sie sind dabei ATP-kompetitiv und ähneln strukturell oft dem Adenin. Gemein ist ihnen die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Hinge Region, doch auch weitere Regionen können adressiert werden. Der Aufbau der ATP-Bindetasche ist über das Kinom hinweg im Allgemeinen recht konserviert. Um Selektivität gegenüber off-target Kinasen zu erzielen ist die Adressierung weniger konstanter Elemente, z.B. der Gatekeeper-Region, nötig. Typ I Inhibitoren stellen die größte Gruppe der entwickelten Kinasehemmer dar.

Typ II Inhibitoren binden die inaktive, „DFG-out“, Konformation der Kinase. Während dieser Konformation ist durch den „herausgedrehten“ Zustand des Aspartatrests zusätzlich noch die hydrophobe Deep Pocket zugänglich, wodurch ein Selektivitätsgewinn erzielbar ist. Der Bindemodus ist wie beim Typ I ATP-kompetitiv, durch die niedrigere Affinität der meisten inaktiven Kinasen zu ATP ist dieses aber leichter verdrängbar. Ein gerade für den onkologischen Bereich relevanter Nachteil der Typ II Inhibitoren ist die höhere Wahrscheinlichkeit zur Resistenzbildung: Mutationen in der Deep Pocket führen im Gegensatz zu jenen in der ATP-Bindungstasche seltener zum Funktionsverlust der Kinase. Es kann zur Entstehung einer noch immer katalytisch

aktiven Mutante kommen, die nur schlecht vom bisher eingesetzten Inhibitor gebunden wird.

Eine Zwischenform stellen **Typ 1.5 Inhibitoren** dar. Sie binden wie die Inhibitoren des Typ I in der DFG-in Konformation, allerdings im inaktiven Zustand der Kinase. Im Gegensatz zu Typ I Inhibitoren wird die vom Gatekeeper-Rest blockierte, hydrophobe Back Pocket adressiert. Durch Interaktion mit einem Glutamat der α C-Helix wird ein Konformationswechsel („ α C-Helix out“) erzwungen, der mit katalytischer Aktivität nicht vereinbar ist.

Typ III Inhibitoren binden ungleich der vorigen Typen nicht ATP-kompetitiv, sondern allosterisch neben der ATP-Bindungstasche. Dabei kann noch immer die Deep Pocket von ihnen belegt werden. Sie stabilisieren dabei die inaktive DFG-out Konformation der Kinase. Ein gezieltes Design allosterischer Inhibitoren ist schwierig und es handelt sich oft um Zufallsentdeckungen, da die adressierbaren Bereiche außerhalb der katalytischen Domäne weniger gut erforscht sind. Von Vorteil ist dagegen, dass diese Bereiche i. d. R. weniger konserviert sind, was Hemmstoffe dieser Art sehr selektiv gegenüber anderen Kinasen macht.

Die Unterteilung wurde später noch um **Typ IV-VI** erweitert: Dabei werden allosterische Inhibitoren, die nicht nahe der ATP-Bindungstasche binden, zu den **Typ IV Inhibitoren** gezählt (im Gegensatz zu den unmittelbar neben dieser Tasche bindenden Typ III Inhibitoren). Auch sie stabilisieren dabei die inaktive Konformation der Kinase. **Typ V Inhibitoren** sind bivalenter Natur, oft mit einem für den optimalen Abstand sorgenden Spacer, und adressieren mehrere Regionen der Kinase gleichzeitig. Sie können dabei entweder rein allosterisch binden, oder allosterisch mit dem einem, ATP-kompetitiv mit dem anderen Teil des Liganden. Zu guter Letzt umfasst die Klasse der **Typ VI Inhibitoren** grundsätzlich alle kovalent bindenden Substanzen, ungeachtet der adressierten Region.^{4,6,48,49} Auf diese soll im Folgenden noch detaillierter eingegangen werden.

1.6.2 Kovalente Inhibitoren

Neben der Unterscheidung zwischen innerhalb und außerhalb der ATP-Bindetasche bindenden Inhibitoren lässt sich noch eine Einteilung anhand des Bindemodus treffen: Man spricht von *reversibel* bzw. *nicht-kovalent*, *kovalent-irreversibel* und *kovalent-reversibel* bindenden Inhibitoren.

Nicht-kovalent bindende Inhibitoren (s.o.) gehen rein reversible Wechselwirkungen mit dem Ziel-Protein ein, z.B. die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Hinge-Region einer Kinase oder hydrophobe Wechselwirkungen mit dem unpolaren Rückgrat einer Bindetasche. Sie konkurrieren demnach stets mit dem in hoher Konzentration vorhandenen ATP.

Kovalent bindende Inhibitoren gehen i. d. R. zunächst ebenfalls reversible Wechselwirkungen mit der Kinase ein. Sie bilden aber zusätzlich feste Bindungen zu ausreichend reaktiven (nukleophilen) Resten von Aminosäuren, z.B. der Thiolgruppe des Cysteins, aus. Dadurch sind sie nur noch schwer durch ATP aus ihrer Bindung verdrängbar und hemmen die Kinase langfristig, sodass diese zur Wiederaufnahme der

Signaltransduktion erst wieder resynthetisiert werden muss.⁵⁰ Ein Nachteil ist die Möglichkeit der Reaktion mit Nucleophilen außerhalb des Zielproteins.

Ein stark reaktives Molekül steigert demnach die Chance auf unspezifische Nebenreaktionen und das Risiko der Haptisierung. Letztere ist z.B. auch bei der Klasse der β -Lactame bekannt und führt zu mitunter lebensgefährlichen allergischen Reaktionen. Auch die Depletion der Glutathion-Vorräte einer Zelle, was zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativem Stress führt, kann Folge zu reaktiver Gruppierungen sein. Es ist demnach ratsam, eine weniger reaktionsfreudige Gruppierung zu verwenden, die erst nach Koordination des Inhibitors in die ATP-Bindetasche eine Bindung zum Ziel-Nucleophil eingeht.⁴⁴

Die für die Ausbildung der kovalenten Bindung verantwortlichen (i. d. R. elektrophilen) Organyle eines Inhibitors werden geläufig auch als „Warheads“ bezeichnet, je nach Kontext auch das gesamte Molekül. Es stehen verschiedene Elektrophile zur Verfügung, die sich auch in ihrer Reaktivität gegenüber nucleophilen Aminosäureresten unterscheiden. Mögliche Warheads sind u.a. α -Halogen-carbonyl, Epoxide und eine Reihe α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen wie Acrylester, Acrylamide, Cyanacrylamide sowie Vinylsulfonamide.⁵⁰ Im Falle der α,β -ungesättigten Carbonyl geht das Nucleophil eine Michael-Addition mit dem ungesättigten β -Kohlenstoff ein:

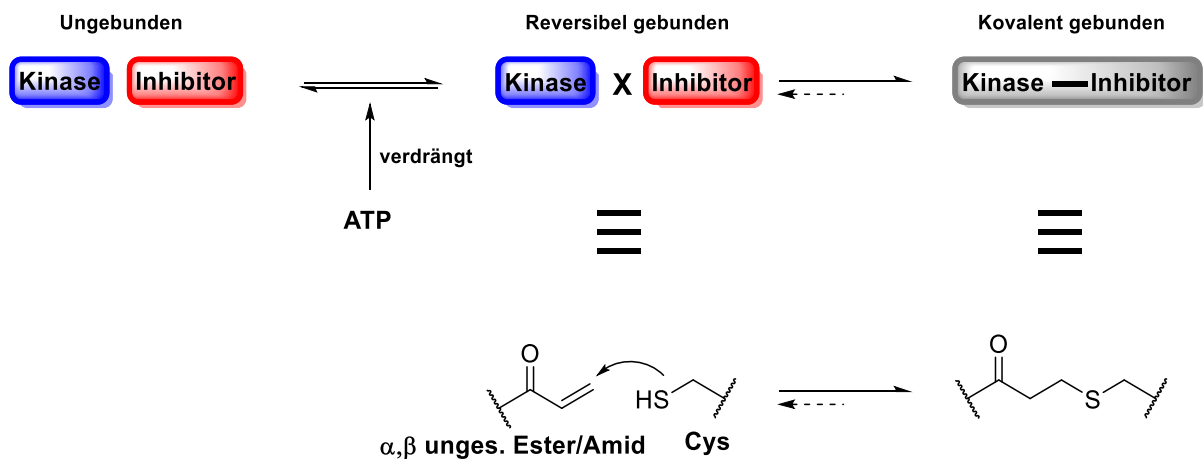


Abbildung 1.6: Verlauf der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Protein und Inhibitor. Zunächst wird der Inhibitor durch nicht-kovalente Wechselwirkungen reversibel gebunden und konkurriert dabei mit ATP. Durch nucleophilen Angriff am elektrophilen Warhead, hier durch das Thiol eines Cysteins, wird eine kovalente Bindung zum Protein ausgebildet. Im kovalent gebundenen Zustand ist der Inhibitor nicht mehr durch ATP verdrängbar. Im Falle kovalent-reversibler Inhibitoren kann es aber gegebenenfalls zur Rückreaktion kommen. Adaptiert nach Forster.⁴

Die Reaktivität des β -Kohlenstoffes hängt hierbei vom Aufbau der benachbarten Funktionen ab: Acrylester z.B. weisen im Vergleich zu Acrylamiden eine geringere Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff auf (aufgrund des stärkeren +M-Effekts des Amidstickstoffes), was wiederum die positive Partialladung der β -Position steigert.

Häufig wird Cystein als Nucleophil adressiert, da das Thiol ein gutes Nucleophil für die gängigen verwendeten Elektrophile darstellt. In der Regel ist die Bindung nach ihrer Ausbildung unter zellulären Bedingungen nicht mehr reversibel.

Bei der JAK3 handelt es sich um das bereits erwähnte Cys909. Ein weiterer Vorteil in diesem speziellen Fall ist, dass sich an der äquivalenten Position bei den anderen Isoenzymen der JAK-Familie ein (weniger nukleophiles) Serin befindet; jedoch gibt es weitere Kinasen außerhalb der JAK-Familie, bei denen an vergleichbarer Position ein Cystein vorkommt.⁴⁵ Dementsprechend ist auch hier wünschenswert, dass der verwendete kovalente Inhibitor auch aufgrund anderer Strukturelemente möglichst selektiv und schon durch seinen reversiblen Bindemodus potent ist.

Bei den nicht-kovalent bindenden Inhibitoren liegt lediglich ein Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen, frei und reversibel gebunden, vor. Kovalent bindende Hemmstoffe durchlaufen dagegen zwei Stufen, da dem Ausbilden der kovalenten Bindung ebenfalls der reversibel gebundene Zustand vorgelagert ist (Abbildung 1.6). Anders gesagt ist, wie auch bei den nicht-kovalent bindenden Inhibitoren, zunächst die Verdrängung von ATP aus der Bindetasche nötig. Ist dieser Schritt einmal erreicht, kann nun die Michael-Addition an das reaktive Cystein erfolgen. Nach kovalenter Bindung des Inhibitors ist dieser nicht mehr durch ATP verdrängbar und bleibt, wie bereits erwähnt, üblicherweise bis zum Abbau des Proteins gebunden.

Kovalent-reversible Inhibitoren sind Stoffe, deren Michael-Akzeptor in α -Position eine weitere elektronenziehende Gruppe aufweist, z.B. bei den α -Cyanacrylamiden: Das α -ständige Nitril sorgt für einen zusätzlichen Elektronenentzug am α -Kohlenstoff.⁵¹ Das dort nach der Michael-Addition befindliche Proton wird dadurch in seiner Azidität derart gesteigert (ca. 10-fach im Vergleich zu Elektrophilen mit nur einer solchen Gruppe),⁵² dass es unter den gegebenen Bedingungen auch wieder abstrahiert werden kann. Die Folge ist die Auflösung der Thioetherbindung über einen E1cb Mechanismus und somit die Rückreaktion zum ungesättigten Inhibitor (**Abbildung 1.7**).⁵³

Die kovalente Bindung bleibt aber i. d. R. erhalten, solange das Inhibitormolekül durch seine Wechselwirkungen mit der ATP-Bindetasche auch anderweitig ausreichend stabilisiert wird. Erst nach Verlust der Tertiärstruktur (z.B. Verdau durch Proteasomen) wird der Hemmstoff wieder frei.^{51,52}

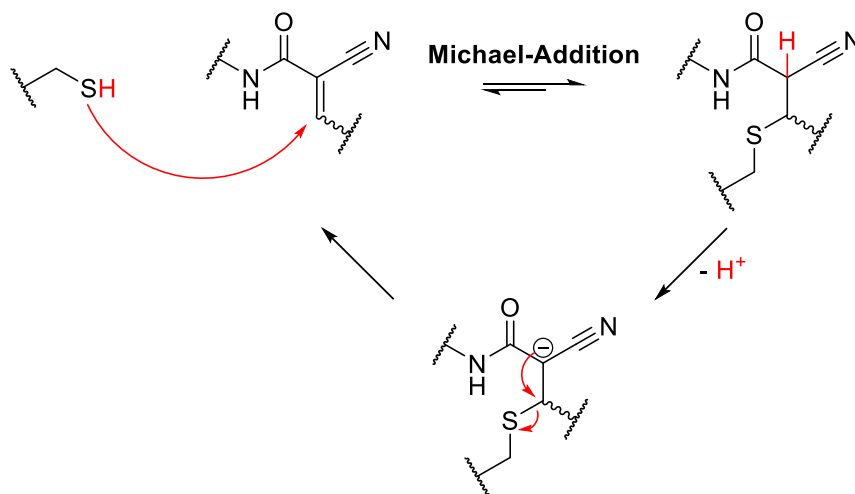


Abbildung 1.7: Darstellung der reversiblen Michael-Addition eines Thiols an den elektrophilen β -Kohlenstoff eines Cyanacrylamids. Nach Ausbildung der kovalenten Bindung kann es durch Deprotonierung am α -Kohlenstoff zur Rückreaktion über einen E1cb-Mechanismus kommen.

Die postulierten Vorteile des kovalent-reversiblen Bindemodus sind u.a. eine verlängerte Wirksamkeit der Stoffe nach Verabreichung, da die nach Abbau der Kinase wieder „regenerierten“ Inhibitoren wieder erneut zur Bindung zur Verfügung stehen. Zudem ist anzunehmen, dass die Möglichkeit zur Rückreaktion das Risiko der Haptisierung und allergisch bedingter Nebenwirkungen senkt, da bei off-target Bindung außerhalb der Ziel-Bindetasche das Ausmaß stabilisierender Wechselwirkungen deutlich geringer ist.⁴⁴

1.6.3 Zugelassene niedermolekulare JAK-Inhibitoren

Die Bedeutung der verschiedenen JAK-STAT Signalwege für Zellwachstum, Reifung, Überleben und weitere zelluläre Funktionen macht sie zu vielversprechenden Zielen zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheitsbildern. Die überwiegende Mehrheit davon liegt im onkologischen oder immunologischen Bereich, was angesichts der den JAKs zugehörigen Rezeptoren nicht überraschend ist.

Die Therapie mit JAK-Hemmern zielt darauf ab, die Aktivität der JAKs nur in solch einem Maße (reversibel) zu senken, wie es für den therapeutischen Erfolg nötig ist. Eine komplette Signalblockade wäre unerwünscht und würde zu schwerwiegenden Folgen, u.a. Blutbildveränderungen und Immundefizienz führen. (s. **1.4**) Ein Vorteil der JAK-Inhibition gegenüber der Blockade eines spezifischen Zytokins durch Biologicals ist die bessere Steuerbarkeit durch kürzere biologische Halbwertszeiten und schnellere „on-/off“-Effekte.²³

Inzwischen haben es mehrere JAK-Hemmer aus der klinischen Prüfungsphase auf den Markt geschafft, weitere befinden sich in (prä-)klinischer Entwicklung. Eine Auswahl an von der EMA oder anderen Agenturen zugelassenen niedermolekularen JAK-Inhibitoren (**Abbildung 1.8**) soll nun kurz vorgestellt werden.

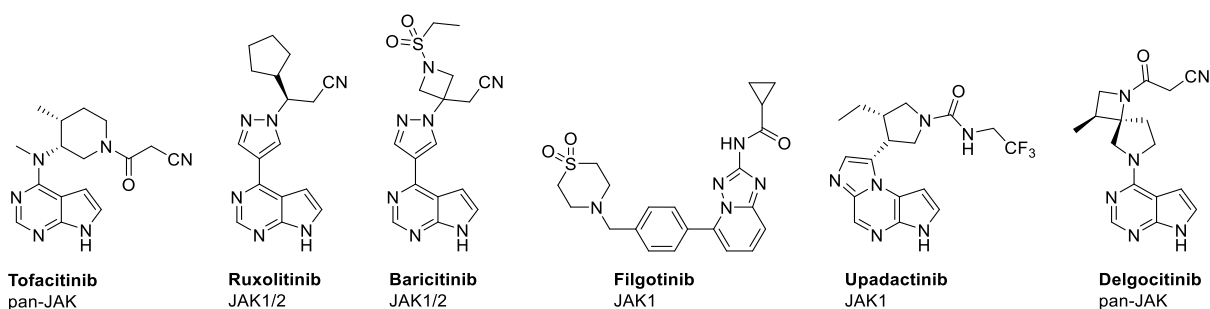


Abbildung 1.8: Strukturen und Selektivitäten diverser von der EMA, FDA oder anderen Agenturen zugelassener JAK-Hemmer.

Ruxolitinib wurde als erster Stoff seiner Klasse 2012 in Europa zugelassen. Es hemmt selektiv die JAK1 und JAK2 und wird zur Behandlung der Polycythemia Vera, Myelofibrose, Graft-versus-Host-Reaktionen sowie topisch bei Atopischer Dermatitis verwendet.^{54,55}

Das ebenfalls JAK1/2-selektive **Baricitinib** wurde 2017 von der EMA als Zweitlinientherapie für Rheumatoide Arthritis (RA) zugelassen (entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Methotrexat). Inzwischen erfolgte auch eine Zulassung bei Atopischer Dermatitis. Sowohl Baricitinib als auch das strukturell eng verwandte Ruxolitinib werden auch bei Patienten mit schweren COVID-19-Verläufen, die oft mit einem Zytokinsturm einhergehen, eingesetzt.^{56,57}

Filgotinib gehört zu den für die JAK1 selektiven Vertretern der Substanzklasse, mit ca. 30-fach geringerer Inhibition der JAK2. Es zeigte in klinischen Studien zur Behandlung der RA gute Wirksamkeit und erhielt Ende 2020 in Europa und Japan die Zulassung für diesen Einsatzbereich.⁵⁸

Das ebenfalls JAK1-selektive **Upadacitinib** zeigt Wirksamkeit bei RA, Psoriasis-Arthritis, Atopischer Dermatitis und Morbus Bechterew, die Zulassung wurde Ende 2019 von der EMA erteilt.⁵⁹ Der Erfolg der Substanz bei diesen Anwendungsgebieten spricht dafür, dass eine selektive Hemmung der JAK1 zur Behandlung bestimmter autoinflammatorischer Krankheitsbilder auszureichen scheint.

Delgocitinib ist, ähnlich dem Tofacitinib, als pan-JAK-Inhibitor zu bezeichnen. Es wird als Topikum gegen Atopische Dermatitis verwendet.⁶⁰ Bisher erfolgte die Zulassung erst in Japan.

1.6.4 Tofacitinib

Da **Tofacitinib** im Rahmen dieser Arbeit für mehrere Experimente als Vergleichssubstanz eingesetzt wurde, soll nun näher darauf eingegangen werden. Tofacitinib gehört zur ersten Generation der klinisch eingesetzten JAK-Inhibitoren und wurde 2017 von der EMA für die Behandlung von RA und Psoriasis-Arthritis zugelassen. Später wurde die Zulassung noch auf die Anwendung bei Colitis Ulcerosa erweitert. Zunächst wurde der Stoff als selektiver Inhibitor der JAK3 beschrieben, stellte sich aber inzwischen als pan-JAK Inhibitor mit gewisser Präferenz für JAK1 ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$) und JAK3 ($IC_{50} = 55 \text{ nM}$) heraus. Tofacitinib verfügt über gute Selektivität gegenüber Kinasen außerhalb der JAK-Familie.^{61–64} Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der freien Base wird Tofacitinib üblicherweise als Citratsalz verwendet.

Das Nebenwirkungsprofil von Tofacitinib lässt sich vor allem über seinen Wirkmechanismus begründen. Unter anderem sind Veränderungen des Blutbildes typisch: Durch Inhibition der JAK2, die unter anderem am Signalling von GM-CSF, Thrombopoietin und Erythropoetin beteiligt ist, kann es jeweils zu Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie kommen. Die JAK1/3-Blockade wiederum führt potentiell zum Abfall der NK-Zellzahlen. Die hämatologischen Änderungen können sowohl transient als auch für die Dauer der Behandlung auftreten.⁶⁵ Aus der Langzeitbeobachtung nach der Zulassung gingen zudem ein erhöhtes Auftreten an malignen Tumoren und kardiovaskulären Komplikationen hervor.^{66–68} Ersteres lässt sich durch die Immunsuppression erklären, da die Abtötung entarteter Zellen durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen eingeschränkt wird. Die kardiovaskulären Ereignisse sind schwerer einer einzelnen Ursache zuzuordnen; da diese aber auch bei Baricitinib und Upadacitinib beobachtet wurden^{69,70} ist anzunehmen, dass die JAK1-Blockade eine Rolle spielt.

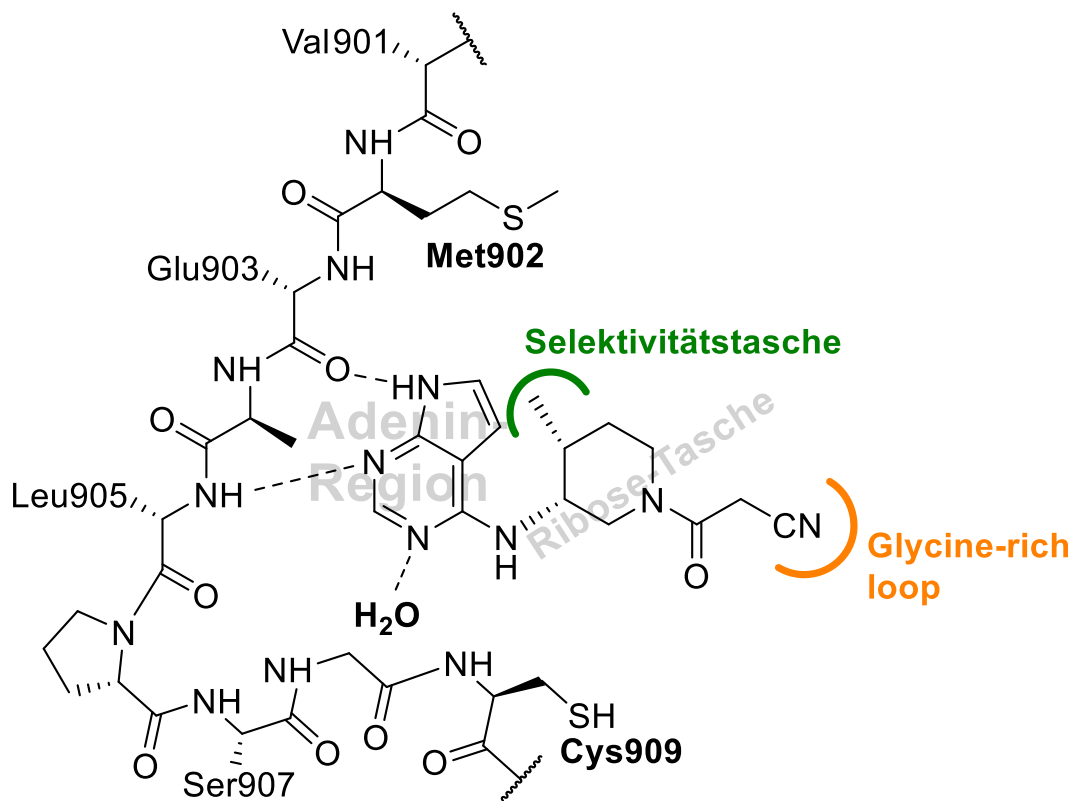


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Interaktionen von Tofacitinib mit der ATP-Bindetasche. Über den heteroaromatischen, ATP-mimierenden Kern werden zwei H-Brücken zur Hinge-Region (über Glu903, Leu905) sowie eine weitere zu einem Wassermolekül ausgebildet. Die Ribose-Tasche wird von der Piperidin-Seitenkette ausgefüllt und eine Methylgruppe belegt die JAK-Selektivitätstasche (grün). Zuletzt wird der P-loop (orange) vom Nitril des Cyanacetamids adressiert. Adaptiert nach Michael Forster.⁴

Tofacitinib ist den Typ-I Inhibitoren zuzuordnen. Sein Bindemodus in der ATP-Bindungstasche ist in **Abbildung 1.9** dargestellt. Wie bei vielen niedermolekularen Kinaseinhibitoren bildet das heteroaromatische Rückgrat von Tofacitinib zwei Wasserstoffbrücken zur Hinge-Region (zu E903 und L905) aus. Eine weitere Wasserstoffbrücke geht vom N3 zu einem in der Hydrophoben Region II befindlichen Wassermolekül aus. Die in der Gegenrichtung befindliche - vom voluminösen Gatekeeper-Rest M902 blockierte - Hydrophobe Region I wird nicht adressiert. Die über eine Aminogruppe mit dem Kern verbundene Piperidiny-Seitenkette ist in der Ribosetasche lokalisiert, wodurch das Nitril des Cyanacetamids mit dem P-Loop in Interaktion treten kann. Die Methylgruppe der Seitenkette sorgt zusätzlich noch für einen weiteren Selektivitätsgewinn gegenüber anderen Kinasefamilien: Die vier JAK-Kinasen verfügen über eine kleine Vertiefung an dieser Stelle, welche anderweitig im Kinom nicht vorzufinden ist. Eine Belegung erzielt Selektivität gegenüber nicht-JAK Kinasen, nicht aber innerhalb der Familie. Die „JAK-Selektivitätstasche“ kann nur durch das *3R*-, *4R*-Isomer von Tofacitinib adressiert werden, nicht von dessen anderen Stereoisomeren.^{4,43,71}

1.7 FM-381

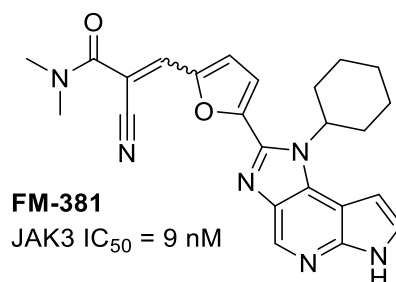


Abbildung 1.10: Struktur und JAK3-Hemmkonstante des niedermolekularen JAK3-Inhibitors **FM-381**, der für die in dieser Arbeit entwickelten Testverbindungen als Leit- und Referenzsubstanz diente.

Während der Doktorarbeit von Dr. Michael Forster wurde im Arbeitskreis Laufer der niedermolekulare JAK3-Inhibitor **FM-381** (**Abbildung 1.10**) entwickelt. Die Verbindung zeichnet sich durch exzellente Selektivität und *in vitro* Aktivität (s.u.) aus und diente als Leitsubstanz für die im Zuge dieser Doktorarbeit dargestellten Stoffe.

1.7.1 Bindemodus von FM-381 in der JAK3

Bei **FM-381** handelt es sich um einen Vertreter der 1,6-Dihydroimidazo[4,5-*d*]pyrrolo[2,3-*b*]pyridine, dessen (nicht-kovalenter) Bindemodus in der JAK3 bereits durch Röntgenkristallographie erfasst werden konnte. Die rigide trizyklische Struktur bildet über die Stickstoffe des Pyrrolo[2,3-*b*]pyridins Wasserstoffbrücken zur Hinge Region (**Abbildung 1.11**). Am in Position 6 befindlichen Imidazol-Stickstoff befindet sich ein Cyclohexyl-Rest, der in Richtung der JAK-Selektivitätstasche ausgerichtet ist. Der andere Imidazol-Stickstoff (N3) bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül aus.

Über einen Furyl-linker wird der Michael-Akzeptor, ein Cyanoacrylamid, nahe dem Ziel-Nukleophil Cys909 platziert. Die Nitril-Gruppe wechselwirkt mit R911 und R953, wodurch die bereits erwähnte Arginin-Tasche zugänglich wird. Die eigens hierdurch induzierte Tasche „umschließt“ das Nitril. Da die dortige Sequenz zwar innerhalb der JAK-Familien recht konserviert ist, nicht aber unter den restlichen Kinasen mit äquivalent positionierten Cysteinen, führt deren Adressierung zu einem weiteren Selektivitätsgewinn gegenüber nicht-JAK Kinasen. Tatsächlich kann hierdurch aber selbst innerhalb der JAK-Familie an Selektivität für JAK3 gewonnen werden, wie durch Tests verwandter Substanzen im Rahmen von Michael Forsters Arbeit gezeigt wurde. Es wird postuliert, dass die Öffnung und Besetzung der Arginin-Tasche einen positiven Beitrag zur kovalenten Bindungsbildung zu C909 leistet, da die vorher nötige Positionierung bzw. Stabilisierung des Warheads verbessert wird.

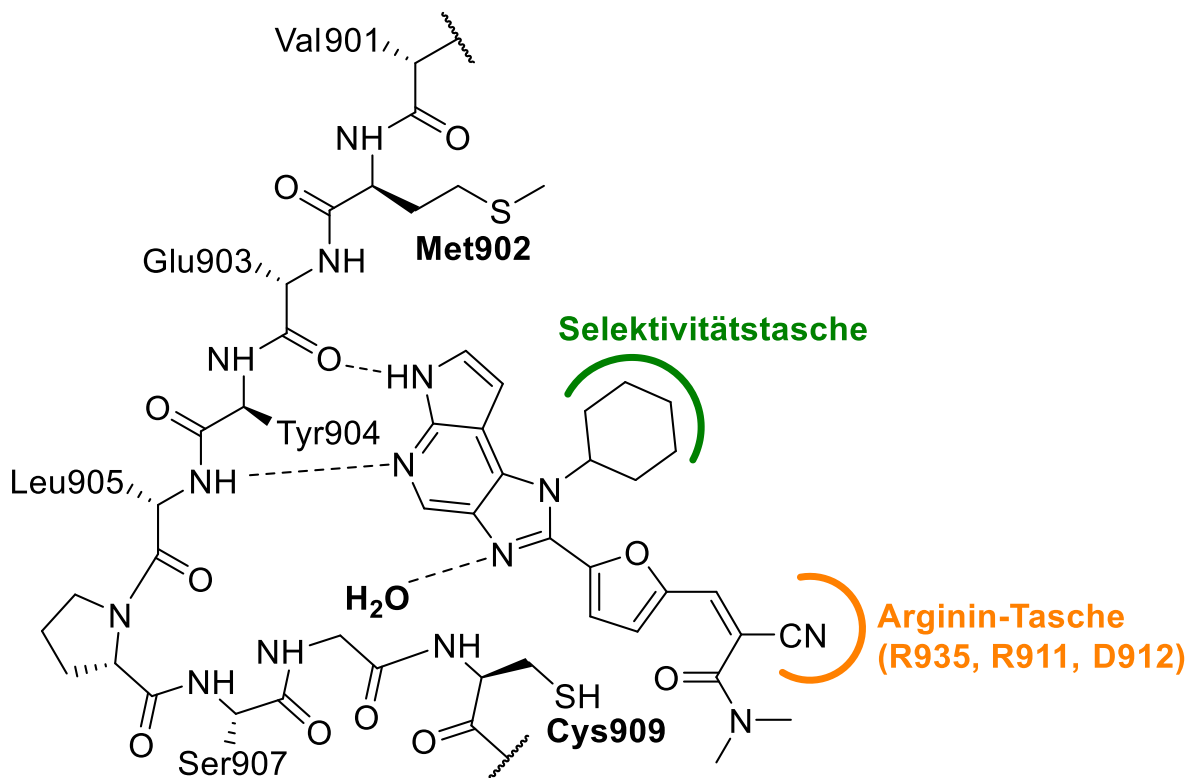


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung des reversiblen Bindemodus von **FM-381**. Wie bei Tofacitinib werden über den heteroaromatischen Core zwei H-Brücken zur hinge region aufgebaut (Glu903, Leu905), sowie eine weitere zu einem gebundenen Wassermolekül. Über Wechselwirkungen der Nitrilgruppe am Warhead mit Arg953 und Arg911 wird die Arginin-Tasche (orange) zugänglich. Adaptiert nach Michael Forster.⁴

Der vermutete kovalente Bindemodus von **FM-381** konnte röntgenkristallographisch nicht nachgewiesen werden. Dies gelang jedoch für eine strukturell eng verwandte Substanz, die in Position 2 der Cyclohexyl-Seitenkette noch einen (die JAK-Selektivitätstasche besetzenden) Methylrest aufweist. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit wird davon ausgegangen, dass der kovalente bzw. kovalent-reversible Bindemodus an Cys909 auch für andere Vertreter dieser Substanzklasse möglich ist.⁴

1.7.2 Aktivität und Selektivität

FM-381 verfügt über hohe *in vitro* Potenz: Gegen die isolierte JAK3 beträgt die IC_{50} im ELISA 9 ± 1 nM. Auch auf zellulärer Ebene zeigt **FM-381** beachtliche Aktivität: Im nanoBRET-Assay, der an anderer Stelle detaillierter beschrieben werden soll, beträgt die JAK3 EC_{50} in HeLa Zellen 168 nM.⁷²

In einem weiteren Testverfahren wurden zudem menschliche $CD4^+$ T-Zellen mit **FM-381** inkubiert, mit den JAK-abhängigen Zytokinen IL2, IL4, IL6 oder $IFN-\alpha$ stimuliert und anschließend die Auswirkungen auf die STAT-Phosphorylierung per Western-Blot untersucht. Dabei wurde eine potente Inhibition der IL-2 bzw. IL-4 abhängigen Signalwege, an deren zugehörige Rezeptoren JAK1 und JAK3 assoziieren, festgestellt. Gezeigt wurde hierbei auch, dass auch ein JAK3-selektiver Hemmstoff in der Lage ist, den JAK1/3-abhängigen Signalweg ausreichend zu inhibieren.^{45,72}

Die Selektivität von **FM-381** wurde sowohl innerhalb der JAK-Familie in einem radiometrischen Assay untersucht, als auch gegenüber dem Großteil des bekannten Kinoms. In Ersterem zeigte die Substanz eine etwa 400-fach geringere Aktivität gegen JAK1 im Vergleich zu JAK3 und noch höheren Abfall der Potenz gegenüber JAK2 und TYK2. Da die JAK3 eine höhere ATP-Affinität aufweist als ihre Isoenzyme, wurde der radiometrische Assay zusätzlich ein weiteres Mal bei einer erhöhten, den realen Bedingungen eher entsprechenden ATP-Konzentration von 200 μM (statt 10 μM) durchgeführt. Dies führt (aufgrund der unterschiedlichen ATP-Affinitäten der JAKs) üblicherweise zu einer Veränderung der Selektivitäten. Auch unter diesen Bedingungen wurde die Selektivität gegenüber den anderen Isozymen beibehalten und eine über 330-fache Selektivität gegenüber JAK1 ermittelt.⁷²

In einem 410 Kinasen umfassenden Assay (Kinase 410-Profiler, ProQinase) zeigte **FM-381** bei einer Konzentration von 100 nM nur gegen JAK3 Aktivität. Bei 500 nM wurden lediglich 11 weitere Kinasen in relevantem Ausmaß (Restaktivität < 50 %) inhibiert. Zudem war keine dieser Kinasen mit einem JAK3 äquivalenten Cysteinrest nahe der ATP-Bindungstasche ausgestattet.

Auf zellulärer Ebene wurde die Selektivität für JAK3 über andere JAKs im bereits weiter oben erwähnten CD4⁺ T-Zell Assay gezeigt: Während die JAK1/JAK3-abhängigen Phosphorylierungen von STAT5 bzw. STAT6 (Stimulus IL-2 bzw. IL-4) schon mit nanomolaren Konzentrationen unterbunden wurden, wurde dies bei STAT1 bzw. STAT3 nicht beobachtet. Im Falle des STAT1-Blots wurde mit IFN α stimuliert, dessen Rezeptor das Signal über JAK1/TYK2 transduziert. Der Stimulus für STAT3 war IL-6, welches über JAK1, JAK2 und TYK2 ins Zellinnere signalisiert. Somit wurden hier durch **FM-381** zwar die JAK3 involvierenden Signalwege gehemmt, nicht aber die JAK3-unabhängigen.⁴⁵

Die Stabilität von **FM-381** wurde bereits *in vitro* sowohl in menschlichem Vollblut als auch in murinen Lebermikrosomen (MLM) untersucht. Im Vollblut zeigte der Stoff eine adäquate Stabilität: Nach 3 h Inkubation konnten immer noch ca. 50 % der unveränderten Substanz detektiert werden. Die Stabilität in MLM war geringfügig höher, nach 3 h waren noch ca. 58 % des eingesetzten **FM-381** intakt. Die per MS detektierten Massen der Metaboliten ließen auf Desalkylierung der Amid-Substituenten oder der Cyclohexylgruppe, Hydroxylierungen sowie Hydrolyse des Nitrils schließen.⁴⁵

Aufgrund des exzellenten Selektivitätsprofils sowohl in enzymatischen als auch zellulären Assays sowie hoher Potenz stellt **FM-381** einen ausgezeichneten Stoff zur Erforschung der biologischen Rolle der JAK3 dar. Er wurde in den Bestand des Structural Genomics Consortium aufgenommen, einer Organisation zur Erforschung noch nicht vollständig erfasster Signalwege und potentieller therapeutischer Targets. Des Weiteren wurde **FM-381** vom Chemical Probe Portal als „4-Star-Probe“ - die Höchstwertung - eingestuft. Die gute *in vitro* Stabilität lässt zudem darauf hoffen, dass es sich nicht nur um ein hervorragendes *in vitro* Werkzeug handelt, sondern dass der Stoff auch für *in vivo* Wirksamkeitsstudien gut geeignet ist.

Eine Hürde der Substanz für die praktische Anwendung ist die geringe Löslichkeit: Bei einem pH von 7,4 löst sich **FM-381** gerade einmal zu 24 mg/L.⁷² Zum einen kann dies die Verabreichung bei *in vivo* Studien erschweren: Während eine p.o. Gabe zwar noch als Suspension oder in leicht angesäuerter Lösung denkbar ist, sind die Anforderungen

an eine i.v. Gabe höher. Der Stoff muss gelöst vorliegen, weswegen eine Beschränkung auf niedrige Konzentrationen oder die Beimischung geringer, noch tolerabler Mengen an organischen Lösemitteln nötig ist. Zum anderen kann die geringe Löslichkeit auch die Handhabung bei *in vitro* Experimenten verkomplizieren, wenn höhere Konzentrationen des Stoffes während eines Assays ausfallen.

Zum Zeitpunkt der Themenvergabe waren zudem noch keinerlei *in vivo* Studien mit **FM-381** veröffentlicht worden, demnach war auch die Pharmakokinetik noch unbekannt. Für gute Wirksamkeit wären allerdings nicht nur eine ausreichende Stabilität und Potenz gewünscht, sondern ebenso eine gute (orale) Bioverfügbarkeit sowie ein günstiges Verteilungsprofil im Körper.

Unter diesen Gesichtspunkten wurde **FM-381** als Leitsubstanz für diese Arbeit ausgewählt, mit dem Ziel seine *in vivo* Eigenschaften zu erforschen und gegebenenfalls durch Derivatisierung noch weiter zu optimieren. Durch die nachweislich herausragende Selektivität und *in vitro* Aktivität eignet es sich zudem bestens als Vergleichssubstanz für alle darauf basierten neuen Stoffe.

1.8 Azithromycin

Azithromycin gehört zur Klasse der Makrolidantibiotika und wurde erstmals 1980 von Pliva beschrieben. Die Struktur mit der im Folgenden verwendeten Zählweise ist in **Abbildung 1.12** abgebildet. Azithromycin verfügt über einen fünfzehngliedrigen Lacton-Ring, an den zwei Zucker glykosidisch gebunden sind: An Position 3 ein Cladinose-Molekül, an Position 5 ein Desosamin. Eine Besonderheit gegenüber den zuvor bekannten Makroliden ist die zwischen C9 und C10 eingeschobene Aminofunktion. Diese stellt eine semisynthetische Verbesserung des säurelabilen Vorgängers Erythromycin dar, welches am C9 eine Ketogruppe aufweist.

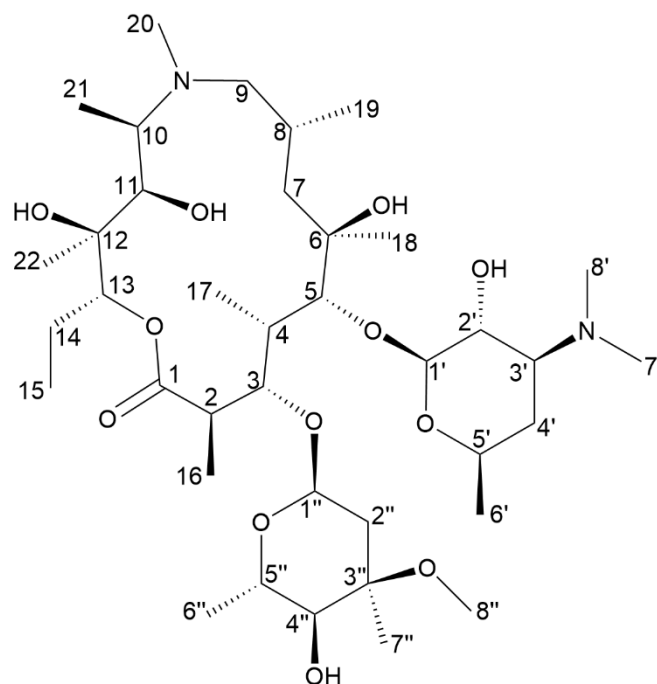


Abbildung 1.12: Struktur und Zählweise des Makrolid-Antibiotikums Azithromycin. Zwei Zuckerreste, Cladinose und Desosamin, sind jeweils über die 3- bzw. 5-Position des Lactons glykosidisch verknüpft.

Wie die anderen Vertreter seiner Klasse wirkt Azithromycin bakteriostatisch über Bindung an die 50S-Untereinheit bakterieller Ribosomen. Präziser ausgedrückt wird ein „Tunnel“ der Untereinheit durch das Makrolid blockiert. Die Folge ist eine Störung der Proteinbiosynthese, da der Translokationsschritt verhindert wird.^{73,74} Die Bindung an die Zielstruktur erfolgt durch Wechselwirkungen des Desosamin-Zuckers mit der ribosomalen RNA: Die 2' OH-Gruppe baut eine Wasserstoffbrückenbindung zum N1 von A2058 aus, der Stickstoff der an 3' Position befindlichen Dimethylaminogruppe wechselwirkt wiederum mit einem Wassermolekül, das seinerseits eine Wasserstoffbrücke zum primären Amin von A2058 sowie zu einem proximalen Phosphatrest von G2505 ausübt. Ein vor kurzem erschienener Bericht legt nahe, dass ein Faktor für bakterielle Resistenz gegenüber Makrolidantibiotika von der zweifachen Methylierung der erwähnten Aminogruppe von A2058 herrührt: Das nun tertiäre Amin kann nicht mehr als Donor für H-Brücken fungieren, wodurch die Koordination des Wassermoleküls gestört ist. Auch aus rein sterischen Gründen wird jenes verdrängt, wodurch sowohl der Dimethylaminogruppe des Desosamins als auch dem G2505 zugehörigen Phosphat der Wasserstoffbrücken-Donor fehlt.⁷⁵

Ein Nachteil des ersten entdeckten Makrolidantibiotikums, Erythromycin, ist dessen Instabilität gegenüber Magensäure (**Abbildung 1.13**). Unter aziden Bedingungen kommt es zunächst zur Ausbildung eines Halbacetals durch intramolekularen Angriff der 12-Hydroxygruppe an den Carbonylkohlenstoff. Durch eine weitere OH-Gruppe (Position 6) wird dann unter Abspaltung von Wasser ein Acetal ausgebildet, das nicht mehr ausreichend antibiotisch wirksame Anhydroerythromycin.⁷⁶ Um diesen Vorgang bei einer p.o. Behandlung zu vermeiden, sind magensaftresistente Schutzfilme nötig, die sich erst bei höherem pH, wie er distaler im GI-Trakt vorliegt, langsam lösen.

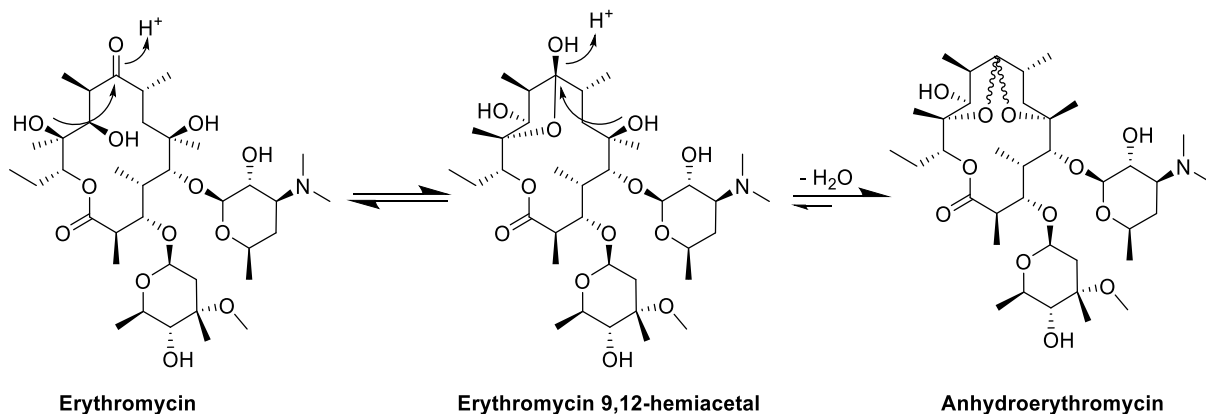


Abbildung 1.13: Instabilität von Erythromycin unter sauren Bedingungen. Es kommt zur säurekatalysierten intramolekularen Ausbildung eines Halbacetals, welches anschließend unter Abspaltung von Wasser vollständig acetalisiert. Das entstandene Produkt ist nicht mehr ausreichend antibiotisch wirksam.

Durch chemische Modifikation des Makrolidringes kann diese Problematik auf andere Art umgangen werden: So ist z.B. bei Clarithromycin (**Abbildung 1.14**) eine der an der Acetalbildung beteiligten OH-Gruppen methyliert, was dem Molekül so eine ausreichende Säurestabilität für eine orale Gabe ohne speziellen Überzug verleiht.

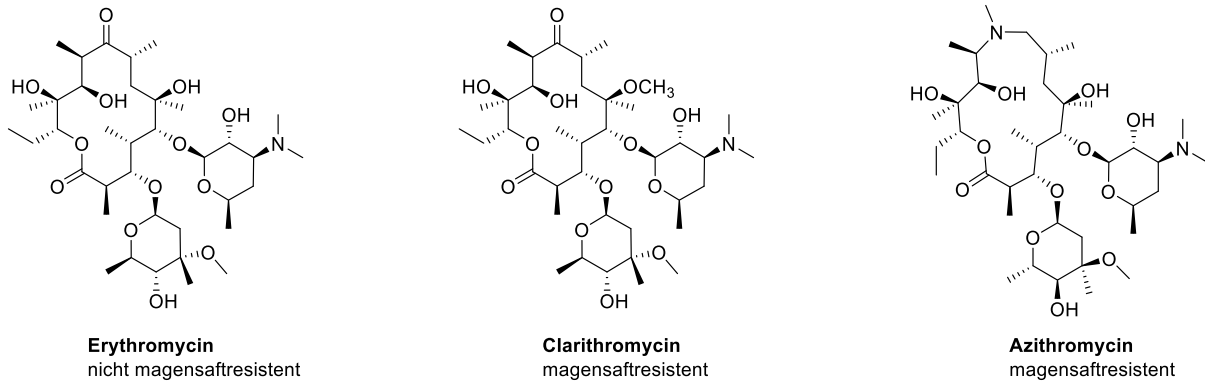
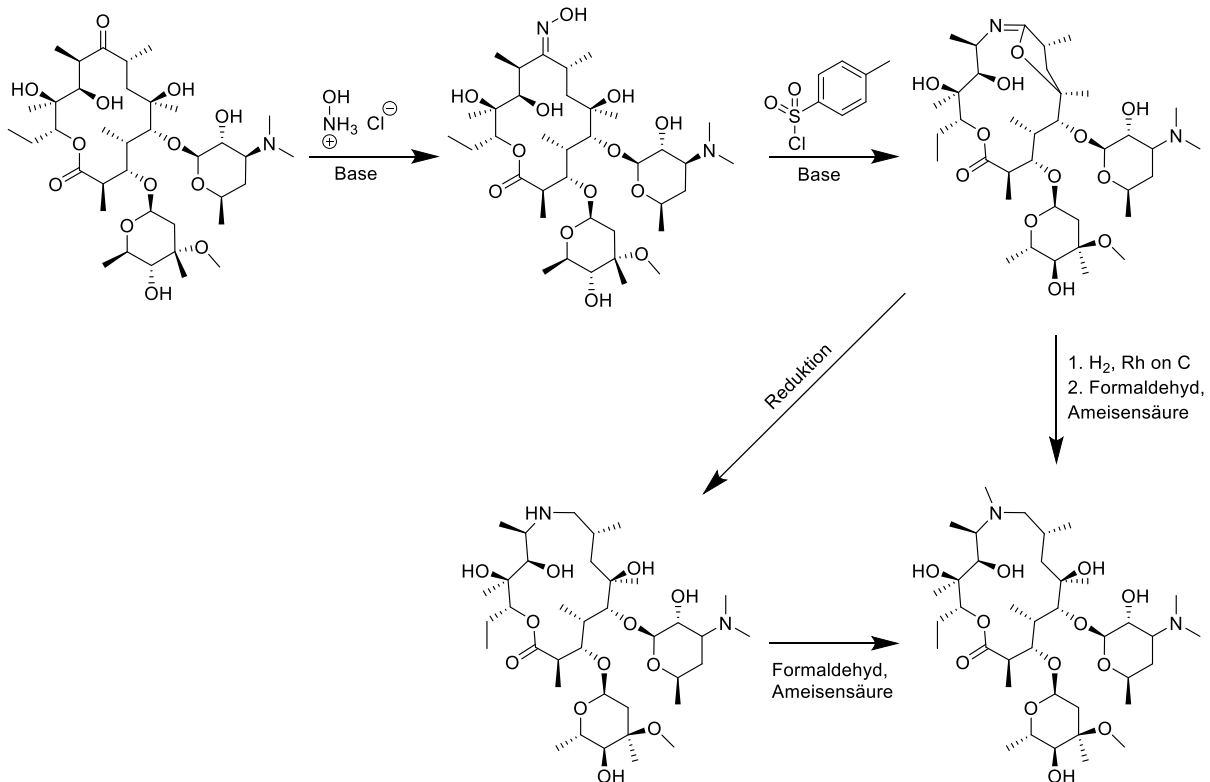


Abbildung 1.14: Erythromycin und zwei seiner weniger für Magensäure anfälligen Derivate, Clarithromycin und Azithromycin. Bei Clarithromycin wird die problematische Acetalbildung durch Methylierung der 6-OH-Gruppe verhindert, bei Azithromycin wurde die Ketogruppe entfernt und ein tertiäres Amin in den Makrocyclus eingeführt.

Beim Azithromycin dagegen wurde die an der Acetalbildung beteiligte Ketogruppe entfernt. **Schema 1.1** zeigt die partialsynthetische Herstellung aus Erythromycin.



Schema 1.1: Semisynthetische Herstellung von Azithromycin aus Erythromycin. Zunächst wird über Einsatz von Hydroxylamin das Keton zum Oxim umgesetzt. Über *p*-Tosylchlorid kommt es zu einer Variante der Beckmann-Umlagerung mit intramolekularem Ringschluss. Als letzte(r) Schritt(e) erfolgt die Reduktion der entstandenen Funktion mit anschließender Eschweiler-Clarke-Methylierung. Schema adaptiert nach Bakheit et al.⁷⁷

Während der Verlust der Ketogruppe Azithromycin ausreichend resistent gegenüber Magensäure macht, um eine Wirksamkeit bei oraler Gabe zu gewährleisten, kann man noch nicht von totaler Säurestabilität sprechen: Unter harschen sauren Bedingungen

kommt es zum Verlust der Cladinose (und der antibiotischen Wirkung) durch Spaltung der Etherbrücke zum 15-gliedringen Lacton. Im Vergleich zur bei Erythromycin stattfindenden säurebedingten Dehydrierung ist der Prozess aber deutlich langsamer. Bei der Acetalbildung liegt auch die Aktivierungsenergie deutlich niedriger (15.6 kcal/mol, für die Abspaltung des Zuckers dagegen 25.3 kcal/mol).⁷⁶

Ein weiterer Vorteil von Azithromycin gegenüber Erythromycin ist dessen geringere Affinität zu hERG-Kanälen, wodurch ein deutlich geringeres Risiko für die arzneibedingte Entstehung von Arrhythmien besteht. Dennoch besteht auch unter Azithromycin-Behandlung eine gewisse Gefahr des Auftretens von Torsade-de-Pointes Arrhythmien, insbesondere bei Patienten die weitere QT-Intervall verlängernde Wirkstoffe einnehmen oder andere Risikofaktoren aufweisen.^{78,79}

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Azithromycin, wie auch anderer Makrolide, sind mittlerweile sowohl beim Menschen als auch in diversen Tierspezies ausführlich erforscht. Sie zeichnen sich durch eine gute orale Bioverfügbarkeit, lange biologische Halbwertszeiten und eine starke Aufnahme in diverse Organe aus. Selbst nach Einmalgabe sind noch nach mehreren Tagen hohe Konzentrationen in Leber, Lunge, Nieren, Mandeln und Prostata messbar. Bedingt durch die hohe Verteilung in jene Gewebe sind die Plasmaspiegel vergleichsweise gering und fallen schneller ab. Durch langsame Rückverteilung von der Peripherie ins Plasma bleiben sie aber über längere Zeit stabil, was wahrscheinlich einen Beitrag zum beobachteten postantibiotischen Effekt leistet: Selbst nachdem die Plasmakonzentrationen die minimale Hemmkonzentration unterschritten haben ist die Vermehrung der Erreger noch für einen beträchtlichen Zeitraum gestört.^{80–82} Die lange Verweildauer im Körper wirkt sich auch günstig auf die Compliance der Patienten aus, das Einnahmeregime ist im Vergleich zu vielen anderen typischen Antibiotika recht simpel: Die übliche Dosis für unkomplizierte Infekte im ambulanten Bereich beträgt einmal täglich 500 mg über drei, in schwereren Verläufen über sechs Tage.

Ein weiterer Vorteil für die ambulante Anwendung ist das gegenüber den Vorgängern verminderte Potential für Wechselwirkungen. Azithromycin wird – im Gegensatz zu Clarithromycin und Erythromycin – nicht (bzw. in klinisch nicht relevantem Maß) von CYP3A4 verstoffwechselt, was das Risiko von Arzneimittelinteraktionen mindert.⁷⁸ Neben der antibiotischen Wirksamkeit wurden auch immunomodulatorische Effekte für Azithromycin festgestellt. Beispiele sind die Hemmung der Produktion bzw. Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF α und GM-CSF, Verminderung des Abbaus von Autophagosomen und eine Störung der STAT1-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu sind nach Azithromycin-Gabe erhöhte Spiegel an IL-10 zu beobachten. Diese zusätzlichen Effekte helfen u.a. im Kontext eines Infekts dabei, die Gewebeschädigung durch eine überschießende Immunantwort zu begrenzen, können aber auch bei anderen Krankheitsbildern von Nutzen sein: Diskutiert wird z.B. der Einsatz bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, oder auch bei schweren Verläufen von COVID-19, wo der vorliegende Zytokinsturm für Gerinnungsstörungen und Organschäden sorgen kann.^{83–85}

1.9 Makrolidbasierte Konjugatwirkstoffe

Die pharmakokinetischen Vorteile der Makrolide lassen sich durch chemische Konjugation auch auf andere Pharmakophore übertragen (**Abbildung 1.15**). So wurden makrolidbasierte „Carrier“ bereits erfolgreich mit pharmakologisch aktiven Warheads verknüpft, sodass diese ihre Wirkung - bei gleichzeitiger Verbesserung des PK-Profiles - beibehielten. Von besonderem Nutzen ist diese Methode verständlicherweise für antiinflammatorische Stoffe, da sich die Makrolide vor allem in entzündeten Geweben anreichern (siehe auch Kapitel **4.2.5**). Durch die erwähnten immunomodulatorischen Eigenschaften der Makrolide ist zudem ein synergistischer Effekt beider Bestandteile denkbar, gegeben dem Fall, dass pharmakologisch aktive Metaboliten gebildet werden.^{85–90}

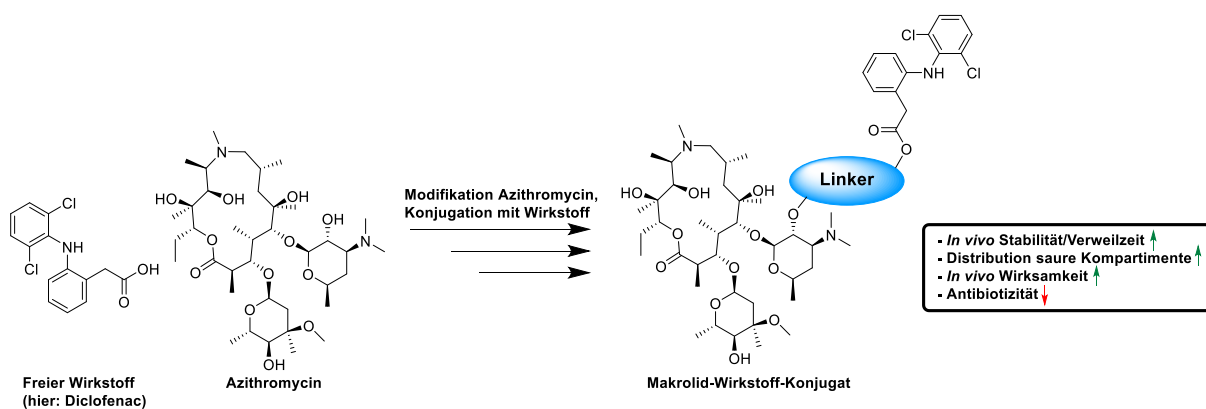


Abbildung 1.15: Schematische Darstellung der Konjugation von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen an makrolidbasierte Trägergerüste und die postulierten Vorteile (erhöhte Stabilität und Verweilzeit in vivo, Anreicherung in entzündetem, saurem Gewebe und dadurch insgesamt erhöhte antiinflammatorische Wirksamkeit) am Beispiel von Diclofenac. Die Verbindungen sind über die 2'-Position am Desosamin verknüpft worden. Detailliertere Beispiele sind in Kapitel **3.3** anhand der für diese Arbeit dargestellten Konjugate zu finden.

Eine antibiotische Wirkung der Konjugate dürfte aus bereits diskutierten mechanistischen Gründen nicht erwartet werden. Dies ist insofern auch erforderlich, damit es nicht zur unerwünschten Entstehung resistenter Bakterienstämme kommt, insbesondere bei der längerfristigen Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen.

Als Nachteil des Konzepts ist anzumerken, dass nur bestimmte Pharmakophore dafür zugänglich sind. Der sperrige Carrier darf die Bindung an das Zielprotein nicht behindern. Dementsprechend können nur für die Wirkung unkritische Gruppen des Warheads als Anknüpfungspunkt dienen, und selbst dann ist die Einführung eines Spacers ratsam. Das erhöhte Molekulargewicht erschwert auch die Adressierung bestimmter Gewebe, insbesondere die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke. Zu guter Letzt ist die Synthese der Konjugatwirkstoffe mit erhöhtem präparativen Aufwand verbunden und wirkt sich, aufgrund der zusätzlichen Reaktionsschritte, negativ auf die Gesamtausbeute aus. Dieser Umstand lässt sich aber in gewissem Maße wieder durch konvergente Synthese mildern, indem das zu verknüpfende Pharmakophor und der Carrier erst im letzten Schritt miteinander zur Reaktion gebracht werden.

2 Aufgabenstellung

Der bereits beschriebene selektive JAK3 Inhibitor **FM-381** stellt eine exzellente „*in vitro* Probe“ dar. Die Eignung des Stoffes für die *in vivo* Anwendung war zu Beginn dieser Arbeit aber noch weitestgehend unbekannt und unerforscht. Vor allem war **FM-381** bisher noch nicht auf pharmakokinetische Parameter wie Plasmastabilität, Verteilung und Bioverfügbarkeit untersucht worden. Es lagen auch noch keine Daten zur *in vivo* Wirksamkeit vor.

Die Aufgabenstellung war demnach wie folgt (s. auch **Abbildung 2.1**):

- Zum einen sollten die PK-Parameter von **FM-381** und strukturell verwandten Stoffen in Tiermodellen erfasst werden. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollten dann die Strukturen zum Erhalt von „*in vivo* Probes“ optimiert werden. Mit diesen sollte die bessere Erforschung der Rolle der JAK3 in diversen entzündlichen Prozessen und Krankheitsbildern ermöglicht werden.
- Zum zweiten war es ebenfalls ein Ziel, einen oder mehrere Kandidaten für den Einsatz in präklinischen Krankheitsmodellen zu entwickeln. Dafür sollte zunächst die allgemeine antiinflammatorische Potenz *in vitro*, später *in vivo*, in LPS-basierten Entzündungsmodellen erfasst werden. Anhand der daraus erhaltenen Daten sollten dann schließlich Kandidaten selektiert und in Tiermodellen entzündlicher Erkrankungen (z.B. Colitis, Multiple Sklerose) getestet werden.
- Und zum dritten bestand die Aufgabenstellung dieser Arbeit in der Etablierung einer robusten Syntheseroute für auf dem Makrolid-Antibiotikum Azithromycin basierte Carrier-Scaffolds. Diese sollten durch Konjugation mit den elektrophilen JAK-Warheads zur Verbesserung von Wirkstoffaufnahme, -verteilung und Plasmastabilität beitragen und ggf. (nach metabolischer Abspaltung) weitere immunomodulatorische Effekte ausüben. Insbesondere sollte durch die Konjugation auch die Anreicherung in Immunzellen gesteigert werden. Letzteres sollte durch geeignete analytische Verfahren überprüft werden.

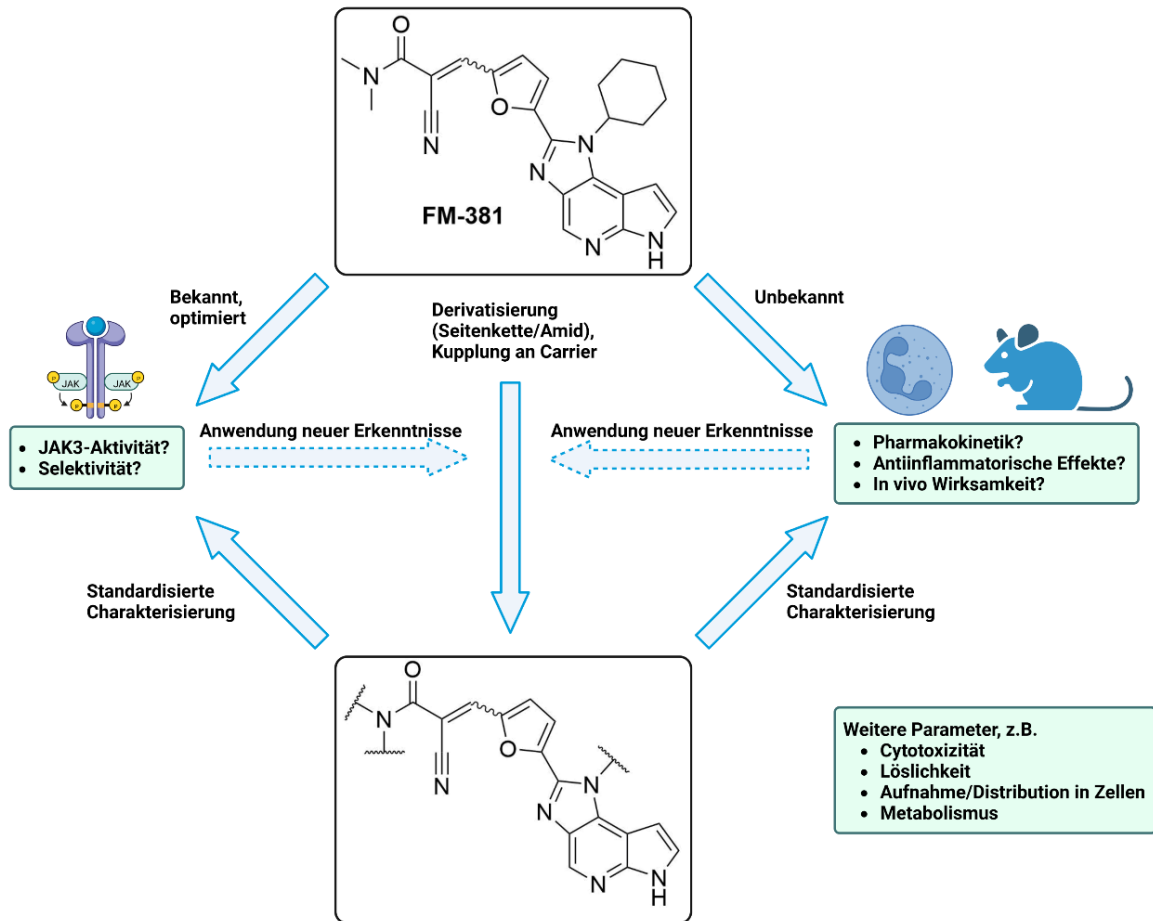


Abbildung 2.1: Schematische Zusammenfassung des Entwicklungsprozesses von Derivaten des JAK3-Inhibitors **FM-381** die für die in vivo Anwendung im präklinischen Bereich optimiert werden sollten. Zum Erhalt der hohen JAK3-Aktivität und –Selektivität wurde das Grundgerüst, insbesondere der Cys909 adressierende Michael-Akzeptor, belassen. Durch Variation der Reste am Cyanoacrylamid bzw. am Imidazol sollten Derivate mit erhöhter biologischer Stabilität und in vivo Wirksamkeit sowie auf bestimmte Anwendungsgebiete zugeschnittene Verteilungsmustern erhalten werden.

3 Chemischer Teil

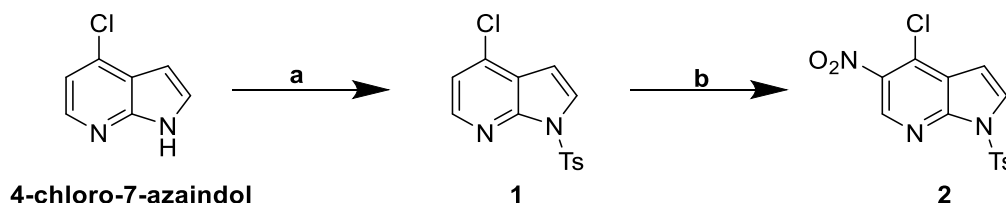
3.1 Synthese der JAK3-Inhibitoren vom Cyanacrylamid-Typ

Die Synthese von **FM-381** und verwandten Stoffen ist bereits im Zuge der Arbeit von Michael Forster entwickelt und beschrieben worden und wurde hier für die Darstellung der Testsubstanzen größtenteils übernommen. Da aber einige Anpassungen vorgenommen wurden, soll diese im Folgenden kurz erläutert werden:

3.1.1 Synthese von 4-Chlor-5-nitro-1-tosyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin

Als Ausgangsstoff für die Synthese der Testverbindungen diene 4-Chloro-7-azaindol. Der Azaindol-Kern ist für die Wechselwirkung zur Hinge-Region essentiell und geht über die beiden Stickstoffe Wasserstoffbrücken zu deren Seitenketten ein. Während der Chlorsubstituent in früheren Arbeiten noch in einer zweistufigen Synthese (ausgehend von 7-Azaindol) selbst eingeführt werden musste, ist 4-Chloro-7-azaindol mittlerweile zu akzeptablen Preisen kommerziell erhältlich.

Davon ausgehend wurde das wichtige Intermediat 4-Chlor-5-nitro-1-tosyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin (**2**) synthetisiert (**Schema 3.1**), an dem dann in Folgeschritten über S_NAR -Reaktionen die Seitenketten für die JAK-Selektivitätstasche eingeführt werden sollten.



Schema 3.1: Synthese von 4-Chlor-5-nitro-1-tosyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin (**2**). (a) NaH, *p*-Tosylchlorid, THF, 0 °C → rt (92 %); (b) Me₄N·NO₃, TFAA, DCM, 0-5 °C (72 %).

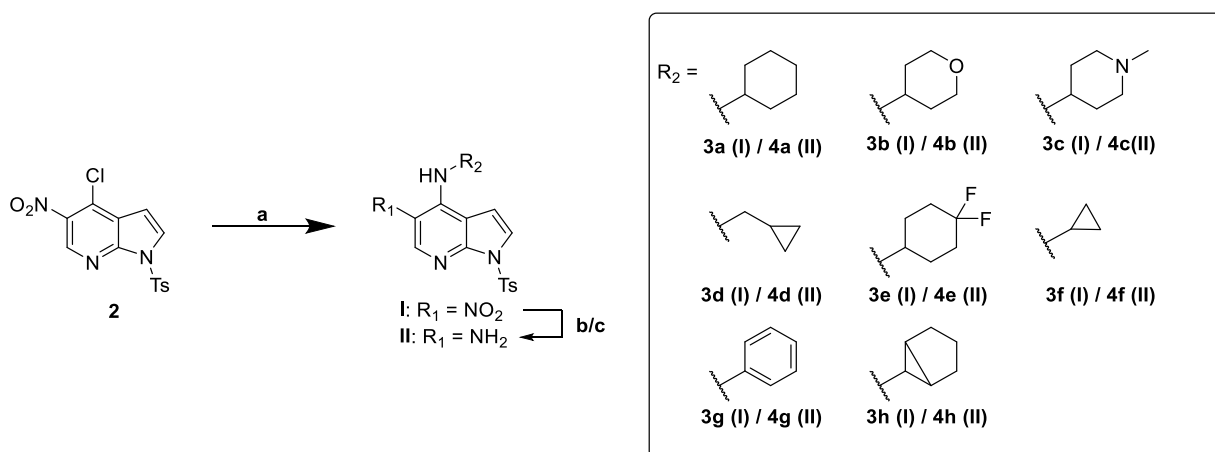
Zunächst wurde der Indolstickstoff über die Tosylgruppe geschützt, indem dieser durch die starke Base NaH deprotoniert und mit *p*-Tosylchlorid zur Reaktion gebracht wurde. Der Ansatz sollte unter Eiskühlung und mit portionsweiser Zugabe der Reagenzien erfolgen, um eine zu heftige Reaktion zu vermeiden. Ebenso ist die Verwendung von wasserfreien Lösemitteln und Schutzgas nötig, damit das eingesetzte NaH bzw. Tosylchlorid nicht unter Hydrolyse abreagieren. Die Tosylgruppe ist robust gegenüber vielerlei Reaktionsbedingungen und eignet sich durch den starken Elektronenzug auch dazu, die Elektronendichte des geschützten Aromaten zu verringern und so die geplante S_NAR -Reaktion (s.u., **Schema 3.2**) zu ermöglichen (ebenso wie die im nächsten Schritt eingeführte, ebenfalls elektronenziehende Nitrogruppe). Gegenüber schwach basischen Bedingungen ist sie noch ausreichend stabil, lässt sich aber durch stärkere Basen wie KOH entschützen. Zudem ist das verwendete *p*-Tosylchlorid äußerst günstig, da es sich um ein Nebenprodukt der industriellen Saccharin-Herstellung handelt (für welche *o*-Tosylchlorid benötigt wird). Von Nachteil sind das

allergene Potential des Tosylchlorids sowie dessen unangenehmer, persistenter Geruch, weswegen Einwaage und Handhabung in einem gut belüfteten Abzug durchgeführt werden sollten.

Die Nitrierung des nun geschützten Heteroaromaten zu **2** erfolgte nun im Zuge einer SE_{Ar} -Reaktion. Durch den erwähnten Elektronenzug der Schutzgruppe ist die Aktivität des aromatischen Systems diesem Reaktionstyp gegenüber herabgesetzt, was hier allerdings erwünscht ist, da so auch die Entstehung von Nebenprodukten reduziert wird. Wie zuvor wurde auch hier mit trockenem Lösemittel unter Schutzgas und Kühlung gearbeitet. Die Nitrierung erfolgte über frisch *in situ* gebildetes Trifluoracetylnitrat, das durch langsame und portionsweise Zugabe von TFAA zum mit Tetramethylammoniumnitrat beschickten Ansatz zugegeben wurde.⁹¹⁻⁹³ Nach vollständiger Zugabe der TFAA über ca. 8 h wurde i. d. R. über Nacht gerührt. Dabei wurde am Folgetag oft ein Stoppen der Reaktion beobachtet und noch substantielle Mengen des Edukts **1** detektiert. Ein möglicher Grund hierfür könnte die geringe Stabilität des Trifluoracetylnitrats bei Raumtemperatur sein. Gleichzeitig verläuft die Reaktion unter Kühlung allerdings recht langsam. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde deswegen üblicherweise nach Stocken der Reaktion unter erneuter Kühlung weiteres TFAA zugegeben, bis kein Edukt mehr detektierbar war. Nach unkomplizierter Aufarbeitung durch Waschen der organischen Phase, Suspension in eiskaltem MeOH und nachfolgender Filtration konnten auf diese Art saubere Produkte mit noch zufriedenstellenden Ausbeuten von ca. 70 % erhalten werden.

3.1.2 SN_{Ar} zur Einführung der Seitenkette, Reduktion zum vicinalen Diamin

Nach der Herstellung des Schlüsselintermediats **2** verzweigte sich der Synthesepfad durch Einführen der jeweiligen Seitenketten für die JAK-Selektivitätstasche. Wie bereits erwähnt ist das aromatische System gegenüber nukleophilen Substitutionsreaktionen aufgrund der elektronenziehenden Substituenten aktiviert. Die Reaktion gelang mit einer Vielzahl an Aminen (**Schema 3.2**), selbst mit (dem aromatischen, weniger nukleophilen) Anilin unter Einsatz einer Hilfsbase und Refluxbedingungen. Die Darstellung der nicht kommerziell erhältlichen Amino-Bausteine ist in Kapitel **3.4** beschrieben.



Schema 3.2: Einführung der Seitenketten für die JAK-Selektivitätstasche und Reduktion zum vicinalen Diamin: (a) Et_3N , entsprechendes Amin, $iPrOH$, reflux (80 - 95 %); (b) H_2 , Pd/C oder Pt/C , $MeOH/EtOAc$ oder $EtOAc$, 60 °C oder rt (78 % - quant.); (c) $Na_2S_2O_4$, $EtOH/H_2O$, rt (98 %).

Als Basenkomponente diente Triethylamin, welches aufgrund seiner sterisch anspruchsvollen Struktur selbst nicht als Nukleophil reagiert. Die Menge der eingesetzten Hilfsbase wurde an das jeweilige eingeführte Amin angepasst; im Falle von Hydrochloriden wurde dementsprechend ein weiteres Äquivalent Et_3N zugegeben, damit das Amin als reaktivere, freie Base vorlag.

Die Reaktionen verliefen zügig und glatt, i. d. R. in 30-60 min, im Falle der Reaktion mit Anilin oder Difluorocyclohexylamin innerhalb von 2-3 h.

Die Aufreinigung der Rohprodukte gelang elegant durch Fällung mit NH_4Cl -haltiger wässriger Lösung und nachfolgender Filtration. Die schlecht wasserlöslichen Substitutionsprodukte fielen i. d. R. nahezu quantitativ als feine, intensiv gefärbte Nadeln oder Plättchen von hoher Reinheit aus. Nur in wenigen Fällen waren noch weitere Reinigungsschritte wie z.B. Flash-Chromatographie nötig. Mitunter fiel das Produkt auch schon während der Reaktion im heißen $i\text{PrOH}$ aus (z.B. bei der Reaktion mit Cyclopropylmethylamin), was zum Stillstand des Rührfisches führen konnte, sich aber durch Zugabe weiteren Lösemittels beheben ließ.

Vor der Cyclisierungsreaktion zum Imidazol war es noch nötig, die aromatische Nitrogruppe zum Amin zu reduzieren. Hier bot sich die katalytische Hydrierung mit Wasserstoff an, da diese üblicherweise mit hohen, bis zu quantitativen, Ausbeuten und geringem Auftreten unerwünschter Nebenprodukte gelingt. Zudem ist die Aufreinigung der Produkte einfach, nach Filtration des Katalysators lassen sich diese durch Verdampfen des Lösemittels in hoher Reinheit gewinnen. Im Gegensatz zur in vorigen Arbeiten beschriebenen Synthese stand kein Druckreaktor zur Verfügung, weswegen auf einen alternativen Aufbau ausgewichen wurde. Das Reaktionsgefäß wurde über eine Waschflasche mit einer Wassersäule verbunden, wodurch ein milder Überdruck erzeugt und ein Reservoir für den aufgezogenen Wasserstoff geboten wurde. Über den Pegel des Meniskus konnte zudem das Fortschreiten der Reaktion abgeschätzt werden. Die gründliche Sättigung des Aufbaus mit Argon sowie der gelinde Überdruck waren ausreichend, um Luftsauerstoff auszuschließen.

Bis auf den Druck wurden vorerst die von Michael Forster beschriebenen Bedingungen (60 °C, Lösung in MeOH und EtOAc , Verwendung von Palladium auf Kohle als Katalysator) übernommen. Diese führten aber unter dem vglw. geringeren Druck zu langen Reaktionszeiten von 5-9 Tagen, was zu unerwünschten Verzögerungen in der Synthese führte.

Alternativ wurde der Palladiumkatalysator durch Platin auf Kohle ersetzt und das Methanol-haltige Lösemittelgemisch durch reinen EtOAc (was auch Bedenken bzgl. der Entflammbarkeit von Methanol in Kontakt mit dem Katalysator behob). Die Hydrierung erfolgte auf diese Art schon innerhalb eines, gegebenenfalls zwei Tagen und bei Raumtemperatur. Die höheren Kosten des verwendeten Platinkatalysators wurden wieder dadurch ausgeglichen, dass vergleichsweise geringere Äquivalentmengen zur zügigen Umsetzung benötigt wurden.

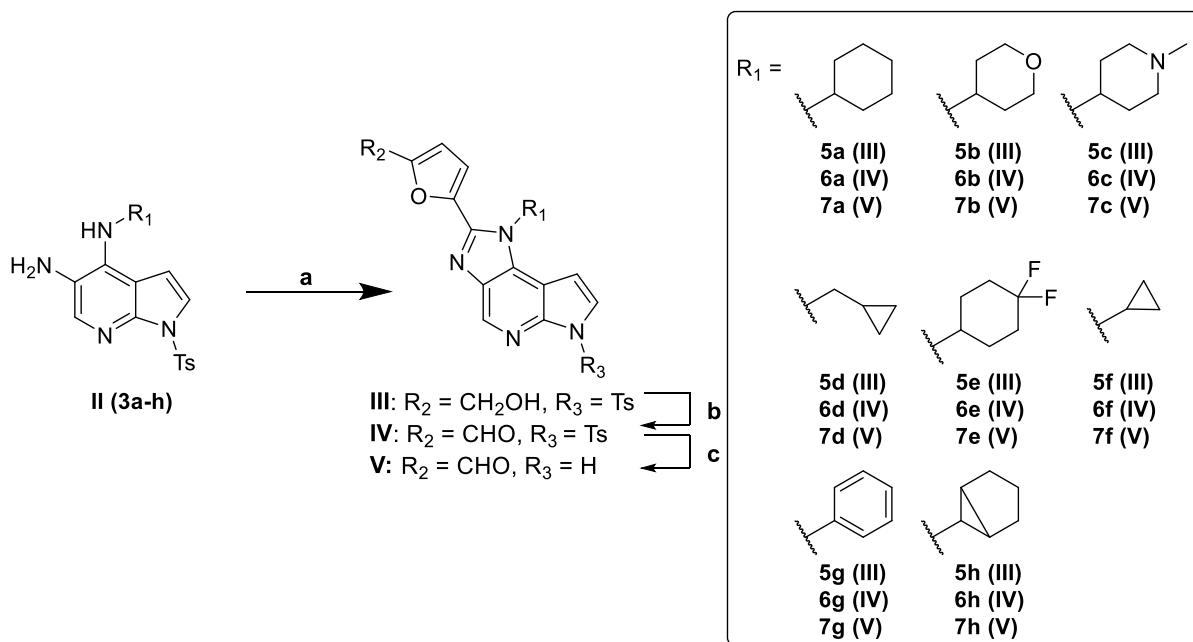
Die erhaltenen Reduktionsprodukte sind nicht lange lagerstabil, was schon in vorigen Arbeiten berichtet wurde.⁷² Dies machte sich insbesondere an der offenen Luft schon nach relativ kurzer Zeit durch Verfärbungen bemerkbar. Es ist deshalb sinnvoll, die Produkte möglichst zügig weiter zu verarbeiten oder, wenn nötig, unter Schutzgas und bei -20 °C zu lagern.

3.1.3 Alternative Reduktionsmethode (c) mit Natriumdithionit

Im Zuge der Entwicklung der phenylsubstituierten Verbindungen wurde eine weitere Methode zur Reduktion der Nitrogruppe erprobt. Die Reaktion mit Na₂S₂O₄ in ethanolisch-wässriger Lösung (**Schema 3.2, c**) erfolgte bereits bei Raumtemperatur, ließ sich aber durch Erwärmen auf ca. 70 °C beschleunigen, ohne dass dabei Nebenprodukte oder Zersetzung aufgefallen wären. Die Aufarbeitung gelang durch Entfernung des EtOH unter reduziertem Druck und Extraktion der wässrigen Phase mit DCM. Problematisch war die schlechte Trennbarkeit beider Phasen, die eine lange Standzeit erforderte. Dennoch führte die Methode zu nahezu quantitativen Ausbeuten und eignet sich somit als Alternative zur katalytischen Hydrierung. Von Vorteil ist auch der dadurch ermöglichte Verzicht auf das – potentiell explosive – Wasserstoffgas.

3.1.4 Ringschlussreaktion zu 2-(5-hydroxymethylfuryl)imidazolen, Dess-Martin-Oxidation und Tosyl-Entschützung

Für den Spacer zwischen Hinge-Bindungsmotiv und dem elektrophilen Warhead wurde ein Furylrest eingeführt, da sich dieser bereits als ausgezeichnet geeignet für diese Strukturklasse erwiesen hatte.^{4,72} Zu diesem Zwecke wurde der Spacer über 5-Hydroxymethylfurfural eingefügt, um mithilfe eines Oxidationsmittels mit den zuvor dargestellten vicinalen Diaminen einen Ringschluss zum Imidazol einzugehen.⁹⁴



Schema 3.3: Ringschlussreaktion zum 2-substituierten Imidazol, Oxidation am furylischen Alkohol und Entschützung. (a) 5-Hydroxymethylfurfural, KHSO₅, DMF/H₂O, rt (42-85 %); (b) DMP, DCM, 0 °C → rt (70-90 %); (c) KOH, MeOH, rt (28-88 %);

Diskutiert wird eine Zwischenstufe als (cyclisches) Aminal, welches dann in einem langsameren zweiten Schritt zum Imidazol weiteroxidiert wird; die bei Reaktionskontrollen gefundenen m/z Werte unterstützen diese Annahme und wurden als Indiz für das Fortschreiten der Reaktion genutzt. Im Gegensatz zu Literaturbeispielen verlief diese allerdings deutlich langsamer, mitunter waren mehrere Tage bis zur vollständigen Umsetzung nötig. Eine erneute Zugabe des Oxidationsmittels war dabei nur in begrenztem Maße hilfreich. Ein Grund für die Probleme bei der Umsetzung konnte nicht identifiziert werden, auch der Wechsel zwischen mehreren Batches und Herstellern des Oxone[®] führte zu keiner Verbesserung.

Bei der Reaktion mit dem N-methylpiperidin substituierten **5c** entstand zunächst nicht das erwünschte Produkt, sondern dessen N-Oxid, wie anhand der Masse und der hohen Polarität des Stoffes festgestellt wurde. Dieses ließ sich durch Titration mit TiCl₃-Lösung wieder reduzieren und das Produkt **5c** nach Alkalisierung der Lösung organisch extrahieren. Aufgrund von Nebenreaktionen und des erhöhten Aufwands bei der Aufarbeitung mussten dadurch jedoch Verluste bei der Ausbeute in Kauf genommen werden.

Die anschließende Oxidation des primären Alkohols zum Aldehyd war ein nötiger Funktionalisierungsschritt, um später die Knoevenagel-Kondensation zu den fertigen Testsubstanzen zu ermöglichen. Als Oxidationsmittel diente Dess-Martin-Periodinan, welches Alkohole selektiv und schon bei Raumtemperatur zu Aldehyden bzw. Ketonen umsetzt.⁹⁵ Die Selektivität für Alkohole war insbesondere im Falle des Amino-substituierten Edukts **5c** von Vorteil, um eine (erneute) Oxidation des Seitenketten-Stickstoffs zu vermeiden.

Die Dess-Martin-Oxidation wurde nach den von Forster beschriebenen Methoden ohne weitere Änderungen durchgeführt und verlief stets unproblematisch und mit guten Ausbeuten. Die in seiner Arbeit erwähnten Probleme bei der extraktiven Aufarbeitung größerer Ansätze wurden nicht beobachtet.^{4,72}

Dennoch wurde eine alternative Aufreinigungsmethode erprobt, unter anderem auch im Falle chromatographisch schwer trennbarer Ansätze: Das aldehydische Rohprodukt wird in Toluol gelöst und mit frischer, gesättigter Natriumbisulfit-Lösung versetzt. Es kommt zur Bildung einer α -Hydroxysulfonsäure, die in unpolaren Medien ausfällt und durch Filtration gewonnen werden kann. Die Rückreaktion zum gewünschten Aldehyd erfolgt unter basischen Bedingungen, z.B. in heißer Natriumcarbonat-Lösung, die mit Toluol überschichtet wird. Das Produkt kann so aus der organischen Phase in hoher Reinheit wiedergewonnen werden.

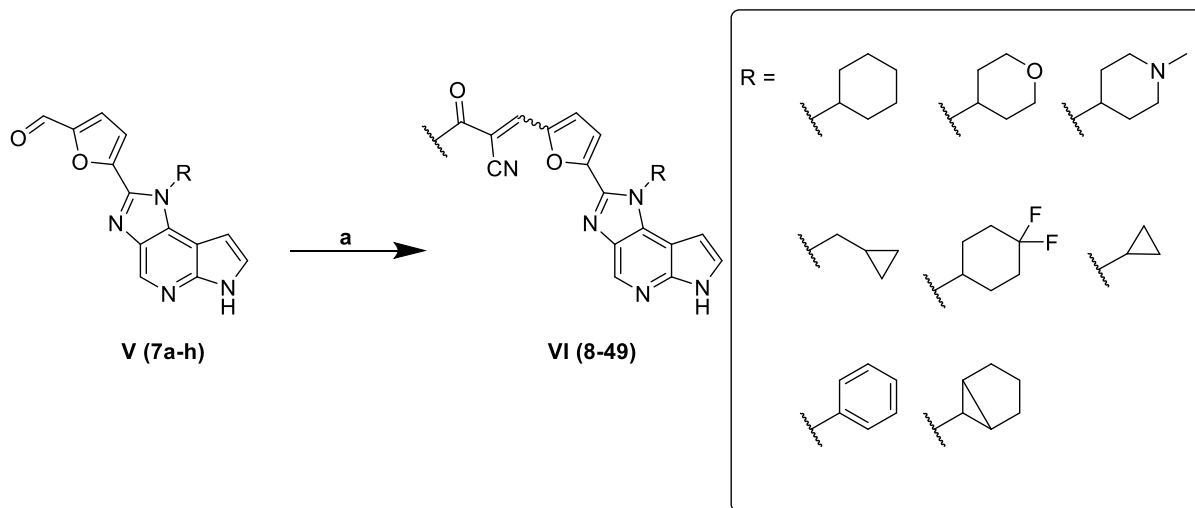
Die Tosyl-Schutzgruppe wurde nun in methanolischer Kalilauge wieder entfernt. Die Entschützung unter basischen Bedingungen sollte aufgrund des vorliegenden Aldehyds unter Ausschluss von - größeren Mengen an - Wasser durchgeführt werden, da dieser sonst Nebenreaktionen, z.B. eine Disproportionierung nach Cannizzaro eingeht und das Produkt verloren wird.

Die extraktive Aufarbeitung wurde häufig durch sich an den Phasengrenzen anlagernde, schwerlösliche Nebenprodukte erschwert, welche sich aber durch Filtration weitestgehend entfernen ließen. Weitere Komplikationen ergaben sich bei der Entschützung des Methylcylopropan-substituierten **6d**: Die Seitenkette erwies sich als labil gegenüber den Reaktionsbedingungen, es entstand ein schwerlösliches, intensiv rot gefärbtes Nebenprodukt welches nicht näher identifiziert wurde. Die Ausbeuten fielen dementsprechend gering aus. Auch unter Verwendung anderer Basen (Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , Anilin, Piperidin, 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)naphthalin) kam es nicht oder nur in geringem Maße zur gewünschten Umsetzung. Alternative Entschützungsmethoden, z.B. die Verwendung feiner – gegebenenfalls zuvor mit Dibrommethan aktivierter – Magnesiumspäne und Ultraschall waren ebenfalls ohne Erfolg. Hier kam es zwar zur erwünschten Abspaltung der Schutzgruppe, allerdings zeitgleich auch zur Reduktion des Aldehyds bzw. anderer Gruppen, wie anhand massenspektrometischer Kontrollen festgestellt wurde.

3.1.5 Knoevenagel-Kondensation zu Cyanacrylamiden

Der üblicherweise letzte Schritt zum Erhalt der Testverbindungen war die Knoevenagel-Kondensation der Aldehyde zu Cyanacrylamiden (**Schema 3.4**). Als Edukte dienten hierbei diverse Cyanacetamide, deren Synthese – falls nicht kommerziell erhältlich – in nachfolgenden Abschnitten (Kapitel **3.2**) behandelt wird. Cyanacetamide weisen am CH-aziden α -Kohlenstoff einen pK_a von ungefähr 8-13 auf, dementsprechend ist die Zugabe katalytischer Mengen Piperidin ausreichend für eine saubere und glatte Umsetzung. Auch die voluminösen Makrolid-Konjugate (Kapitel **3.3**) reagierten unter den gleichen Bedingungen problemlos. Die Ausbeuten fielen überwiegend zufriedenstellend aus. I. d. R. war es möglich, das Produkt bereits durch Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ oder sogar Raumtemperatur zu fällen und per Filtration sauber zu isolieren. Wenn nötig ließen sich angefallene Verunreinigungen ansonsten chromatographisch

gut entfernen. Bei ersterer Methode der Aufreinigung war es mitunter – beim Verdacht auf unvollständige Ausfällung - lohnenswert, das Filtrat einer Säulenchromatographie zu unterziehen, um die Ausbeute weiter zu steigern.



Schema 3.4: Knoevenagel-Kondensation der Aldehyde mit Cyanacetamiden zu den Cyanacrylamid-Testsubstanzen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die unterschiedlichen Amidreste nicht dargestellt, diese sind dem Experimentalteil (Kapitel 6.5) zu entnehmen. (a) korrespondierendes Cyanacetamid, Piperidin, MeOH oder iPrOH, 50-70 °C (32-97 %)

Üblicherweise wurde bei der Reaktion ein Produktgemisch aus den *E/Z*-Isomeren der Cyanacrylamide erhalten, insbesondere wenn die Aufarbeitung nicht durch Fällung, sondern säulenchromatographisch erfolgte (und somit das Produkt vor der Trocknung für gewisse Zeit in Lösung vorlag). Dass die beiden Isomere in Lösung ineinander übergehen bzw. im Gleichgewicht stehen, wurde bereits von Michael Forster beschrieben. Die Struktur des *Z*-Isomers von **FM-381** wurde per Röntgenkristallographie identifiziert und dem in der RP-HPLC früher eluierenden Peak zugeordnet. Dementsprechend ist anzunehmen, dass das *E*-Isomer später eluiert.⁴ Das in Lösung vorliegende Gleichgewicht zeigte sich auch in den aufgenommenen NMR-Spektren anderer Vertreter dieser Substanzklasse, in denen typischerweise kleinere „Nebenpeaks“ des in geringerem Anteil vorliegenden Isomers zu beobachten waren.

Auch das Carbonsäure-Analogon zu **FM-381**, **48**, wurde per Knoevenagel-Kondensation von **7a** mit Cyanessigsäure mit akzeptabler Ausbeute (69 %) dargestellt. Die Substanz diente primär als Referenz zur Identifizierung von Metaboliten der Cyclohexan-Reihe, zeigte selbst aber auch hohe Aktivität gegen die JAK3 (Kapitel 4.1).

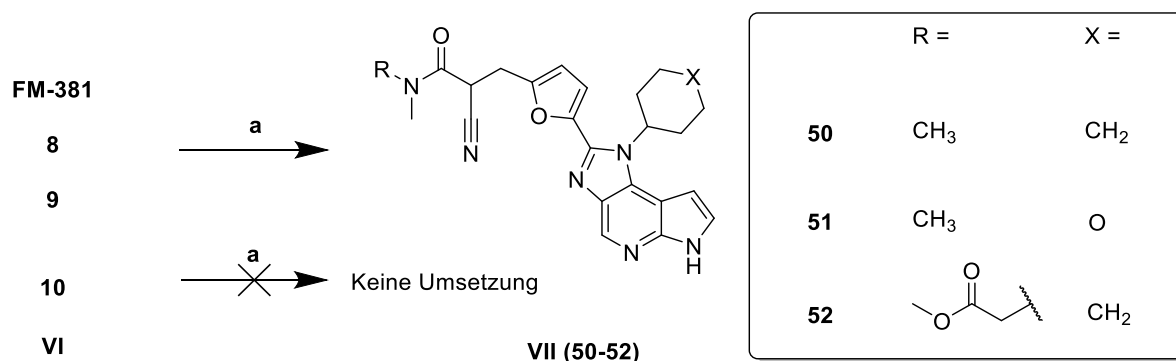
3.1.6 Reduktion des elektrophilen Warheads

Im Rahmen der Arbeit von Michael Forster wurden reduzierte Analoga einer Reihe von Acrylamiden hergestellt, um die Rolle des elektrophilen Warheads näher zu untersuchen. Während zwar ein Verlust an JAK3-Aktivität festgestellt wurde, wurde dieser als nicht stark genug gewertet um einen kovalenten Bindemodus der

ungesättigten Derivate zu bestätigen. Vermutet wird, dass erst durch die zusätzlichen Interaktionen der in den Cyanacrylamiden vorhandenen Nitrilgruppe mit R911 und R953 (wodurch die Arginin-Tasche zugänglich wird) eine ausreichende Stabilisierung vorliegt, um eine kovalente Bindung zu C909 auszubilden.^{4,72}

Um dies näher zu beleuchten, wurde zunächst ein reduziertes Analogon von **FM-381** synthetisiert. Dieses war auch aus pharmakokinetischen Aspekten interessant, da als ein Grund für die niedrige scheinbare Bioverfügbarkeit vieler der dargestellten Testsubstanzen vermutet wurde, dass diese schon vor Aufnahme ins Plasma unspezifische Reaktionen mit Nukleophilen im Magen-Darm-Trakt eingehen könnten. Eine höhere orale Bioverfügbarkeit des reduzierten Derivats wäre ein Indiz hierfür.

Das Cyanacetamid **50** war direkt aus **FM-381** zugänglich (**Schema 3.5**). Von einer katalytischen Hydrierung durch Palladium oder Platin auf Aktivkohle wurde abgesehen, da auf diese Weise wahrscheinlich auch die Nitrilgruppe mitreduziert werden würde.



Schema 3.5: Reduktion am elektrophilen Warhead zu den gesättigten Analoga. (a) NaBH₄, MeOH, rt (47 % - quant.).

Stattdessen wurde die Reduktion mithilfe von Natriumborhydrid durchgeführt. Das durch NaBH₄ übertragene Hydridion gilt nach HSAB-Konzept als „weich“ und reagiert daher bereitwillig mit dem weichen elektrophilen Zentrum des Michael-Akzeptors. Die Reaktion verlief schnell und ohne Komplikationen, andere funktionelle Gruppen wurden unter den gewählten Bedingungen nicht angegriffen. Nach simpler wässrig-organischer Extraktion konnte das Produkt **50** in hoher Reinheit isoliert werden.

Die Reaktion wurde neben **FM-381** auch mit den verwandten Stoffen **8-10** durchgeführt, um weitere Cyanacetamide in die geplanten Aktivitätsassays und PK-Studien aufnehmen zu können. Bei der Reduktion von **9** wurde die extraktive Aufarbeitung durch die Präsenz eines Tensid-artigen Nebenproduktes erschwert. MS-Analyse ergab, dass wahrscheinlich die α -N-acyl-Esterfunktion teilweise zum Alkohol reduziert wurde,⁹⁶ was auch die vglw. niedrigen (ansonsten üblicherweise quantitativen) Ausbeuten erklären würde. Bei der versuchten Reduktion von **10** konnte sogar ausschließlich das vermutete alkoholische Nebenprodukt extrahiert werden. Die Struktur der Verbindung konnte aber nicht vollständig schlüssig aufgeklärt werden. Das den anderen Testsubstanzen ähnliche Verhalten in *in vitro* Assays (z.B. dem LPS-

Stimulus Experiment) spricht aber dafür, dass es sich wahrscheinlich ebenfalls um einen selektiven JAK3-Inhibitor handelt.

3.2 Synthese der Cyanacetamid-Bausteine zur Einführung des Michael-Akzeptors

Die Amid-Reste der dargestellten JAK-Inhibitoren sind zum Solvens-exponierten Teil der katalytischen Domäne hin ausgerichtet und damit weniger entscheidend für die Aktivität oder Selektivität der Substanz.⁷² Dies erlaubt die Einführung von Gruppen, die vor allem der Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften oder der Erhöhung der Löslichkeit dienen.

Die für den letzten Reaktionsschritt benötigten Cyanacetamide (**Abbildung 3.1**) wurden zum Teil selbst synthetisiert, da nicht alle kommerziell verfügbar waren.

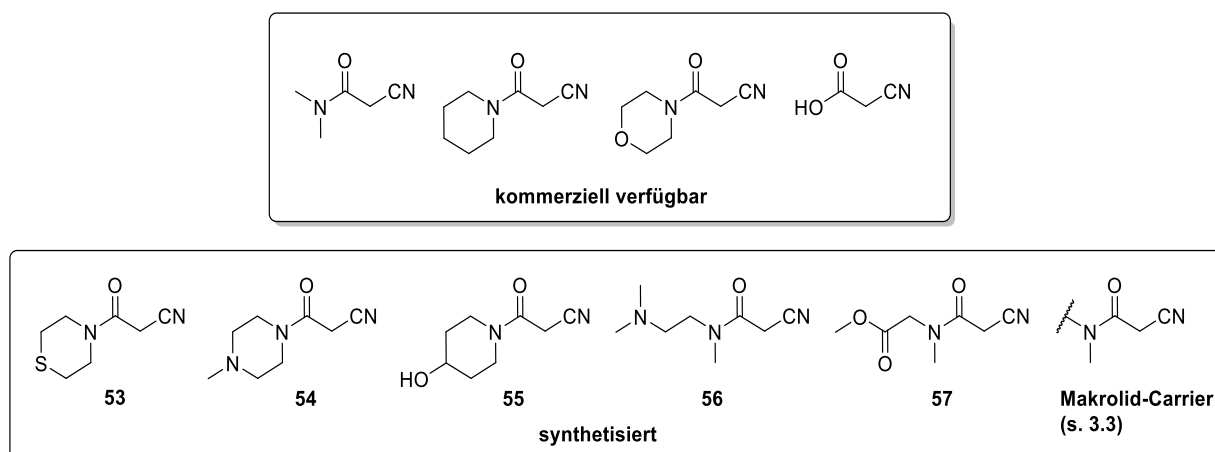


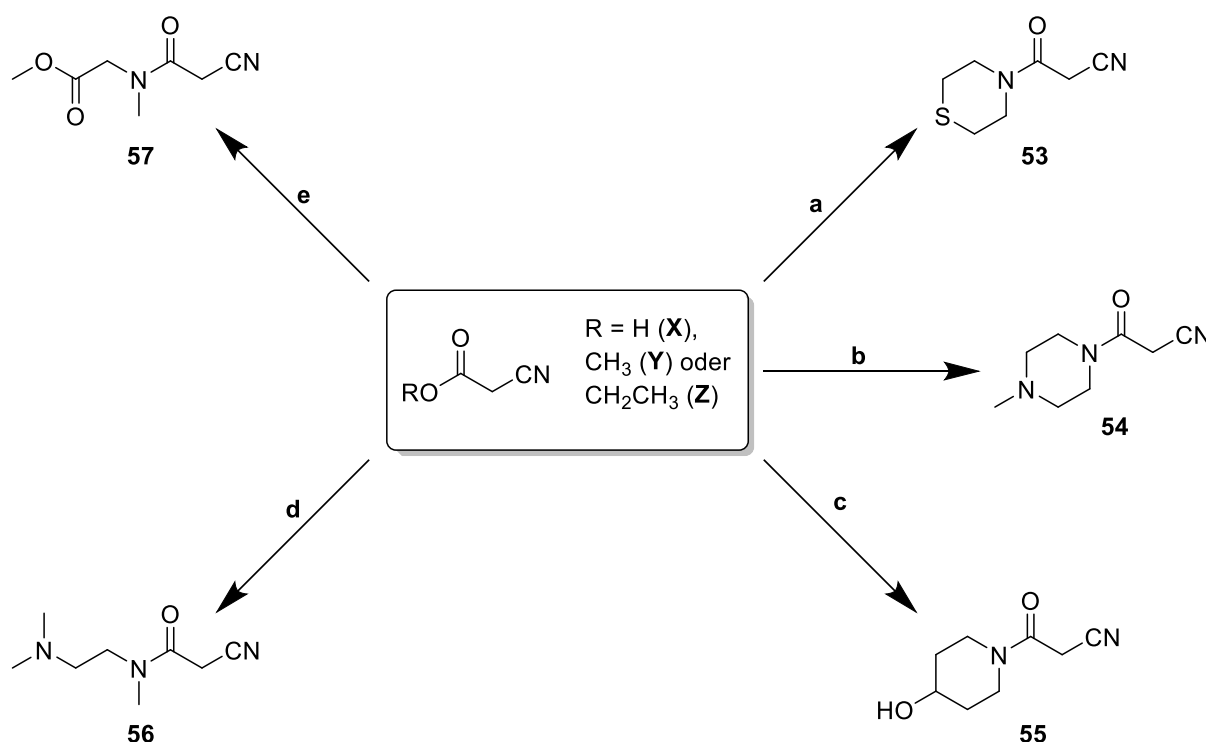
Abbildung 3.1: Übersicht über die für die Knoevenagel-Reaktion eingesetzten Cyanacetamide. Struktur und Synthese der an Makrolide gekoppelten Amide sind unter Kapitel 3.3 näher ausgeführt.

Die Synthese der diversen Cyanacetamid-Bausteine ist in **Schema 3.6** dargestellt. Dabei wurde direkt von der Cyanessigsäure oder deren Estern ausgegangen. Die Aminolyse mit Letzteren war dabei zu bevorzugen, da die Ester im Gegensatz zur freien Säure ohne Aktivierungsschritte bereits reaktiv genug waren. Zudem konnte durch deren Vorliegen als Flüssigkeit bei Raumtemperatur teilweise ohne Zugabe weiterer Lösemittel gearbeitet werden. Nur **57** wurde nach vorheriger Umsetzung der Cyanessigsäure zum Säurechlorid und darauffolgender Schotten-Baumann-ähnlicher Reaktion dargestellt, da unter Verwendung der vorhandenen Ester keine Umsetzung beobachtet worden war.

Generell verliefen die Reaktionen unter milden Bedingungen, einzig bei der Synthese von **53** war überhaupt das Zuführen von Wärme nötig. Zur Aufreinigung erwies es sich in vielen Fällen (z.B. **54, 56, 57**) als günstig, das Rohprodukt wiederholt in Diethylether zu suspendieren, fein zu dispergieren und die Etherphase vorsichtig zu dekantieren. Dennoch war in der Regel eine Flash-Chromatographie der Rohprodukte nötig, um ausreichend saubere Produkte zu erhalten.

Die in-Prozess-Analyse der Stoffe war in einigen Fällen problematisch: So war es z.B. nicht immer möglich, die Produkte (insbesondere **57**) anhand ihrer Molekularmasse zu identifizieren. Dies wurde durch Probereaktionen umgangen, i. d. R. durch Knoevenagel-Reaktionen der isolierten Stoffe mit Pyridincarboxaldehyd. Die dadurch entstandenen Produkte waren gut massenspektrometrisch erfassbar und konnten so indirekt die Identifikation der Cyanacetamide ermöglichen.

Oft wurde auch die Entstehung zäher, schwer aufzureinigender Öle beobachtet, womöglich durch Oligomerisierung der Reaktanden. Dies war insbesondere bei der Synthese von **57** ein Problem und ging zulasten der Ausbeute.



Schema 3.6: Synthese verschiedener Cyanacetamide als Edukte zur Knoevenagel-Kondensation. (a) **Z**, Thiomorpholin, Natriumethoxid, EtOH, 70 °C (56 %); (b) **Y**, N-methylpiperazin, 0 °C → rt (71 %); (c) **Z**, 4-Hydroxypiperidin, Natriumethoxid, EtOH, rt (30 %); (d) **Y**, N,N,N'-trimethylethylendiamin, rt (80 %); (e) **X**, Oxalylchlorid, Sarkosinmethylester, kat. DMF, Et₃N, DCM, 0 °C → rt (10 %).

3.3 Synthese von Azithromycin-basierten Trägermolekülen

Aus bereits in der Einleitung erwähnten Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Makrolid-Carriern synthetisiert, die mit den pharmakologisch aktiven JAK3-Inhibitor Warheads verknüpft werden sollten. Ein zu erwartendes Problem ist ein Aktivitätsverlust des Inhibitors, da die voluminösen Makrolidreste den korrekten Fit in die ATP-Bindestasche erschweren. Günstigerweise ist die beabsichtigte Bindestelle für die Konjugation, der Amidrest des Warheads, zum Solvens hin orientiert.⁷² Durch Einführung eines geeigneten, flexiblen Linkers sollte ein ausreichender Abstand zwischen Carrier und Warhead geschaffen werden, um weiterhin hohe Aktivität zu gewährleisten (**Abbildung 3.2**).

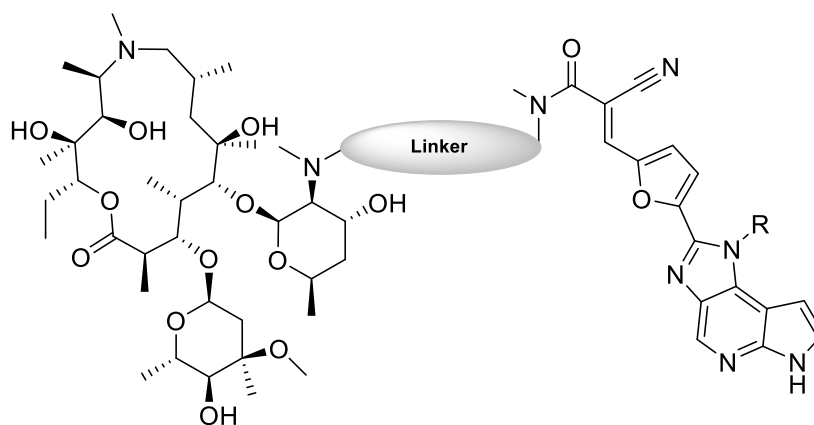


Abbildung 3.2: Konzeptueller Aufbau der Makrolid-Konjugate. Über einen an Position 2' am Desosamin eingeführten Amino-Linker wird der JAK-Inhibitor Warhead (rechts) mit dem auf Azithromycin basierenden Trägermolekül (links) verbunden. R = cyclisches Alkan, cyclisches Heteroalkan oder Benzol.

Der generelle Aufbau sieht die Verbindung des Azithromycin-Grundgerüsts über einen „Diamino-Linker“ in 2'- oder 3'-Position der Cladinose mit dem Warhead vor. Bevorzugt wurde dabei die Konjugation über die 2'-Position (was in einer OH-Gruppe an 3' resultieren würde). Die resultierenden 2'-Konjugate sind der Struktur des Azithromycin, bei dem sich die OH-Gruppe am 2'-C und der Dimethylamino-Rest am 3'-C befinden, weniger ähnlich. Dadurch wurde eine geringere (hier unerwünschte) antibiotische Aktivität erhofft. Wie bereits in der Einleitung erwähnt werden Erythromycin und Azithromycin durch Wechselwirkungen des Desosamin-Zuckers mit dem N1 von A2058 bzw. einem koordinierenden Wassermolekül gebunden.⁷⁵ Durch Austausch der beiden Gruppierungen fällt mindestens eine dieser Wechselwirkungen weg, da die nun am 2'-C befindliche (tertiäre) Aminogruppe keine Wasserstoffbrücke zum N1 aufbauen kann. Eine antibiotische Aktivität dürfte aber aufgrund der eingesetzten voluminösen Reste ohnehin kaum mehr vorhanden sein, da eine Bindung an die ribosomale Untereinheit dadurch äußerst unwahrscheinlich wird.

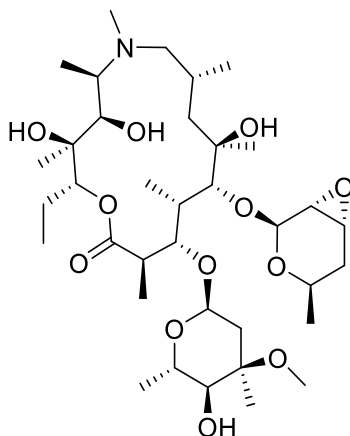
Es wurden Linker variabler Kettenlänge synthetisiert, um den idealen Abstand von Makrolid und Warhead zu ermitteln. Die Abstände zwischen der 2'-Aminogruppe und dem Amid-Stickstoff des Cyanacrylamid-Warheads wurden zwischen 2 und 5 Atomen gewählt.

Als letzter Schritt vor der Verknüpfung mit dem JAK3 Warhead wurde die distale sekundäre Aminogruppe des Linkers dann mit Cyanessigsäure oder einem geeigneten ähnlichen Baustein zu Cyanacetamiden umgesetzt. Diese konnten dann analog zur Synthese der nicht-konjugierten Inhibitoren in einer Knoevenagel-Kondensation zu den Endprodukten umgesetzt werden.

3.3.1 Synthese von 2'-deoxy-3'-dedimethylamino-2',3'-epoxyazithromycin (58)

Als Ausgangsmaterial für die Synthese von Azithromycin-basierten Carriern diente ein Epoxid-Derivat von Azithromycin, das 2'-desoxy-3'-dedimethylamino-2',3'-epoxyazithromycin (**58**, **Abbildung 3.3**). Durch Funktionalisierung der 2'- und 3'-

Position des Desosamin-Zuckers lassen sich hier eine Vielzahl an Resten durch nukleophilen Angriff einführen, worauf später noch detaillierter eingegangen wird. Das Epoxid stellt somit einen bedeutsamen Grundstoff für viele der im Rahmen dieser Arbeit, aber auch in anderen Projekten synthetisierten Stoffe dar.



2'-deoxy-3'-dedimethylamino-2',3'-epoxyazithromycin (58)

Abbildung 3.3: Struktur des Schlüsselintermediats **58**, von dem ausgehend die Makrolidcarrier synthetisiert wurden. Ausgehend von Azithromycin wurden die Reste an 2'- und 3'-Position am Desosamin zum Epoxid umgesetzt, was die Einführung neuer Gruppen ermöglicht.

Eine Methode zur Epoxidierung von Azithromycin ist bereits in einem Patent der Synovo GmbH beschrieben. Der Reaktionsmechanismus ist nicht belegt, spekuliert wird aber eine Alkylierung der an 3'-Position befindlichen Dimethylamino-Gruppierung und deren darauffolgende Verdrängung durch die 2' OH-Gruppe.⁸⁶ Die Ausbeuten fielen in der Regel recht gering aus. Da sowohl Azithromycin als auch die verwendeten Epoxidbildner auch in größeren Mengen verhältnismäßig günstig erhältlich sind, konnte dieser Umstand durch große Reaktionsansätze – üblicherweise ca. 20 g - gut ausgeglichen werden. Zudem wurde, auch wenn die genaueren Abläufe des Reaktionsmechanismus nicht nachvollziehbar sind, auf verschiedene Art versucht die Reaktion für die routinemäßige Synthese zu optimieren. Da das im Patent verwendete Epichlorhydrin als eindeutig krebserregend eingestuft wurde, wurde zunächst versucht einen geeigneten Ersatz zu finden. In einer Reihe von Vorversuchen wurden verschiedene potentielle Reagenzien für die Bildung des Epoxides getestet. Eingesetzt wurden unter anderem Polyethylenglycoldiglycidylether, γ -Glycidoxypropyltrimethoxysilan, Glycidyltrimethylammoniumchlorid und Glycidol (siehe **Abbildung 3.4**).

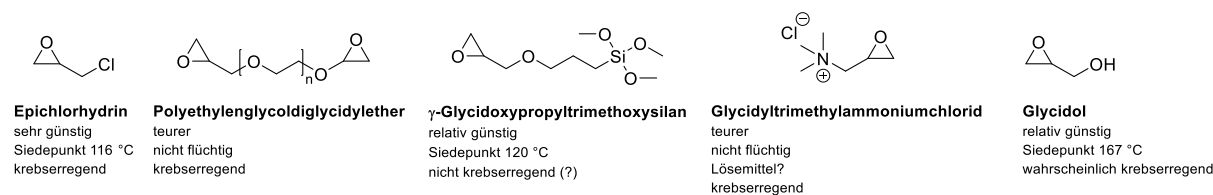


Abbildung 3.4: Potentielle in Frage kommende Reagenzien für die Epoxidierung von Azithromycin und ihre Vor- und Nachteile.

Die Vorversuche zeigten verschiedene Grade der Umsetzung zum Zielprodukt nach einer festgelegten Zeit: Bei Glycidyltrimethylammoniumchlorid wurde keine Umsetzung zum Abbruchzeitpunkt festgestellt. Im Falle von γ -Glycidoxypropyltrimethoxysilan kam es nur zu einer geringen Umsetzung zum Produkt und es entstanden in wesentlich höherem Ausmaße Nebenprodukte. Der Polyethylenglycoldiglycidylether führte zwar zu einer sauberen Umsetzung, jedoch deutlich langsamer als es beim Glycidol der Fall war.

Die Wahl fiel demnach auf (racemisches) Glycidol. Dieses gilt zwar immer noch als wahrscheinlich cancerogen, siedet aber deutlich höher als Epichlorhydrin und ist gut handhabbar. Im Gegensatz zu Epichlorhydrin kann es während der Reaktion keine störende Salzsäure freisetzen, die Zugabe einer Base beim Fällungsschritt durch Wasser fällt weg. Zudem ist es ausreichend günstig.

Weitere Parameter, die zur Erforschung bzw. Optimierung der Reaktion verändert wurden, waren unter anderem das Lösemittel, die Konzentration des Ansatzes, die Reaktionstemperatur sowie die Methode der Aufarbeitung.

Generell lief die Reaktion wie folgt ab: Azithromycin wurde in einen Dreihalskolben eingewogen und im angegebenen Lösemittel gelöst. Der Ansatz wurde auf die angegebene Temperatur erhitzt und über einen Tropftrichter langsam, über ca. 1 h, eine 1:1 Mischung aus einem Überschuss (ca. 30 Äquivalente) Glycidol und dem verwendeten Lösemittel zugetropft. Danach wurde für ca. 30 min in der Hitze weitergerührt und der Ansatz auf die angegebene Art aufgearbeitet.

Tabelle 3.1 zeigt eine Auflistung an erprobten Ansätzen und deren Unterschiede. Nicht gelistet sind Synthesen, bei denen vor dem Kristallisationsschritt oder der Säulenchromatographie mehrere Ansätze vereint wurden, oder bei denen die Mutterlauge von vorigen Versuchen zur Kristallisation verwendet wurde (da dann aufgrund der unbekanntenen Produktmenge in der Mutterlauge keine Ausbeute mehr angegeben werden kann). Ebenfalls nicht gezeigt sind Ansätze mit Einsatz geringerer Äquivalentmengen an Glycidol – diese wurden bereits vor dieser Arbeit getestet und führten stets zu niedrigeren Ausbeuten.

Tabelle 3.1: Unterschiedliche Ansätze für die Synthese von **58**.

Lösemittel	Volumen [ml pro g Azithromycin]	Temperatur [° C]	Aufarbeitung ^a	Sonstige Variation	Ausbeute [%]
iPrOH	5	90	F, SC, U	Glycidol komplett zugefügt statt tropfenweise	5
iPrOH	5	90	F, SC, U	/	20
iPrOH	7	90	F, SC, U	/	26
iPrOH	10	85	F, U	/	20
iPrOH	7	70	F, U	ON	21
iPrOH	7	90	F, U	ON	21
iPrOH	7	90	F, E, U	/	13
Toluol	7	100	F, U	Nicht kristallisierbar	verworfen
Toluol	10	Reflux	A, U	ON	18
iBuOH	7	80	E, SC	/	31
iBuOH	7	70	F, U	/	15
iBuOH	7	75	F, U	/	21
iBuOH	7	75	F, U	/	20
iBuOH	7	75	F, U	Verkürzte Reaktionsdauer (1 h inkl. Zutropfen)	24
iBuOH	7	75	F, U	1 Woche in H ₂ O gefällt	24
iBuOH	7	75	F, U	/	32
iBuOH	7	85	F, U	Kleinerer Ansatz (ca. 7 g Azithromycin)	22
iBuOH	7	90	F, U	/	23
iBuOH	2,3	90	F, U	/	5
iBuOH	10	90	F, U	/	28
iBuOH	7	115	F, U	Brauner, zäher Schlamm, nicht kristallisierbar	Verworfen, Aufreinigung problematisch
DMF	7	130	/	Schwarzfärbung, kein Produkt	Verworfen

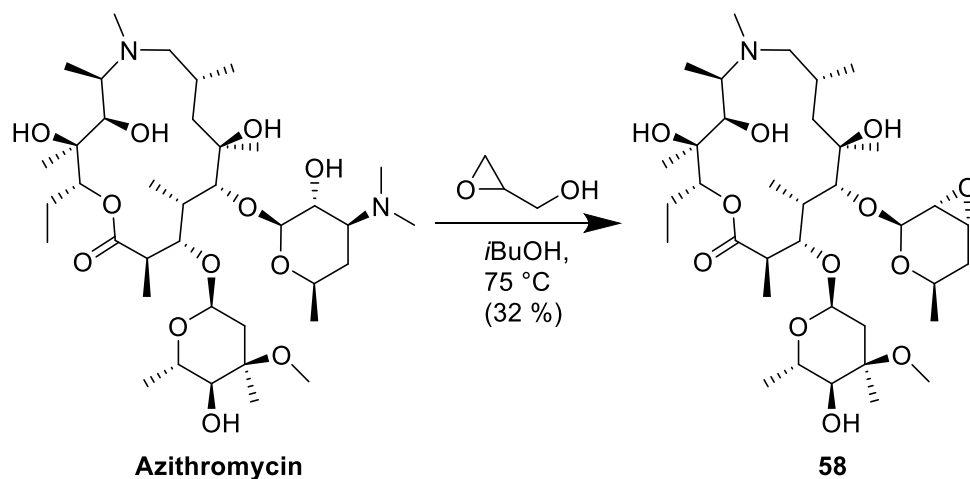
^aF = Aufkonzentration des Lösemittels, dann Fällung in H₂O über Nacht und anschließende Filtration; SC = Säulenchromatographie; U = Umkristallisation; ON = nach Glycidol-Zugabe über Nacht bei Raumtemperatur gerührt; A = org. Phase durch Ausschütteln mit NaHCO₃-Lösung aufgereinigt, dann einrotiert; E = mit H₂O/Ether ausgeschüttelt

Die Ausbeuten konnten trotz vielfältigen Optimierungsansätzen nur auf etwa 30 % gesteigert werden, was aber aufgrund der großen Ansätze ausreichend für die weiterführenden Synthesen war. Generell zeigte es sich als vorteilhaft, das Glycidol über den Verlauf einer Stunde langsam zuzutropfen, bei sofortiger Zugabe der gesamten Menge war die Ausbeute deutlich geringer. Die Reaktionsdauer nach Beendigung des Zutropfens scheint weniger entscheidend zu sein, sowohl eine kurze Dauer von ca. 15 min als auch das Rühren über Nacht (bei langsamer Annahme von Raumtemperatur) führten zu ähnlichen Ausbeuten.

Betreffend der Aufarbeitung wurde mit einer wässrig-organischen Extraktion mit Diethylether und anschließender Säulenchromatographie ein gutes Ergebnis erzielt, das jedoch unter ähnlichen Bedingungen durch Fällung in Wasser und anschließendes Umkristallisieren des Niederschlags in Methanol ebenfalls erzielt wurde. Für die Mehrheit der Versuche wurde demzufolge letztere, weniger aufwändige Methode der Aufreinigung verwendet. Zur Fällung des Rohprodukts wurde üblicherweise über Nacht in Wasser gerührt, eine Verlängerung dieser Dauer auf eine Woche hatte keinen zusätzlichen Nutzen.

Als Lösemittel waren sowohl Isopropanol als auch Isobutanol gut geeignet. Die Reaktionen mit Toluol führten zu geringeren Ausbeuten bzw. zähen, schlecht aufzuarbeitenden Reaktionsansätzen. Als ungeeignet erwies sich ebenfalls – anders als in der Patentvorschrift – DMF, das zur Bildung schwarzer Nebenprodukte führte und mitunter exotherm reagierte. Ohnehin wäre es aber aufgrund seines hohen Siedepunktes weniger praktisch für die gängige Aufarbeitungsmethode gewesen, bei der vor dem Fällungsschritt zunächst der Großteil des organischen Lösemittels im Vakuum entfernt wird. In der Hoffnung auf ein geringeres Potential für unerwünschte Nebenreaktionen wurde für die meisten Synthesen dem sterisch etwas anspruchsvolleren Isobutanol der Vorzug über Isopropanol gegeben. Das Volumen an Lösemittel durfte zudem nicht zu gering ausfallen, zu stark konzentrierte Lösungen führten ebenfalls zu geringeren Ausbeuten.

Die Reaktionstemperatur sollte im Bereich von 70 bis 90 °C liegen. Schon bei diesen Temperaturen wurde in gewissem Ausmaß die Bildung eines zähen, schlammigen Nebenprodukts beobachtet, welches die Aufarbeitung mitunter erheblich störte. Dieser Prozess gewann bei noch höheren Temperaturen zunehmend an Bedeutung und sollte vermieden werden. Denkbar ist, dass sich unter diesen Bedingungen Polymere aus dem im Überschuss eingesetzten Glycidol bilden.



Schema 3.7: Synthese von **58** aus Azithromycin. Dargestellt ist die am häufigsten verwendete Methode mit racemischem Glycidol in Isobutanol bei mäßiger Hitze.

Die in **Schema 3.7** dargestellte Struktur wurde zunächst durch die Aufnahme von 2D NMR-Spektren (**Anhang, 7.2.1**) analysiert. Zusätzlich wurden durch mehrfache aufeinanderfolgende Umkristallisationsschritte ausreichend große und reine Kristalle gezüchtet, um diese röntgenkristallographisch untersuchen zu lassen. Wie in **Abbildung 3.5** ersichtlich, konnten die Epoxidierung an der 2'- und 3'-Position sowie die dortige Stereochemie bestätigt werden.

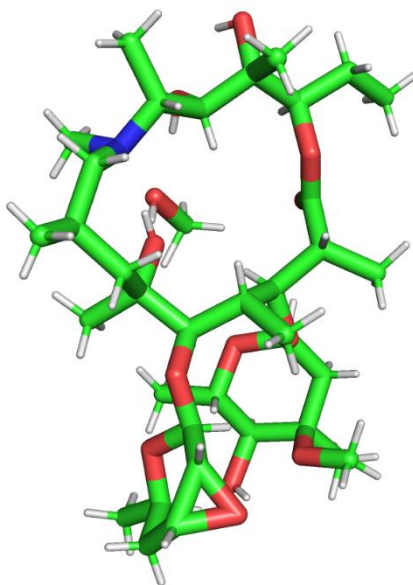
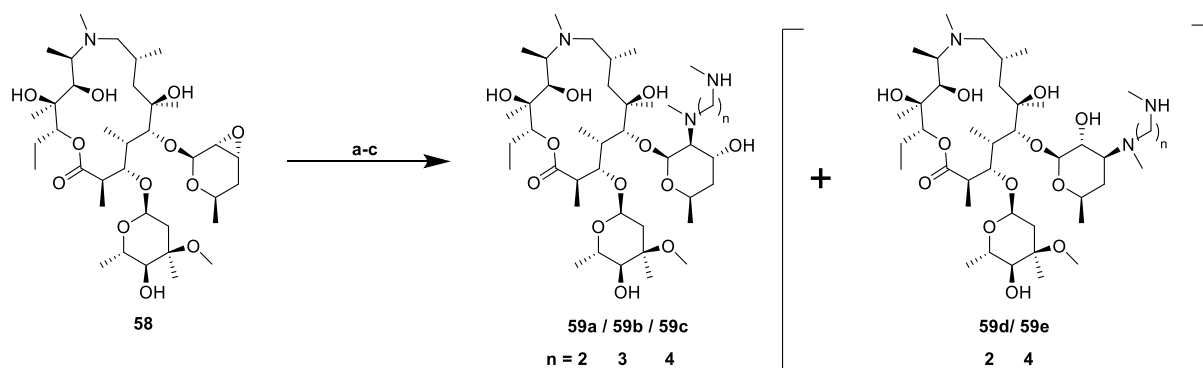


Abbildung 3.5. Struktur von **58** und einem kokristallisierten Molekül Methanol (mittig) anhand der durch Röntgenkristallographie erhaltenen Daten. Unten gut sichtbar ist das synthetisch veränderte Desosamin, das nun an Position 2' und 3' ein R,R-Epoxid aufweist. Die kristallographischen Daten sind über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif abrufbar (Hinterlegungsnummer 2121076).

3.3.2 Nukleophiler Angriff am 2'-/3'-Epoxid



Schema 3.8: Synthese 2'-substituierter Azithromycin-Derivate aus **58**. (a) *N,N*-dimethylethylendiamin, 60 °C (66 %); (b) *N,N*-dimethyl-1,3-diaminopropan, 105 °C (46 %); (c) *N,N*-dimethyl-1,3-diaminobutan, *i*PrOH, 95 °C (10 %)

Das in der vorigen Reaktion erhaltene Epoxid **58** wurde im nächsten Schritt wieder mit verschiedenen Nukleophilen geöffnet. Auf diese Art sind nicht nur Makrolid-basierte Konjugate synthetisch zugänglich, sondern auch z.B. nicht-antibiotische, aber noch immer immunomodulatorisch wirksame Azithromycin-Derivate oder Trägerstoffe für kurzkettige Fettsäuren.^{90,97}

Die Öffnung des Epoxids wurde mit sekundären Aminen verschiedener Kettenlängen durchgeführt; es wurden dabei methylierte Amine verwendet, da längere *N*-Substituenten für unerwünschte sterische Hinderung und erhöhte Lipophilie des Produkts gesorgt hätten. Die Reaktion erfolgt im Sinne einer S_N2 Reaktion unter Umkehr der Stereochemie an 2' bzw. 3' Position des Desosamin-Zuckers. In Abhängigkeit der Größe des angreifenden Nukleophils fallen die beiden möglichen Produkte in unterschiedlichen Verhältnissen an: Der Angriff an der 2' Position ist aus sterischen Gründen nur für kleinere Nukleophile günstig. Diese ist dafür vergleichsweise reaktiver als die 3'-Position gegenüber nukleophilen Angriffen.

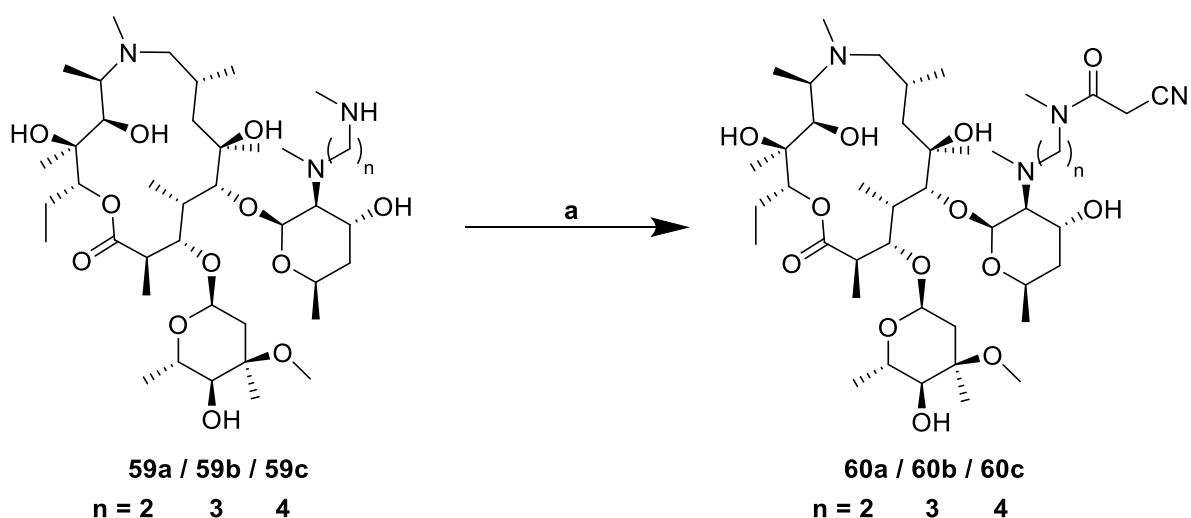
Es wurden Linker verschiedener Kettenlänge zwischen Makrolid und JAK-Warhead eingeführt. Die verwendeten Diamine wurden – je nach deren Preis – entweder direkt als Lösemittel, oder in geringem Überschuss in *i*PrOH verwendet.

Zunächst wurde die Reaktion mit *N,N*-dimethylethylendiamin über Nacht durchgeführt; dieses war günstig genug, um gleichzeitig als Lösemittel und Base verwendet zu werden, und reagierte bereits bei 60 °C. Bei der Reaktion entstanden sowohl das an Position 2' als auch das an Position 3' *N*-substituierte Produkt, ersteres dabei in ca. 4-fach größerer Menge. Die beiden Produkte waren gut säulenchromatographisch voneinander trennbar und wurden – da sie leider nicht kristallisierbar waren – durch 2D NMR identifiziert (2D Spektren sind im **Anhang, 7.2.1** zu finden). Es wurde hauptsächlich mit dem an 2' Position geöffneten **59a** weitergearbeitet, da dieses dem Azithromycin weniger ähnlich ist und, wie bereits in der Einleitung erwähnt, nicht mehr antibiotisch wirksam sein dürfte. Das 3'-Äquivalent **59d** wurde später ebenfalls weiter zu einer fertigen Testsubstanz umgesetzt, um die Auswirkungen beider Öffnungsmuster auf Hemmaktivität und PK zu ermöglichen.

Das homo-Analogon, N,N'-Dimethyl-1,3-diaminopropan, wurde in einer ähnlichen Reaktion ebenfalls im Überschuss eingesetzt, allerdings war hier eine höhere Reaktionstemperatur von ca. 105 °C nötig. Es wurden ebenfalls zwei Produkte erhalten und das 2'-Produkt zur weiterführenden Synthese isoliert. Der Polaritätsunterschied der beiden Isomere war hierbei allerdings deutlich geringer, was die Trennung erschwerte und für niedrigere Ausbeuten sorgte.

Die Synthese mit N,N'-Dimethyl-1,4-diaminobutan wurde ebenfalls in *PrOH* unter Refluxbedingungen durchgeführt. Bei der Reaktion kam es zur Bildung substantieller Mengen eines Nebenproduktes, dessen Masse einem Konjugat aus zwei Molekülen des Epoxids **58** und einem Molekül des Diamins entspricht. Eine ähnliche Nebenreaktion fand bei den vorigen, kürzerkettigen Analoga vermutlich aufgrund stärkerer sterischer Hinderung nicht statt. Wie zuvor bei der Synthese von **59a** konnten sowohl das 2'- (**59c**) als auch das 3'-Öffnungsprodukt (**59e**) isoliert und über 2D-NMR identifiziert werden. Das sterisch weniger anspruchsvolle 3'-substituierte Produkt entstand in größerer Menge als das 2' Produkt, ihre Verhältnisse betragen ca. 2,5:1.

3.3.3 Amidbildung mit Cyanessigsäure zu Cyanacetamiden



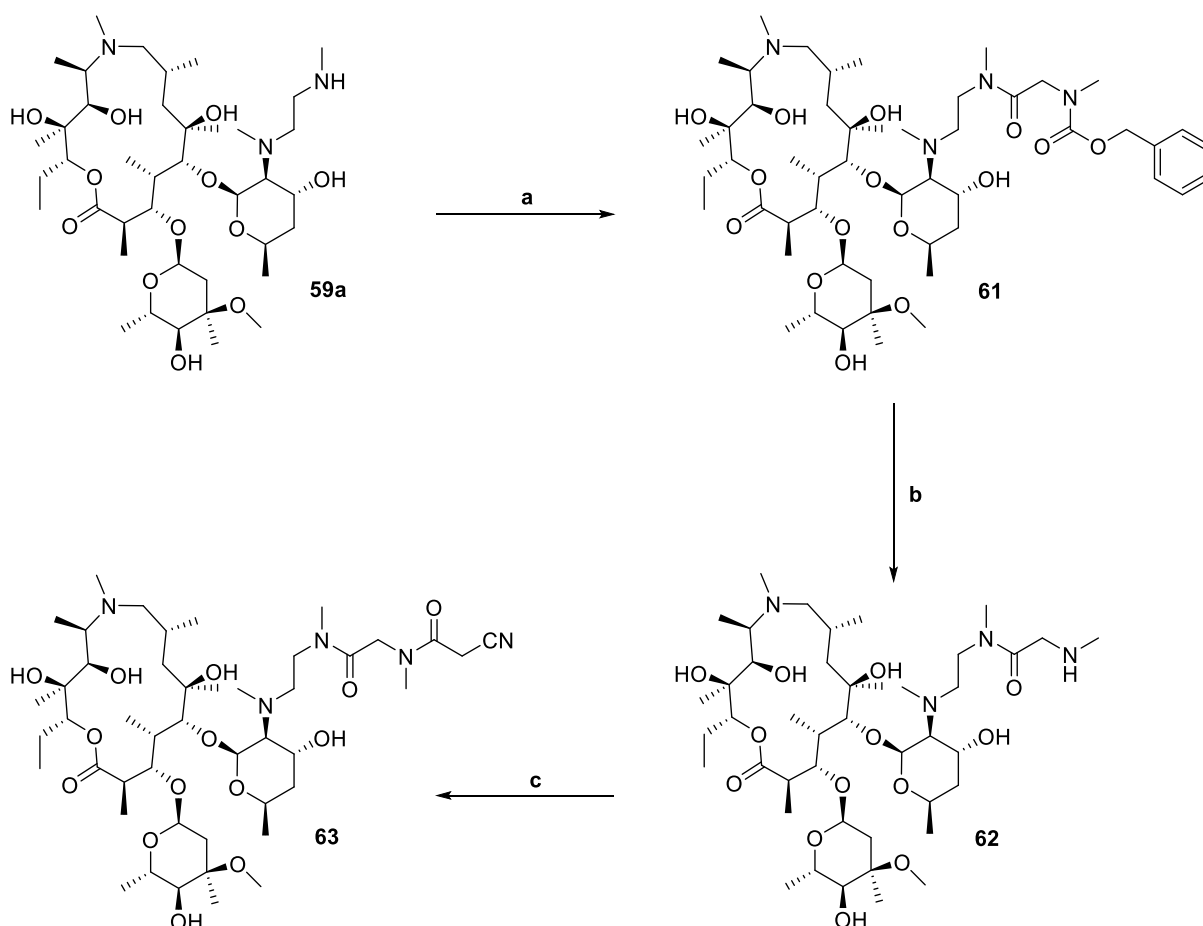
Schema 3.9: HATU-vermittelte Amidbildung des zuvor erhaltenen Amins mit Cyanessigsäure unter basischen Bedingungen. (a) Cyanessigsäure, HATU, Et_3N , THF, rt (64-90 %)

In einer Folgereaktion wurden die 2' substituierten Azithromycin-Derivate mit Cyanessigsäure zu den für die Knoevenagel-Reaktion mit den JAK3-Warheads benötigten Cyanacetamiden umgesetzt. Zunächst wurde Cyanessigsäure unter basischen Bedingungen mit HATU aktiviert und dann mit dem entsprechenden sekundären Amin zur Reaktion gebracht. Dieser Schritt wurde üblicherweise bei Raumtemperatur über Nacht ausgeführt. Bei der unter milden Bedingungen ablaufenden Reaktion sollte möglichst wasserfrei gearbeitet werden, weswegen trockene Lösemittel verwendet wurden. Üblicherweise wird für HATU-vermittelte Amidkupplungen DMF als Lösemittel eingesetzt, in diesem Falle wurde aber auf THF

zurückgegriffen. Zwar wurde hierdurch teilweise in Suspension gearbeitet, aber dafür eine einfache Aufarbeitung ermöglicht und gute Ausbeuten erzielt.

Die im vorigen Schritt erhaltenen, 3'-substituierten Nebenprodukte **59d** und **59e** wurden ebenfalls mit Cyanessigsäure umgesetzt (**60d** und **60e**, siehe **6.5**). Im Gegensatz zu den 2'-Analoga gerieten die Reaktionen aus unbekanntem Gründen oft ins Stocken bzw. liefen auch unter Zugabe mehrerer Äquivalente der aktivierten Säure nicht vollständig ab. Dementsprechend niedrig waren die Ausbeuten. Die Produkte konnten dennoch erfolgreich im nächsten Schritt mit dem JAK-Warhead **7a** konjugiert werden, sodass der Vergleich der 2'-substituierten Inhibitoren **13** und **44** mit den jeweiligen 3'-Analoga **47** und **46** ermöglicht wurde.

3.3.4 Darstellung des Knoevenagel-Partners **63**:

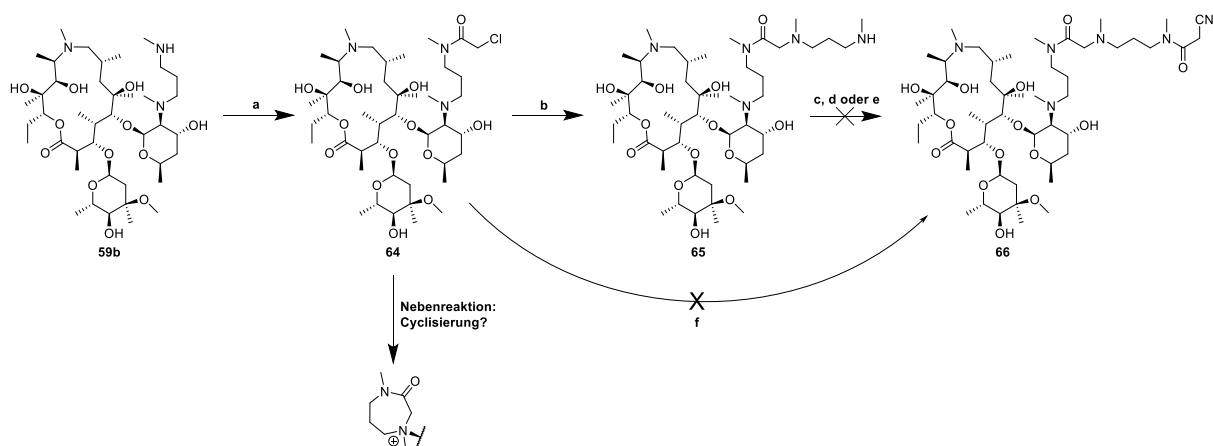


Schema 3.10: Darstellung des Makrolid-Derivats **63** als Edukt für die Knoevenagel-Reaktion mit **7a** oder **7h**. (a) *Z*-Sar-OH, HATU, Et₃N, THF, rt (73 %); (b) H₂, Pd-C, EtOAc, rt (49 %); (c) Cyanessigsäure, HATU, Et₃N, THF, rt (80 %).

Die Synthese des über ein weiteres Amid mit dem Cyanacetamid verknüpften Carriers **63** erfolgte ausgehend von **59a** und ist in **Schema 3.10** dargestellt: Zunächst wurde am Stickstoff geschütztes Sarkosin nach Aktivierung mit HATU an das sekundäre Amin

von **59a** gekoppelt; die Reaktionsbedingungen waren analog zu den oben bereits erwähnten und führten zu ausreichenden Ausbeuten. Die zur Schützung von Aminen verwendete Z-Schutzgruppe wird bevorzugt hydrogenolytisch oder unter Einsatz von Bromwasserstoffsäure und Essigsäure entschützt. In diesem Falle wurde mit Wasserstoff und Pd-C als Katalysator analog zum bereits in Kapitel **3.1** beschriebenen Hydrierungsschritt gearbeitet. Die Verwendung von Palladium ist hier von Bedeutung: Zunächst wurde die Reaktion mit Platin getestet, welches sich zur Entschützung der Z-Gruppe als ungeeignet herausstellte und zu keiner Umsetzung führte. Die Ausbeute fiel aber auch unter Einsatz von Palladium auf Aktivkohle mit 49 % unerwartet schlecht für eine katalytische Hydrierung aus. Ein potentieller Grund hierfür könnten Probleme bei der Aufarbeitung, z.B. Rückstände auf dem Celite-Pad (beim Filtrationsschritt) oder Adsorption an die Kohle sein, jedoch wurden diese gründlich mit EtOAc nachgespült. Nebenprodukte oder andere entstandene Verunreinigungen wurden nicht detektiert. Nach erfolgreicher Entschützung erfolgte dann erneut die HATU-vermittelte Bildung eines Amids aus **62** und Cyanessigsäure unter den bereits etablierten Bedingungen.

3.3.5 Weitere Syntheseansätze für Makrolid-Spacer:



Schema 3.11: Versuchte Synthese eines *N*-methyl-2-(methyl(3-(methylamino)propyl)amino)-*N*-3-(methylamino)propyl)acetamid-Linkers zwischen Desosamin und Cyanacetamid. (a) Chloressigsäurechlorid, Et_3N , DCM, 0 °C zu rt (73 %); (b) *N,N'*-dimethyl-1,3-diaminopropan, THF, rt (52 %); (c) Cyanessigsäure, HATU, Et_3N , THF, rt (keine Umsetzung); (d) Ethylcyanoacetat, Et_3N , THF, 50 °C (keine Umsetzung); (e) Cyanessigsäure, HATU, Et_3N , MeCN, 50 °C (keine Umsetzung); (f) 2-cyano-*N*-methyl-*N*-(3-(methylamino)propyl)acetamid, K_2CO_3 oder DIPEA, MeCN, rt (keine Umsetzung).

Um einen noch längeren Spacer zwischen Makrolid und JAK3-Warhead zu generieren, wurde die in **Schema 3.11** aufgezeigte Synthese unternommen.

Zunächst wurde das sekundäre Amin **59b** (s.o.) mit Chloressigsäurechlorid zur Reaktion gebracht, um das 2-chloracylierte **64** zu erhalten. Problematisch bei der Synthese von **64** mit Chloressigsäurechlorid war, dass die Reaktion ab einem gewissen Zeitpunkt ins Stocken geriet und keine weitere Umsetzung mehr detektierbar war. Eine erneute Zugabe von Chloressigsäurechlorid führte zwar zu weiterer Umsetzung des Edukts, jedoch wurden bei den Reaktionskontrollen per MS auch *m/z* Verhältnisse detektiert, die auf ein doppelt chloracyliertes Produkt hindeuten. Die Reaktion wurde

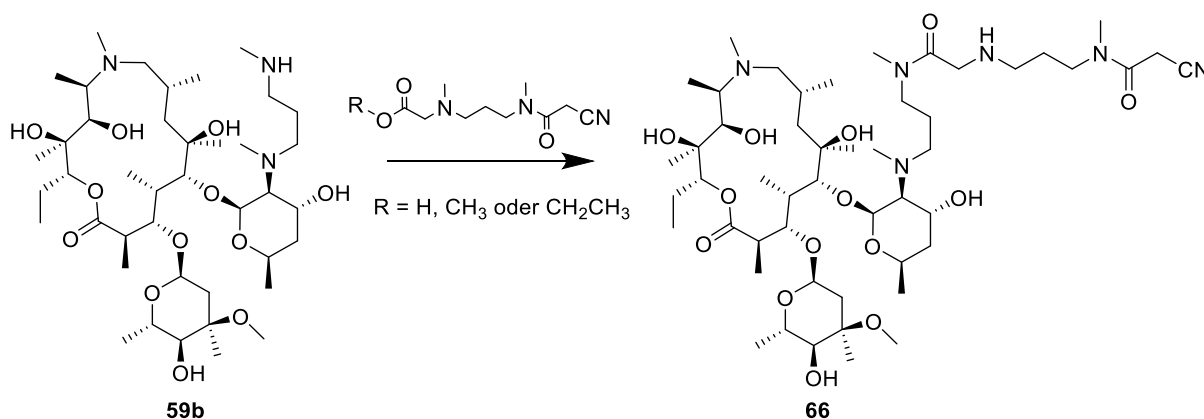
deswegen vorzeitig abgebrochen und noch nicht umgesetztes Edukt nach erfolgreicher Flash-Chromatographie zurückgewonnen. Ungünstig am erhaltenen Produkt war dessen Instabilität: Vor allem im Zuge der nachfolgenden Reaktionen wurde die fortschreitende Umsetzung zu einem Nebenprodukt beobachtet, dessen m/z und hohe Polarität vermutlich einer Cyclisierung unter Abspaltung von Chlorid (Verlust des Isotopenmusters) entsprachen. Besagtes Nebenprodukt wurde aber nicht isoliert oder näher charakterisiert.

Das erhaltene Chloracetamid **64** wurde anschließend mit einem Überschuss N,N'-dimethyl-1,3-diaminopropan versetzt und in wenig THF bei Raumtemperatur zu **65** umgesetzt. Die Ausbeute fiel hierbei – vermutlich aufgrund der erwähnten Nebenreaktion – mit 52 % eher gering aus. Aufgrund der nur geringen Unterschiede in den Retentionszeiten der vorliegenden Stoffe gelang auch keine ausreichend gute Aufreinigung, um die Struktur per NMR zu bestätigen. Dennoch wurde versucht, das Rohprodukt im Folgeschritt zu **66** umzusetzen.

Nachdem die Bildung von Amid-Derivaten der Makrolide mit Cyanessigsäure und HATU bisher gute Erfolge und Ausbeuten gezeigt hatte, wurde auch für den letzten Syntheseschritt zu **66** zu dieser Methode gegriffen. Es wurde aber unter diesen Bedingungen keine Umsetzung zum gewünschten Produkt festgestellt. Ein Wechsel des Lösemittels zu Acetonitril und Zuführen von Wärme (50 °C) führten ebenfalls nur zu sehr schwacher Umsetzung. Letztlich wurde versucht, auf die Aktivierung der als gelegentlich problematisch bekannten Cyanessigsäure zu verzichten und stattdessen deren Ethylester zu verwenden. Auch hier wurde – selbst nach einer Woche Reaktionszeit unter Wärmezufuhr – keine über Spuren hinausgehende Menge an Produkt detektiert.

Auch die direkte Umsetzung von **64** mit 2-Cyano-N-methyl-N-(3-(methylamino)propyl)acetamid führte nicht zum gewünschten Ziel: In drei verschiedenen Probeansätzen (Variation der Base von DIPEA zu K_2CO_3 bzw. Einsatz verschiedener Edukt-Batches) wurde vor allem das bereits erwähnte Nebenprodukt von **64** detektiert und allenfalls schwache Signale von zum Produkt passenden Massen.

Weitere Versuche zur Synthese von **66** waren nicht mehr innerhalb des Rahmens dieser Arbeit möglich. Eine Option wäre jedoch z.B. die Synthese eines N-(3-(2-cyano-N-methylacetamido)propyl)-sarkosin Bausteines (bzw. eines Esters hiervon, **Schema 3.12**), der direkt mit **59b** verknüpft wird.



Schema 3.12: Vorschlag zur direkten Synthese von **66** aus **59b** unter Einsatz von *N*-(3-(2-cyano-*N*-methylacetamido)propyl)-sarcosin bzw. dessen Ester.

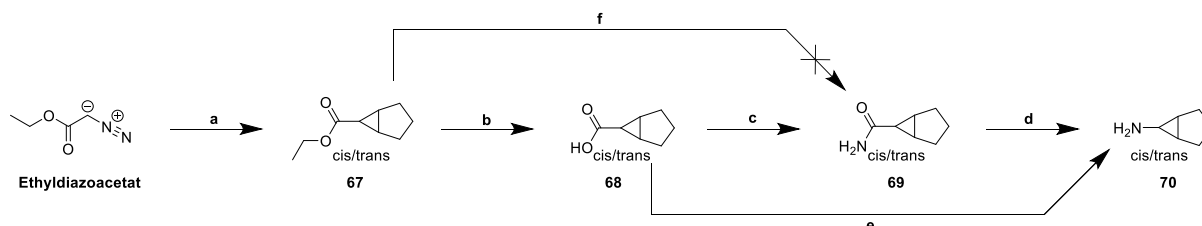
3.4 Synthese neuer Cycloalkylamine zur Einführung metabolisch stabiler Seitenketten

Nachdem durch Pharmakokinetikstudien erfolgreich gezeigt wurde, dass die Modifikation der Cyclohexyl-Seitenkette (z.B. durch Austausch durch einen Aromaten oder Einsatz gespannter Ringsysteme wie Cyclopropyl) zu einer verlängerten *in vivo* Plasmahalbwertszeit und Stabilität führt (Kapitel **4.1**), wurden weitere Seitenketten in Erwägung gezogen. Problematisch an den Testverbindungen mit Phenyl-Seitenkette (**30-33**) als auch jenen mit Cyclopropyl-Seitenkette (**29**) war der Verlust an Aktivität im enzymatischen JAK3-Assay um ca. eine Zehnerpotenz. Grund für den Wirkverlust könnte im Falle der ersteren Stoffklasse eine verminderte Flexibilität sein, die das Adressieren der JAK-Selektivitätstasche erschwert. Im Falle von **29** wiederum ist zu erwarten, dass das kleinere Ringsystem die Bindetasche nur unzureichend ausfüllt und weniger aktivitätssteigernde Wechselwirkungen vorliegen. Der gleiche Effekt wurde bereits bei den von Michael Forster synthetisierten Verbindungen beobachtet, wo der Austausch der Cyclohexylgruppe durch einen Methylrest zu einem ca. 40-fachen Aktivitätsverlust führte.⁷²

Die Stabilitäts-Steigerung durch Einführung der erwähnten Gruppen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass zur Desalkylierung des Ringsystems zunächst das an dem zum Imidazol verknüpfenden Kohlenstoff befindliche Proton abstrahiert werden muss. Durch Austausch mit einem sp^2 -Kohlenstoff (ohne Proton, **30-33**) bzw. durch ein stark gespanntes Ringsystem (**29**) kann so die Desalkylierung der Seitenkette verhindert bzw. stark erschwert werden.⁹⁸

Zwei Ansätze wurden zur Synthese von Seitenketten verfolgt, die eine gute Adressierung der JAK-Selektivitätstasche und metabolische Stabilität vereinen sollten: Zum einen sollte ein überbrückter gesättigter Ring, Bicyclo[3.1.0]hexan eingeführt werden, dessen „vulnerables“ Proton sich in einem System mit hoher Ringspannung aufhalten sollte. Zum anderen war vorgesehen, das an dieser Stelle befindliche Proton durch eine Methylgruppe zu ersetzen (und im Gegensatz zum Einsatz eines Aromaten die Flexibilität des Ringsystems zu erhalten).

3.4.1 Synthese von Bicyclo[3.1.0]hexan-6-amin (**70**)



Schema 3.13: Synthese von **70**. (a) Cyclopenten, Rhodium(II)acetat (kat.), DCM, rt; (b) KOH, EtOH, reflux (91 %); (c) CDI, konz. NH₃, DMF, 0 °C → rt (35 %); (d) NaOH, NaClO, H₂O, 0 °C → rt → 60 °C (31 %); (e) 1: Chlorameisensäuremethylester, NaN₃, Et₃N, H₂O/Aceton, 0 °C; 2: Toluol, 100 °C; 3: HCl, rt (47 %); (f) NH₃, MeOH, Δ (keine Umsetzung).

Die Synthese von **70** (**Schema 3.13**) ausgehend von Ethyldiazoacetat ist über mehrere Schritte möglich: Zunächst wurde der Bicyclus **67** unter Einsatz von Cyclopenten und katalytischen Mengen von Rhodium(II)acetat unter Schutzgas dargestellt.⁹⁹ Bei der Reaktion ist explizit auf eine langsame Zugabe, idealerweise über mehrere Stunden, des reaktiven Ethyldiazoacetats zu achten. Es erwies sich als günstig, im Laufe der Reaktion erneut frischen Katalysator zuzugeben, was auch visuell anhand der Gasentwicklung durch freigesetzten Stickstoff zu beobachten war. Nach Filtration des Katalysators wurde das Reaktionsgemisch im Kugelrohr unter reduziertem Druck bei ca. 150 °C destillativ aufgereinigt. Eine höhere Temperatur ist nicht zu empfehlen, da ab ca. 210 °C die Zersetzung zu braun-schwarz gefärbten Abbauprodukten beobachtet wurde. Leider war das Produkt(gemisch) mit den vor Ort verfügbaren analytischen Methoden (MS, HPLC) nicht identifizierbar, konnte jedoch indirekt durch die Charakterisierung der später erhaltenen Stoffe **70** und insbesondere **3h** bestätigt werden (s.u., **Abbildung 3.8**). So wurde dort vor allem das *trans*-Produkt isoliert, während das *cis*-Produkt in deutlich geringeren Mengen (ca. 5-10 %, geschätzt anhand der ELSD-Peakverhältnisse bei der flash-chromatographischen Aufreinigung von **3h** bzw. den hierbei erhaltenen Mengen) anfiel.

Im darauffolgenden Schritt wurde der Ester in ethanolischer KOH unter Reflux zur freien Säure **68** hydrolysiert.^{99,100} Da wie schon bei der Vorstufe eine Detektion bzw. Charakterisierung mit den vorhandenen technischen Mitteln nicht möglich war, wurde das nach der extraktiven Aufarbeitung erhaltene Öl direkt zur nächsten Stufe genommen.

Von **68** ausgehend war das gewünschte Amin **70** über zwei Wege zugänglich: Zunächst wurde die Bildung eines Amids mit darauffolgender Hofmann-Umlagerung getestet. Hierzu wurde die freie Säure unter milden Bedingungen mit CDI aktiviert und über Nacht mit konzentriertem Ammoniak umgesetzt und anschließend extraktiv wässrig-sauer/organisch aufgereinigt. Die Ausbeute fiel mit 35 % leider gering aus, was z.B. auf nicht optimierte Aufreinigungsmethoden oder mangelnde Reinheit des Edukts **68** zurückführbar sein könnte. Problematisch waren auch Rückstände des Lösemittels DMF in der organischen Phase, die nur langsam durch Verdampfen im Vakuum bei > 50 °C entfernt werden konnten.

Das Amid **69** war zwar im Gegensatz zu den Vorstufen gut per MS detektierbar, ergab aber dennoch kein Signal in den UV- bzw. ELSD-Detektoren des genutzten HPLC-Stacks. Eine NMR-Analyse bestätigte die Struktur und das Vorhandensein leichter Verunreinigungen. Das erhaltene Produkt konnte in Wasser und wenig Ethanol durch einige Tage Lagerung bei RT kristallisiert werden. Eine Röntgenanalyse der farblosen Nadeln ergab, dass die Substituenten vom Dreiring aus betrachtet *trans*-ständig zueinander waren (**Abbildung 3.6**). Allerdings kann dadurch noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob dies auf das gesamte erhaltene Produkt(gemisch) zutrifft, da nicht chromatographisch auf die Anwesenheit bzw. Quantität des anderen Isomers geprüft werden konnte und womöglich nur eines kristallisierbar war.

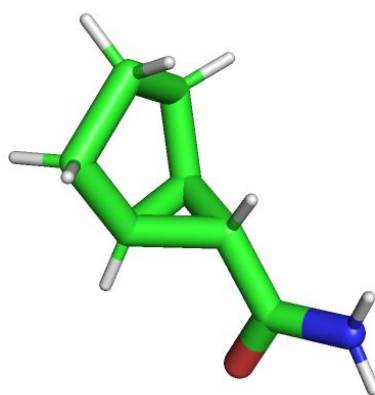


Abbildung 3.6: Röntgenkristallographisch ermittelte Struktur der aus EtOH/Wasser gewonnenen Kristalle von **70**.

Eine direkte Ammonolyse von **67** zu **69** mit methanolischem Ammoniak, was einen Reaktionsschritt eingespart hätte, führte leider nicht zum gewünschten Produkt. Selbst unter Reaktion im Druckrohr und Hitzezufuhr konnte keine zu **69** passende Masse detektiert werden.

Die Hofmann-Umlagerung des Amids zu **70** gelang unter Einsatz von Natriumhypochlorit und schwacher Hitze. Zur Aufreinigung wurde das Rohprodukt einer Wasserdampfdestillation unterzogen und, durch Beschicken der Vorlage mit HCl-Lösung, als Hydrochlorid gewonnen. Die Ausbeute ließ mit 31 % zu wünschen übrig, die Reaktion wurde aber im Weiteren nicht mehr optimiert.

Als günstiger erwies sich die Curtius-Reaktion von **68** zu **70**, da so eine Reaktion eingespart wurde und sich so auch die Gesamtausbeute verbesserte.¹⁰⁰ Zur Durchführung der Reaktion wurde die Säure durch Chlorameisensäuremethylester zum gemischten Anhydrid aktiviert und anschließend mit Natriumazid zum Carbonsäureazid umgesetzt. Dieses Intermediat wurde in Toluol extrahiert, gereinigt und wieder aufkonzentriert. Durch langsame Zugabe zu einem auf ca. 100 °C erhitzten Kolben wurde die Umlagerungsreaktion gestartet. Danach wurde das entstandene Isocyanat mit konzentrierter HCl zum gewünschten Amin umgesetzt und gleichzeitig als Hydrochlorid gefällt. Nach einem weiteren Extraktionsschritt mit n-Pentan und 10

%iger Kalilauge wurde das Rohprodukt im Kugelrohr destilliert. Die wiederholten, aufwändigen Extraktionsschritte und die Destillation gingen zu Lasten der Ausbeute, die knapp unter 50 % ausfiel.

Bei den Synthesewegen zu **70** wurden wie bereits erwähnt Isomerengemische erhalten; eine Aufreinigung auf dieser Stufe wäre deutlich aufwendiger gewesen als nach der S_{N_Ar} -Reaktion mit dem 7-Azaindol-Grundgerüst. Das cis/trans-Gemisch wurde also analog zu den bisher eingesetzten Aminen mit **2** zur Reaktion gebracht und die dort nach dem Fällungsschritt erhaltenen Produkte isoliert.

Die Auswertung der NMR-Spektren der zwei isolierten Produkte führte zu keinem klaren Ergebnis bezüglich der Stereochemie an der eingeführten Seitenkette: Die gemessenen $^3J_{H,H}$ -Kopplungskonstanten der relevanten Protonen passten – unter Betrachtung der Karplus-Beziehung – weder zu den erwarteten Winkeln der *cis*-, noch denen der *trans*-Konfiguration.

Zur eindeutigen Aufklärung der Struktur von **3h** wurden deshalb Kristalle des Hauptprodukts in Chloroform/Methanol gezüchtet, um diese per Röntgenkristallographie zu analysieren.

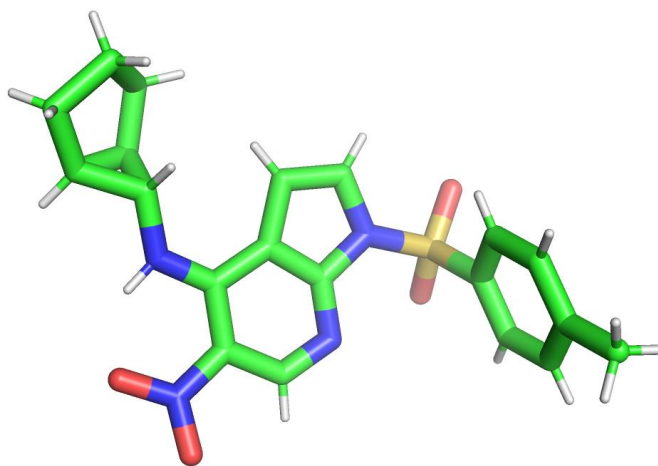
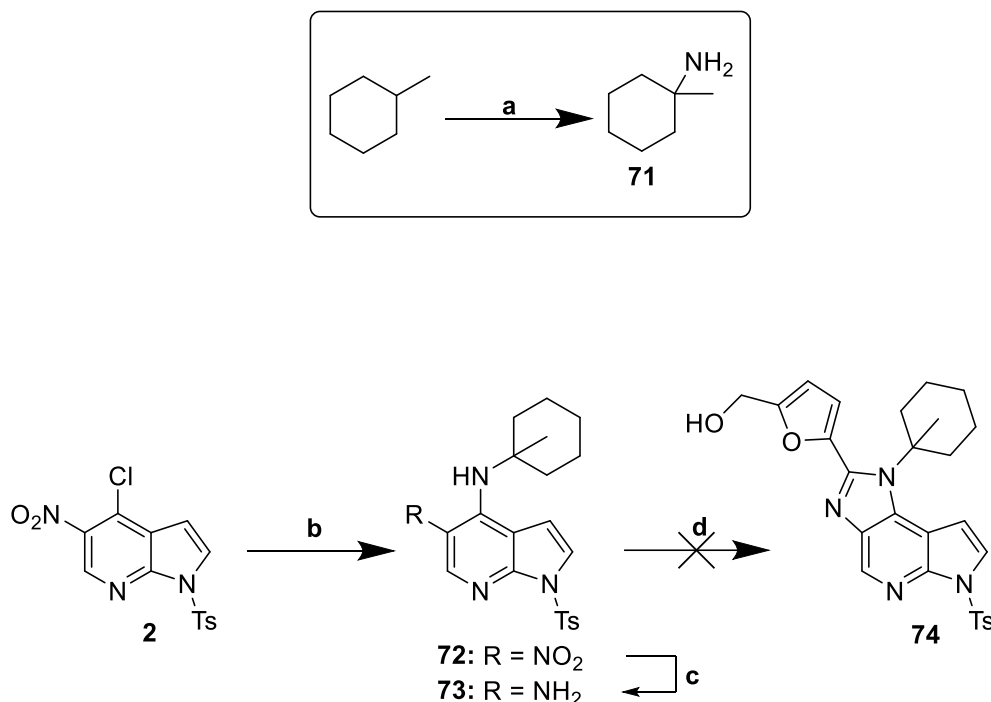


Abbildung 3.7: Struktur von **3h**, ermittelt anhand von röntgenkristallographischen Aufnahmen. Der cyclopentylische Teil der Seitenkette und die zum Azaindol verbindende Aminogruppe sind *trans*-ständig zueinander. Die kristallographischen Daten sind über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif abrufbar (Hinterlegungsnummer 2192391).

Wie **Abbildung 3.7** zeigt, liegt die Seitenkette *trans*-konfiguriert vor. Dies war insofern wünschenswert, dass von dieser Konfiguration ein besserer Fit für die JAK-Selektivitätstasche erwartet wurde.

3.4.2 Synthese von 1-Methyl-cyclohexylamin und Folgereaktionen

Als alternative „metabolisch optimierte“ Seitenkette wurde ein an Position 1 methylierter Cyclohexylrest angedacht. Wie schon bei den mit Phenylresten substituierten Inhibitoren war das Ziel die Einführung einer Seitenkette ohne das metabolisch angreifbare Proton. Zu diesem Zwecke musste zunächst das zu verwendende 1-methyl-cyclohexylamin **71** synthetisiert werden (**Schema 3.14**):^{101,102}



Schema 3.14: Synthese von **71** und Folgereaktionen. (a) NCl_3 , AlCl_3 , DCM, $-5 - 5^\circ\text{C}$; dann aq. HCl, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ (42 %); (b) **72**, Et_3N , *i*PrOH, reflux (81 %); (c) H_2 , Pt-C, EtOAc (96 %); (d) 5-hydroxymethylfurfural, KHSO_5 , DMF, H_2O , rt (keine Umsetzung).

Das für die Reaktion benötigte hochreaktive Trichloramin wurde *in situ* aus Ammoniumchlorid und Calciumhypochlorit in salzsaurer Lösung generiert. Über ein Trockeneis-Aceton-Bad wurde dabei eine Innentemperatur von $0-10^\circ\text{C}$ eingehalten. Das entstandene NCl_3 wurde als Teil der organischen Phase abgetrennt und war in dieser Form gut handhabbar. Die gewonnene Lösung in DCM wurde dann in einem Folgeschritt langsam zu einer auf ca. 0°C gekühlten Suspension aus Methylcyclohexan und dem Katalysator AlCl_3 gegeben. Reaktionskontrollen per MS ergaben hierbei schon erste Produktpeaks, vermutlich aufgrund intermediär entstandener HCl (s.u.). Durch Gießen auf eisgekühlte konzentrierte HCl erfolgte dann die vollständige Umsetzung zum Produkt.

Als Reaktionsmechanismus diskutiert wird die Entstehung eines Chloronium-Ions durch Interaktion des verwendeten Trichloramins mit dem Katalysator. Das Cl^+ -Ion abstrahiert ein Hydridion vom tertiären Kohlenstoff des Methylcyclohexans. Das daraus resultierende Carbokation wird dann nukleophil durch NCl_2^- angegriffen. Zuletzt folgt

die rasche Umsetzung zum primären Amin mithilfe von (zusätzlich zugegebener sowie bereits gebildeter) HCl.¹⁰²

Problematisch bei der extraktiven Aufarbeitung war zunächst die Schwarzfärbung beider Phasen, deren Phasengrenze aber durch starke Beleuchtung identifizierbar war. Das in der organischen Phase befindliche Produkt wurde durch saure und darauffolgende basische Extraktion gereinigt, vorsichtig aufkonzentriert und zuletzt unter reduziertem Druck in eine eisgekühlte Vorlage destilliert.

Die MS-Analyse des Produkts zeigte geringfügige Verunreinigungen mit einer im Vergleich zum Produkt um zwei Protonen leichteren Masse, was auf eine ungesättigte Verbindung hindeuten könnte. Auch in der Literatur werden Cycloalkene als potentielle Nebenprodukte aufgeführt.¹⁰² Dies wurde in Kauf genommen, da die Unsatigung erwartenswerterweise bei der später folgenden katalytischen Hydrierung reduziert werden dürfte.

Die S_NAr -Reaktion des Amins mit **2** verlief problemlos unter den gewohnten Bedingungen. Auch hier wurden geringfügige Mengen eines Nebenprodukts detektiert, dessen Masse auf eine Unsatigung hindeutete. Bei der darauffolgenden Hydrierungsreaktion zu **73** wurde keinerlei solches Nebenprodukt mehr detektiert, was den Verdacht erhärtete.

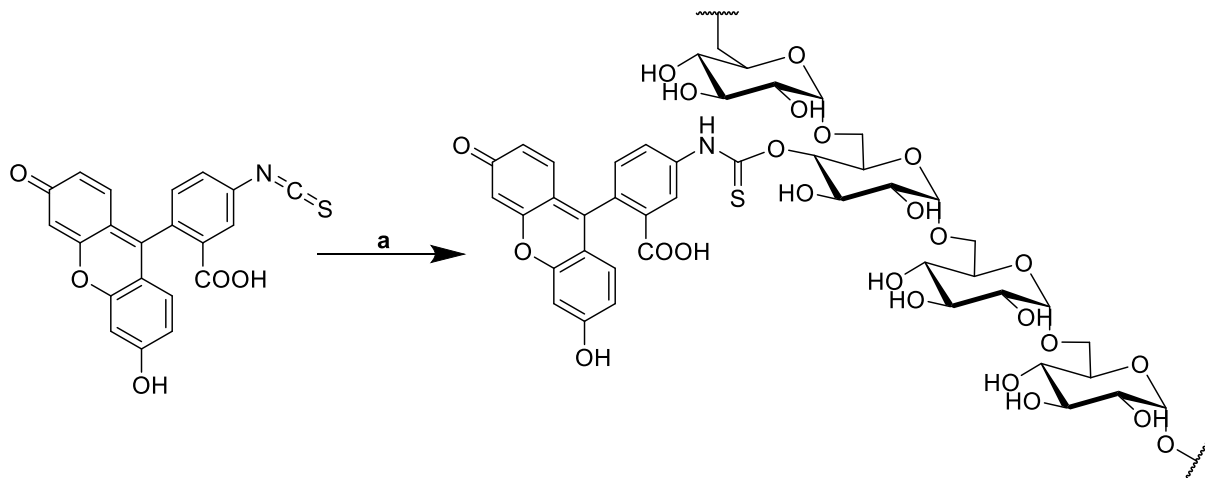
Die Ringschlussreaktion mit 5-Hydroxymethylfurfural führte nicht zum erwarteten Produkt **74**: Im Zuge der Reaktion entstand ein Stoff, dessen detektierte Masse der des Zielprodukts +16 entsprach, das Zielprodukt selbst wurde jedoch nicht gebildet. Auch eine Reaktion unter erhöhter Temperatur sorgte nicht für die erwünschte Umsetzung. Denkbar ist, dass es sich bei dem angefallenen Stoff um ein Intermediat handelte, das aufgrund der sterischen Hinderung durch die zusätzliche Methylgruppe nicht weiter zum Imidazol umgesetzt werden konnte.

Die Substanz mit der Masse 522 u wurde durch Flash-Chromatographie isoliert, eluierte aber gemeinsam mit einer Verunreinigung mit fast identischer Retentionszeit. Eine Charakterisierung des Stoffes über NMR war deshalb nicht bzw. nur mit unverhältnismäßig hohem Aufreinigungs-Aufwand möglich. Ohnehin waren inzwischen deutliche Fortschritte bei anderen Ansätzen des Projekts gemacht worden, weswegen die Entwicklung der 1-Methyl-cyclohexylamin-Reihe vorerst eingestellt wurde.

3.5 Synthese von FITC-Dextran (75)

Im Zuge der IBD-Studien (Kapitel **4.3.5**) wurde den Tieren jeweils 2 h vor deren Euthanasie eine Mischung aus Lactulose, Mannitol und FITC-Dextran (mit dem Thiocyanat des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein beladenes Dextran, durchschnittliches MW von ca. 6.000) in Wasser oral verabreicht. Es handelt sich um eine gängige Methode zur Bestimmung der Darmpermeabilität. Geschädigtes Darmgewebe ist durchlässiger für Dextrane dieser Größe als gesundes, wodurch fluorimetrisch erfassbare Mengen des FITC-Konjugats ins Blut gelangen. Bestimmt wurde die Konzentration im Rahmen dieser Arbeit aus Herzserum. Das

Absorptionsmaximum des Fluorophors liegt bei 490 nm, während das Emissionsmaximum bei 520 nm liegt.



Schema 3.15: Synthese von **75**. (a) Dextran (durchschnittliches MW ca. 6.000), Dibutylzinndilaurat, DMSO, Pyridin, 95 °C (91 %).

Das für die Tierstudien verwendete **75** wurde selbst synthetisiert (**Schema 3.15**).¹⁰³

Die Synthese ist schnell durchführbar. Dextran und FITC werden lediglich für ca. 2 h in DMSO mit katalytischen Mengen an Dibutylzinndilaurat und Pyridin in der Hitze gerührt. Die Aufarbeitung ist simpel, da das FITC-Dextran durch Zugabe eines Überschusses an Ethanol ausgefällt und per Filtration gewonnen werden kann. Durch wiederholtes gründliches Waschen mit weiterem Ethanol kann darin lösliches, ungebundenes FITC entfernt werden. Da der exakte Beladungsgrad des erhaltenen Dextrans mit FITC unbekannt ist, ist eine Batch-spezifische Aufnahme von Standardkurven bei jeder Studie unerlässlich.

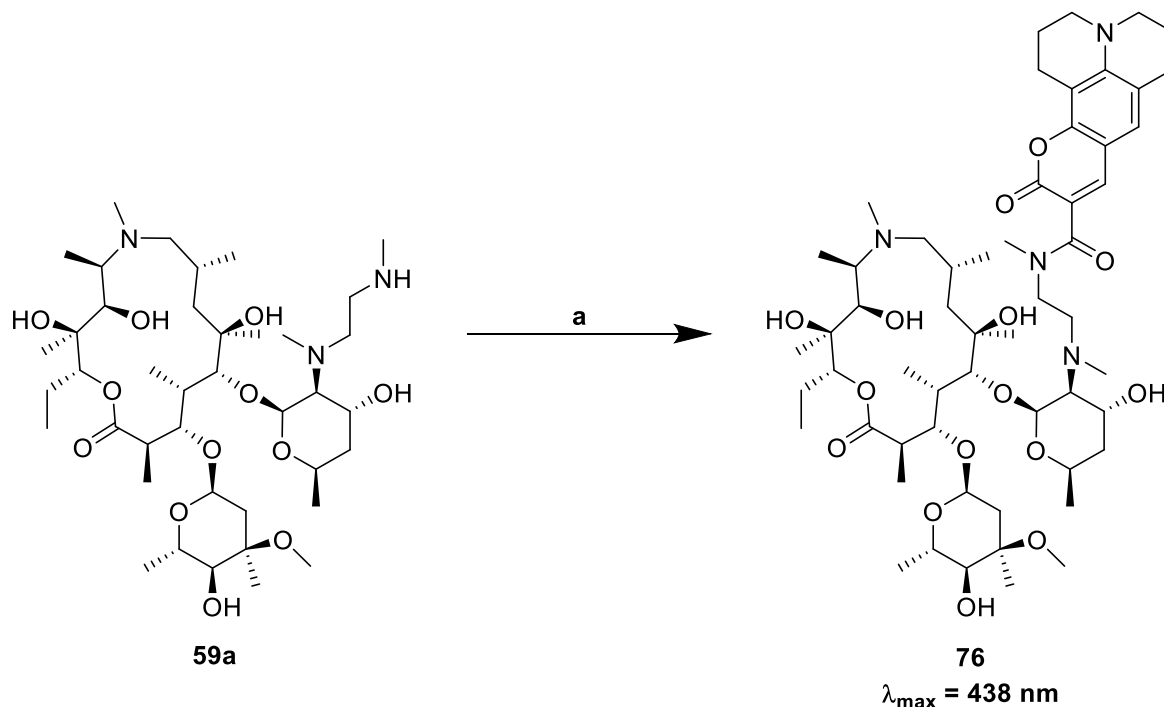
3.6 Synthese des Fluorophor-Konjugats 76

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufnahme und Verteilung der (fluoreszenzaktiven) Testsubstanzen in Immunzellen unter anderem durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe Kapitel **4.2.5**). Die Hypothese war, dass sich die mit Makrolid-Carriern verknüpften Stoffe besonders stark in Immunzellen, insbesondere in sauren Kompartimenten wie Lysosomen, anreichern würden (über „acid trapping“). Zur Erforschung dieses Phänomens war geplant, als Vergleichssubstanz ein definiertes Fluorophor mit einem der in Kapitel **3.3** beschriebenen Carrier zu konjugieren. Dies war auch insofern nützlich zur allgemeinen Charakterisierung der Makrolide, als dass die JAK-Warheads keine optimierten Fluorophore waren und deswegen mit vergleichsweise schwachen Intensitäten emittierten. Ein optimiertes, kommerziell erhältliches Fluorophor sollte dagegen auch noch in geringen Konzentrationen detektiert werden können, z.B. bei der histologischen Untersuchung von *in vivo* Proben (Kapitel **4.3.1**).

An die Wahl des zu verknüpfenden Fluorophors wurden mehrere Anforderungen gestellt:

- Das unkonjugierte Fluorophor sollte möglichst schlecht in intakte Zellen aufgenommen werden, um einen guten Vergleich zum Konjugat zu schaffen.
- Sowohl das freie Fluorophor als auch das Konjugat sollten auch in höheren Konzentrationen untoxisch sein, um *in vivo* Studien mit Gewebeentnahme und histologischer Analyse zu ermöglichen.
- Das Produkt sollte nicht zu polar und bei physiologischem pH nicht geladen sein, da dies die Membranpassage erschweren würde.
- Absorptions- und Emissionsmaxima sollten in einem Bereich liegen, der den zeitgleichen Einsatz von Farbstoffen für Lysosomen und Zellkerne erlaubt (siehe Kapitel 4.2.5. für Details zu den Farbstoffen). Idealerweise läge die Emission also im Detektionsbereich des verwendeten „GFP“ Filters (525 ± 50 nm) des Fluoreszenzmikroskops.
- Das Fluorophor sollte mit möglichst wenig Schritten und ohne Einfluss auf das farbgebende System mit dem Makrolid-Carrier kovalent verknüpft werden können.

Die Wahl fiel auf den kommerziell erhältlichen Stoff Coumarin 343, der die meisten der Kriterien gut erfüllte. Gewisse Bedenken gab es aufgrund der Einstufung als reizende und potentiell gesundheitsschädliche Substanz. Sowohl der Farbstoff als auch das Produkt **76** wurden aber vor Ort einem *in vitro* Toxizitäts-Assay unterzogen und für unproblematisch befunden. Auch *in vivo* wurden bei den eingesetzten Dosen keinerlei toxische Effekte festgestellt.



Schema 3.15: Synthese des Fluorophors **76**. (a) Coumarin 343, Et_3N , HATU, DCM, rt (50 %).

Als Makrolid-Carrier wurde das bereits unter Kapitel 3.3 beschriebene Azithromycin-Derivat **59a** verwendet. Geplant war die Bildung eines Amids aus der Carboxylgruppe

des Fluorophors und dem gut zugänglichen sekundären Amin des Linkers. Die Amidbildung zu **76** erfolgte unter ähnlichen Bedingungen wie die Reaktion von **59a** mit Cyanessigsäure über HATU-vermittelte Kupplung bei Raumtemperatur (**Schema 3.15**). Das Produkt wurde durch sauer-basische Aufarbeitung extrahiert, wodurch nicht umgesetztes Cumarin 343 entfernt wurde, und anschließend chromatographisch aufgereinigt.

Der letzte Syntheseschritt wurde von Simon Strass im Rahmen eines anderen Projektes durchgeführt, der Stoff wurde freundlicherweise für die Fluoreszenzmikroskopie-Experimente zur Verfügung gestellt und im Laufe dieser Arbeit näher charakterisiert.

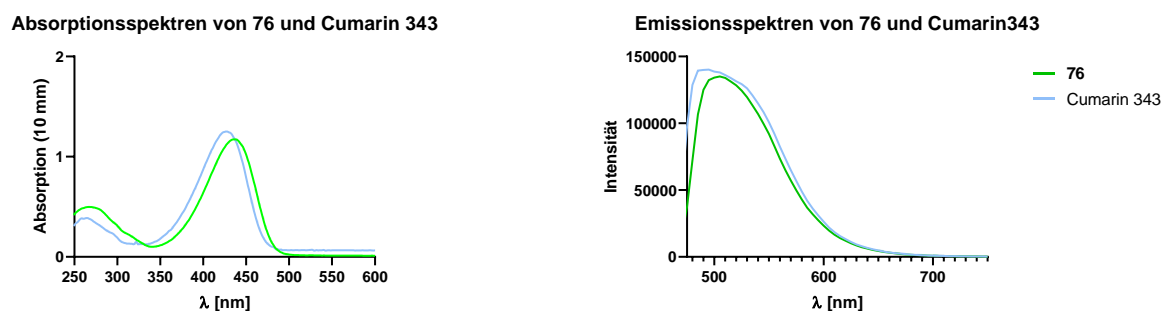


Abbildung 3.8: Absorptions- und Emissionsspektren von **76** und dem nicht-konjugierten Edukt Cumarin 343 bei Raumtemperatur in PBS (pH 7.4) und 0,5 % DMSO. $c = 50 \mu\text{M}$. Die Spektren wurden auf verschiedenen Geräten aufgenommen (siehe Experimenteller Teil). Anregungswellenlängen zur Messung der Emission waren 438 nm (**76**) bzw. 428 nm (Cumarin 343), Emissionswellenlängen $< 475 \text{ nm}$ wurden zur Vermeidung von Spillover-Effekten nicht erfasst.

Das Absorptions- und Emissionsverhalten des erhaltenen Konjugats wurde mit dem freien Edukt verglichen (**Abbildung 3.8**). Es wurde nur eine geringfügige Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (um ca. 10 nm) festgestellt. Auch die Emissionsspektren waren nahezu identisch und die Maxima lagen im für die geplanten Experimente erwünschten Bereich.

76 wurde wie auch die anderen Testverbindungen in PK-Studien auf seine Stabilität und Verteilung in verschiedene Gewebe getestet. Es zeigte dabei das für Makrolidkonjugate typische Muster: Hohe Aufnahme in periphere Organe - insbesondere in Leber-, Nieren- und Darmgewebe - sowie eine vglw. lange Plasmahalbwertszeit (Kapitel **4.2.1**). Aus diesem Grund wurden in einer Folgestudie Gewebeproben aus Mäusen entnommen, präpariert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Ziel war es, die gewebespezifische Verteilung des gut detektierbaren Fluorophors **76** stellvertretend für die strukturell verwandten Makrolidkonjugate aufzuzeigen.

4 Biologische Tests und Ergebnisse

4.1 JAK3-Aktivität und pharmakokinetische Eigenschaften

Die Stammverbindung **FM-381** ist bezüglich ihrer Potenz als JAK3-Hemmer schon ausoptimiert worden und erreicht JAK3 IC_{50} -Werte im einstellig nanomolaren Bereich.^{45,72} Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher in der pharmakokinetischen Untersuchung und Optimierung der **FM-381**-Derivate. Sowohl eine Verbesserung der allgemeinen metabolischen Stabilität als auch die gezielte Adressierung bestimmter Zielgewebe standen im Fokus. Unter anderem wurden geeignete Kandidaten für Krankheitsmodelle gesucht, die z.B. primär das ZNS oder den GI-Trakt betreffen. Bei der Synthese der neuen Testverbindungen wurde demnach vor allem Wert auf pharmakokinetische Eigenschaften, insbesondere *in vivo* Stabilität und ein günstiges Verteilungsmuster, gelegt. Gleichzeitig war selbstverständlich eine hohe Potenz gewünscht, um ausreichende Wirksamkeit gewährleisten zu können. Die Aktivität der Testsubstanzen gegen die JAK3 wurde an der Universität Tübingen im Arbeitskreis Laufer getestet. Das ELISA-basierte, zellfreie Verfahren wurde bereits veröffentlicht.^{104,105} Als Referenz dienten dabei sowohl das selbst synthetisierte **FM-381** (JAK3 IC_{50} = 12 ± 3 nM) als auch Tofacitinib (JAK3 IC_{50} = 8 ± 1 nM).

Alle der dargestellten Testverbindungen wurden in einem standardisierten Verfahren (**Abbildung 4.1**) *in vivo* auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht. Die aus diesen Standard-Studien resultierenden PK-Profile sind für jede Testsubstanz im **Anhang (7.1)** aufgeführt. Als Modellorganismus dienten weibliche Balb/c Mäuse im Alter von ca. 8 Wochen. Erfasst wurden die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verabreichung vorliegenden Plasmakonzentrationen und die terminalen Konzentrationen in diversen Organen. Anstelle von Plasma wäre auch die Analyse von Vollblut denkbar, was bei Stoffen mit hoher Bindung an Blutzellen zu empfehlen ist. Wie sich aus Vergleichen der Blut- und Plasmakonzentrationen bei einigen der durchgeführten Studien ergeben hat, liegen diese beim Großteil der verwendeten Testverbindungen aber in ähnlichen Verhältnissen vor (Daten nicht aufgeführt).

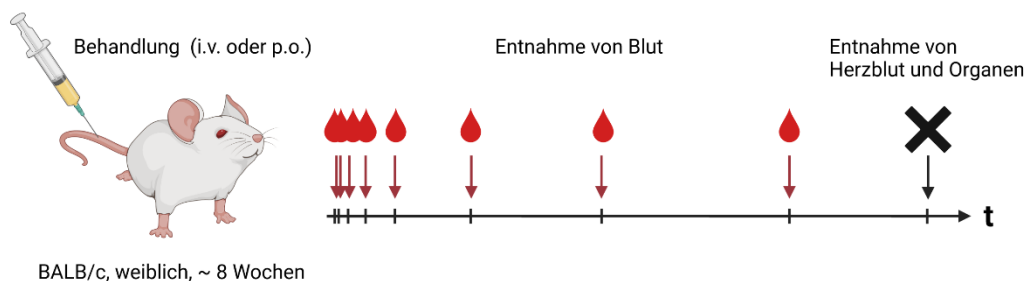


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des typischen Aufbaus der durchgeführten PK-Studien. Mäuse wurden entweder durch Injektion in die Schwanzvene oder durch orale Gavage behandelt. Zu definierten Zeitpunkten nach der Verabreichung wurde Blut entnommen, mit Gerinnungshemmern versetzt, zentrifugiert und das gewonnene Plasma analysiert. 8 h nach Behandlung wurden die Tiere euthanasiert und Organe sowie Herzblut zur Analyse der Stoffkonzentrationen entnommen.

Jeder Stoff wurde sowohl intravenös als auch oral verabreicht, was den Vergleich der AUCs der Plasmakonzentrationen und damit die Berechnung der oralen Bioverfügbarkeit erlaubt. Erfasst wird dabei allerdings nur die *scheinbare Bioverfügbarkeit*, da ausschließlich die im Plasma detektierten Moleküle erfasst werden, nicht aber die ins Organgewebe aufgenommenen. Die Details zur Durchführung der Studien und Analyse der Proben sind dem Experimentaltitel unter **6.3** zu entnehmen. Erwähnenswert ist an dieser Stelle noch, dass Mäuse u.a. höhere Eliminierungsraten und eine andere Zusammensetzung an CYP-Enzymen als der Mensch aufweisen, was man bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigen sollte.^{106,107}

Ergebnisse: Da sowohl die JAK3-Aktivität als auch die PK-Eigenschaften durch die Struktur der Substanzen beeinflusst werden, sollen diese im folgenden Abschnitt gemeinsam diskutiert werden. Zunächst wurden die PK-Eigenschaften der Leitsubstanz **FM-381** untersucht. Dargestellt sind die in Plasma und Organen gemessenen Konzentrationen der intakten, metabolisch unveränderten Substanz:

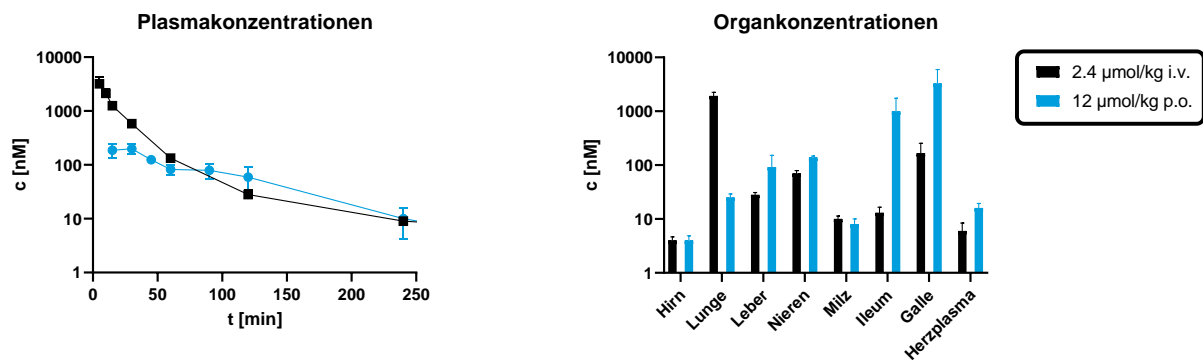


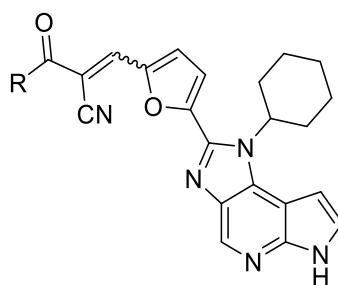
Abbildung 4.2: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **FM-381** in Plasma (links) und Organen (rechts) von BALB/c Mäusen in Abhängigkeit von der Verabreichungsart (schwarz: i.v. Injektion; blau: orale Gavage). I.v. injiziert verteilt sich die Substanz vor allem ins Lungengewebe. Nach oraler Gabe führt zu ist der Stoff vor allem im GI-Trakt vorzufinden. Die Organe wurden 8 h nach der Behandlung entnommen. $n = 3$.

Die Substanz wird relativ schnell eliminiert, die Plasmahalbwertszeit beträgt ungefähr 23 min (berechnet aus 6 verschiedenen PK-Studien, in denen der Stoff als Referenz i.v. verabreicht wurde). Nach oraler Gabe wurden i. d. R. deutlich niedrigere Spiegel gemessen, die Spitzenkonzentrationen (meist im Bereich 100-200 nM, bei Verabreichung von 12 µmol/kg) wurden üblicherweise 15 bis 30 min nach Behandlung erreicht. **FM-381** hat eine niedrige orale Bioverfügbarkeit (BV) von ca. 10 % (Durchschnitt aus vier Studien). Zum Vergleich: Im gleichen Mausstamm wird die orale BV von Tofacitinib in der Literatur als 57 % angegeben.¹⁰⁸ Für **FM-381** wurde in diesem Falle aber nur die sogenannte *scheinbare* BV bestimmt, die sich rein aus den Plasmaspiegeln berechnet; die Anreicherung in Organen wird dabei nicht miteinbezogen. Dies ist vor allem für die später noch beschriebenen Makrolide relevant, die sich besonders stark in periphere Organe verteilen. Die mittlere Verweilzeit (MRT) des Stoffes im Körper betrug 37 min nach i.v. bzw. 125 min nach p.o. Behandlung, was jeweils der unteren Hälfte der MRTs der dargestellten Testsubstanzen entspricht.

8 h nach i.v. Injektion wurden die höchsten Wirkstoffspiegel im Lungengewebe detektiert (ca. 2 μM), während in den anderen Organen nur noch niedrige nanomolare Konzentrationen vorlagen. Die bevorzugte Verteilung in die Lunge ist vermutlich eine Folge der Lipophilie des Stoffes und macht ihn potentiell zu einem interessanten Kandidaten für die intravenöse Behandlung schwerer Lungenleiden, z.B. dem durch ungünstige COVID-Verläufe hervorgerufenen Acute Respiratory Distress Syndrom. Orale Verabreichung führte hauptsächlich zur Anreicherung im GI-Trakt bzw. der Galle, was für eine primär hepatische bzw. biliäre Ausscheidung des Stoffes spricht.

Von **FM-381** ausgehend wurde eine Reihe von Derivaten synthetisiert, die sich entweder an der die JAK-Selektivitätstasche adressierenden Seitenkette, am Amid-Rest oder an beiden Gruppen unterschieden. Ziel war es, die Stabilität und Aufnahme des Stoffes zu optimieren und Derivate mit bevorzugter Verteilung in bestimmte Zielorgane zu erhalten. Zur besseren Übersicht werden die getesteten Substanzen im Folgenden in verschiedenen Serien zusammengefasst:

Die erste dargestellte Serie (**Tabelle 4.1**) an Testverbindungen behielt die Cyclohexyl-Seitenkette der Leitverbindungen und die Änderungen beschränkten sich auf den Amidrest. Für die meisten Vertreter der Serie wurden nur vernachlässigbar geringe Verluste an JAK3-Aktivität festgestellt, aber ebenso waren die Auswirkungen auf die biologische Halbwertszeit und Bioverfügbarkeit gering. Nur für **11** wurde eine erhöhte Plasmahalbwertszeit festgestellt. Durch die Einführung des basischen tertiärenamins kommt es vermutlich zur Anreicherung in sauren Kompartimenten oder der Bindung an saure Proteine, mit anschließendem langsamen Freiwerden des Stoffes. Als metabolisch äußerst instabil erwies sich **9**, dessen Methylester wahrscheinlich rasch durch Plasma-Esterasen u.ä. gespalten wird. Es ist allerdings auch von der resultierenden freien Säure noch inhibitorische Potenz zu erwarten, da der betroffene Rest nicht für die Wechselwirkungen mit der Kinase essentiell ist.

Tabelle 4.1: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der Cyclohexan-Serie.

No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
FM-381		12 ± 1	37 (i.v.) 125 (p.o.)	0,87	23 ^d	10 ^e
9		21 ± 2	n.b. ^f	n.b. ^f	n.b. ^f	n.b. ^f
11		133 ± 9	70 (i.v.) 80 (p.o.)	0,89	31	11
21		20 ± 1	42 (i.v.) 185 (p.o.)	0,75	11	4
24		24 ± 2	15 (i.v.) 20 (p.o.)	1,28	10	5
27		68 ± 10	23 (i.v.) 74 (p.o.)	0,98	8	1
28		41 ± 4	26 (i.v.) 102 (p.o.)	0,59	18	10
48		4 ± 1	90 (i.v.) n.b. ^d (p.o.)	1,35	54	0,3

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV. ^dMittelwert aus sechs Studien. ^eMittelwert aus vier Studien. ^fNicht bestimmbar, da die Stoffkonzentrationen in Plasmaproben unterhalb der Quantifizierungsgrenzen lagen.

Die Substanzen dieser Serie waren nach p.o. Verabreichung überwiegend in Galle und Ileum vorzufinden, was wie bei **FM-381** eine hauptsächlich hepatisch-biliäre Exkretion nahelegt. Gewisse Konzentrationen mancher Stoffe (v.a. jene mit polaren Resten) wurden aber auch in Nieren detektiert, eine gemischte Eliminierung der Substanzen erscheint plausibel. Die höchste MRT nach oraler Behandlung ergab sich für das Morpholinamid **21**, das auch in späteren LPS-Studien (**4.3.2**) gute Wirksamkeit zeigte.

Später wurde das Carbonsäure-Analogon von **FM-381**, **48**, synthetisiert um dessen potentiell Auftreten als aktiver Metabolit der Substanzklasse zu untersuchen. Die hohe Potenz von **FM-381** konnte dabei beibehalten werden ($JAK3 IC_{50} = 4 \pm 1 \text{ nM}$). **48** wies eine unerwartet hohe Plasmahalbwertszeit von ca. 54 min auf. In den i.v. behandelten Tieren wurden die höchsten Konzentrationen in Galle, Leber und Milz detektiert (**Abbildung 4.3**).

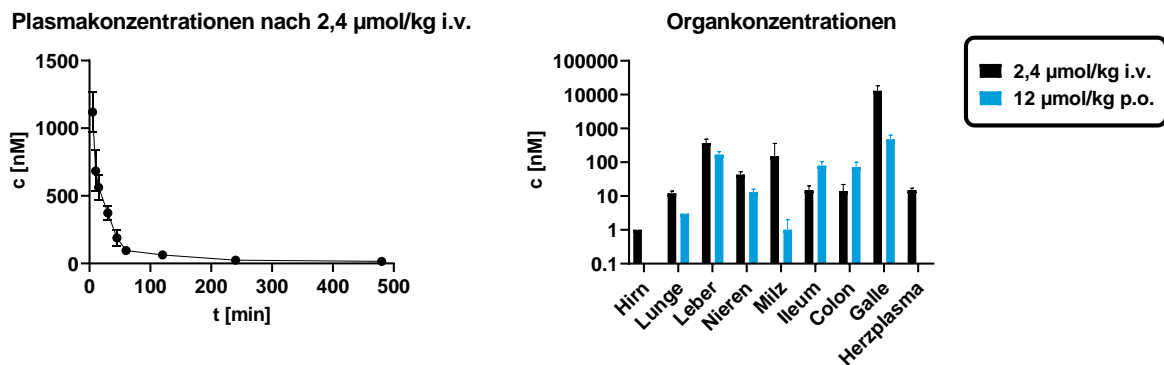


Abbildung 4.3: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **48** in Plasma (links) und Organen (rechts) von BALB/c Mäusen in Abhängigkeit von der Verabreichungsart (schwarz: i.v. Injektion; blau: orale Gavage). Die Organe wurden 8 h nach der Behandlung entnommen. $n = 3$.

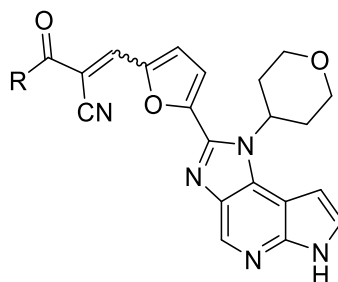
Nach p.o. Verabreichung wurden keine Plasmakonzentrationen innerhalb der Quantifikationsgrenzen gemessen. Wahrscheinlich kommt es durch die freie Carbonsäure schon bei der ersten Leberpassage zu einem ausgeprägten Phase II Metabolismus (z.B. durch Glucuronidierung). Die verbliebenen in den Organen vorgefundenen Stoffmengen lassen aber darauf schließen, dass zumindest ein gewisser Anteil der Substanz oral verfügbar ist.

Die Substanz konnte zudem wie erhofft in PK-Studien als Metabolit anderer Stoffe, z.B. des Makrolidkonjugats **38** (**Tabelle 4.9**), vorgefunden werden. Dort wurde es vor allem in Galle, Leber, Lunge sowie in geringerem Maße im Plasma detektiert. Zusammen mit der ausgezeichneten inhibitorischen Potenz und der relativ langen Plasmahalbwertszeit ergibt sich das Profil eines wirksamen, aktiven Metaboliten. Dies würde auch die hohe *in vivo* Wirksamkeit der Konjugate erklären, deren *in vitro* JAK3-Aktivität typischerweise niedriger lag als die ihrer unkonjugierten Analoga. Weitere zu erwartende Metaboliten der Testverbindungen, z.B. durch teilweise oder komplette Desalkylierung am Cyanoacrylamid, sind vermutlich ebenfalls aktiv, da es sich wie bereits erwähnt um einen für die JAK-Hemmung nicht kritischen Rest handelt. Diese

wurden aber im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt, da sie nur von untergeordneter Priorität waren.

Die nächste Serie (**Tabelle 4.2**) verfügte über einen Tetrahydropyran-Rest in der Selektivitätstasche. Durch den Heterocyclus sollte auch die Löslichkeit der Stoffe gesteigert werden (Kapitel **4.2.8**), da diese v.a. bei **FM-381** problematisch niedrig war. Die JAK3-Aktivität der Serie war im Allgemeinen noch immer recht gut und für die meisten Stoffe mit der ihren dargestellten Cyclohexyl-Analoga vergleichbar.

Tabelle 4.2: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der Tetrahydropyran-Serie.



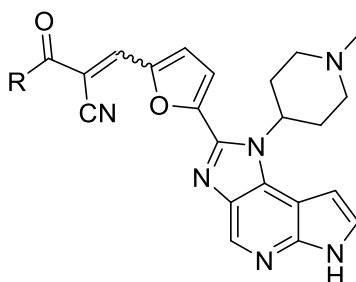
No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
8		24 ± 1	24 (i.v.) 132 (p.o.)	0,39	18	6
10		21 ± 2	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d
12		51 ± 1	23 (i.v.) 90 (p.o.)	4,29	17	11
19		19 ± 2	12 (i.v.) 65 (p.o.)	1,17	8	12
20		25 ± 1	14 (i.v.) 72 (p.o.)	1,43	10	10
23		25 ± 6	11 (i.v.) 35 (p.o.)	3,48	10	4
25		66 ± 4	14 (i.v.) 19 (p.o.)	0,23	6	0

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV. ^dNicht bestimmbar, da die Stoffkonzentrationen in Plasmaproben unterhalb der Quantifizierungsgrenzen lagen.

Die Plasmahalbwertszeiten waren verglichen mit der Cyclohexan-Serie geringfügig niedriger. Denkbar erscheint eine O-Desalkylierung des Tetrahydropyran-Restes über CYP-Enzyme als Teil des Phase I Metabolismus. Erwartenswerterweise war dementsprechend auch die Clearance der meisten Testsubstanzen vergleichsweise hoch. Auch die Bioverfügbarkeit der Stoffe lag im Allgemeinen niedriger. Grund dafür könnten sowohl ein gesteigerter First-Pass Metabolismus sein, als auch eine verringerte Membranpassage aufgrund des polareren Rests. Die Verteilungsmuster in den Organen waren für die meisten Stoffe ähnlich wie in der vorigen Serie, die Konzentrationen lagen aber typischerweise niedriger.

Die nächste Serie (**Tabelle 4.3**) wurde mit dem Ziel synthetisiert, die Verteilung der Stoffe in bestimmte Organe zu steigern und verfügte über einen N-methylpiperidin-Substituenten. Die durch basische Gruppen gesteigerte Anreicherung in Zielkompartimenten wird bereits an anderer Stelle diskutiert (Kapitel **4.2.5**). Die Seitenkette wurde im Hinblick auf JAK3-Hemmung weniger gut toleriert, es kam zu einem Aktivitätsverlust um Faktor 2 (**17**) bis Faktor 10 (**15**) im Vergleich zu den Cyclohexyl-Analoga. Ähnliches wurde bereits für andere JAK-Hemmer in der Literatur beschrieben: Höhere pK_a -Werte von stickstoffhaltigen Substituenten gingen mit verminderter Potenz einher. Die Stoffe liegen dann überwiegend in kationischer Form vor, wodurch die Interaktion mit der Kinase gestört wird.¹⁰⁹

Tabelle 4.3: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der 1-Methylpiperidin-Serie.



No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
15		142 ± 1	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d
17		260 ± 26	16 (i.v.) n.b. ^d (p.o.)	0,85	20	n.b. ^d
18		99 ± 10	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV. ^dNicht bestimmbar, da die Stoffkonzentrationen in Plasmaproben unterhalb der Quantifizierungsgrenzen lagen.

Die Stoffe erwiesen sich überwiegend als metabolisch instabil, vor allem im Blut bzw. Plasma. So wurden von **15** und **18** weder nach i.v. noch nach p.o. Verabreichung messbare Konzentrationen in Plasmaproben gefunden. **17** konnte nur im Plasma von i.v. behandelten Tieren nachgewiesen werden. Die fehlenden Plasmaspiegel lassen sich durch eine Kombination aus rascher Verteilung in periphere Gewebe und metabolischer Umsetzung (vermutlich durch N-Desalkylierung der Methylgruppe) erklären. Interessanter waren die in den Organen vorgefundenen Konzentrationen der Stoffe: So wurden sowohl **17** als auch **18** in vielen Organen inklusive Hirngewebe in hohen Spiegeln detektiert. Im Falle von **18** wurden dabei im Hirn, selbst 8 h nach Verabreichung, noch ca. vierfach (p.o.) bzw. dreißigfach (i.v.) höhere Konzentrationen oberhalb der JAK3 IC₅₀ des Stoffes erreicht. Die Passage der Stoffe durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) erscheint zunächst untypisch und ist für Kinase-Inhibitoren eher selten.^{110,111} Die klassischen von Lipinski beschriebenen Voraussetzungen zur guten oralen Aufnahme eines Wirkstoffes lassen sich in gewissem Maße auch auf die Überwindung der BHS übertragen. Demnach sollte ein auf Hirngängigkeit optimierter Wirkstoff u.a. ein niedriges Molekulargewicht (< 500 u), nicht mehr als fünf Wasserstoffbrückendonoren bzw. nicht mehr als zehn -Akzeptoren und einen log P Wert von maximal 5 aufweisen. Letzterer sollte allerdings auch nicht zu niedrig ausfallen, da eine gewisse Lipophilie förderlich zur Passage der hydrophoben Lipid-Doppelschichten der Zellen ist. Geladene Substanzen überqueren die BHS aufgrund ihrer hohen Polarität nur in geringerem Ausmaß. Andererseits kann die Wechselwirkung positiv geladener Wirkstoffe mit der anionischen Zellmembran ggf. die passive Diffusion fördern.^{112,113}

Die Aufnahme der beiden Substanzen ins Hirn lässt sich trotz ihrer nicht optimalen Strukturen aber durch aktiven Transport erklären: Organische Kationen-Transporter können - relativ unspezifisch - die Aufnahme positiv geladener organischer Moleküle ins ZNS fördern. Dies wurde bereits für bekannte hirngängige Arzneistoffe beschrieben, z.B. für Opioide und H₁-Antihistaminika der ersten Generation.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Ein typisches gemeinsames Strukturmerkmal der erwähnten Substanzklassen - wie auch von **17** und **18** - sind tertiäre Aminogruppen, die bei physiologischem pH überwiegend protoniert vorliegen.

Auch in anderen Organen reicherte sich **18**, vor allem nach i.v. Injektion, in hohen (meist einstellig mikromolaren) Konzentrationen an, vor allem in Lunge und Milz. Die gegenüber den bisherigen Testverbindungen erhöhte Verteilung in die Organe ist, wie bereits erwähnt, vermutlich der gesteigerten Basizität des Stoffes zuzuschreiben. Ein aktiver Transport des Stoffes durch Mimikry von Aminosäure-Mustern (über die Sarkosin-Methylester-artige Struktur der Seitenkette) ist ebenfalls nicht auszuschließen.

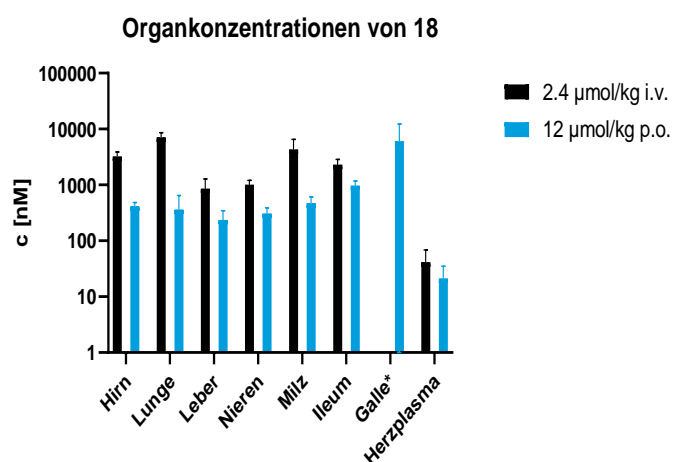


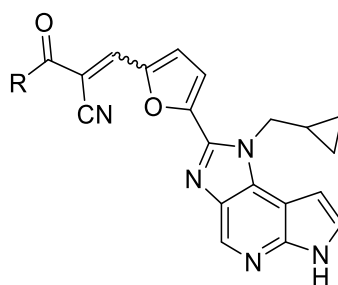
Abbildung 4.4: In Organen 8 h nach Verabreichung gemessene Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **18** in BALB/c Mäusen. Der Stoff erwies sich anders als die meisten **FM-381** Derivate als ZNS-gängig. In der i.v.-Gruppe wurden keine Gallenproben entnommen. $n = 3$

Eine experimentelle Überprüfung dieser Möglichkeit würde aber mit einem hohen Kostenaufwand einhergehen und ist zu diesem Zeitpunkt der Wirkstoffentwicklung noch nicht gerechtfertigt.

Die in Organen des ZNS gemessenen Stoffkonzentrationen sollten, vor allem bei stark streuenden Werten, kritisch betrachtet werden: Durch unsaubere Entnahme kann es ggf. zu einer Verunreinigung mit wirkstoffhaltigem peripherem Blut u.ä. kommen. Zur Sicherstellung der Befunde ist es u.U. ratsam, weiterführende Studien mit den Substanzen durchzuführen. Dies wurde z.B. auch für **18** so umgesetzt (s. **4.3.1**) und der Stoff konnte wiederholt in hohen Konzentrationen in Hirngewebe nachgewiesen werden. Die gute ZNS-Gängigkeit und JAK3-Aktivität des Stoffes machen ihn zu einem bevorzugten Kandidaten für den Einsatz in neuroinflammatorischen Krankheitsmodellen, z.B. für die Erforschung der Multiplen Sklerose (Kapitel **4.3.4**) oder Morbus Alzheimer.

Eine weitere Serie bestand aus Testverbindungen mit einer Methylcyclopropan-Seitenkette (**Tabelle 4.4**). Durch die relativ zu Cyclohexan kleinere Gruppe sollte die Lipophilie der Struktur leicht vermindert werden, ohne dabei an JAK3-Aktivität einzubüßen. Es wurde aber für alle der dargestellten Mitglieder dieser Serie ein Verlust an Potenz festgestellt. Die kleinere Seitenkette scheint die relevante Bindetasche nicht mehr ausreichend auszufüllen, was zu verringerten Wechselwirkungen des Inhibitors mit der Kinase führt. Von Michael Forster wurde bereits ein starker (ca. vierzigfacher) Aktivitätsverlust beschrieben, als der Cyclohexyl-Substituent durch eine noch kleinere Methylgruppe ausgetauscht wurde.⁷²

Die Plasmahalbwertszeiten der Stoffe lagen alle leicht unter der von **FM-381**, dafür war die Bioverfügbarkeit des direkten Analogons **26** um das ca. 2,5-fache auf 25 % gesteigert. Noch höher lag sie bei **35** (35 %), allerdings ist dies eher auf die untypisch geringe AUC der Plasmaspiegel nach i.v.-Gabe zurückzuführen. Wie schon in vorigen Serien stellte der Methylester einen metabolischen Schwachpunkt dar und wurde *in vivo* schnell gespalten. Die Organkonzentrationen der Testsubstanzen dieser Serie waren im Allgemeinen eher gering; i.v. Injektion führte bevorzugt zur Anreicherung in der Lunge, während die höchsten Stoffmengen nach oraler Gabe v.a. im GI-Trakt bzw. der Galle vorlagen.

Tabelle 4.4: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der Methylcyclopropan-Serie.

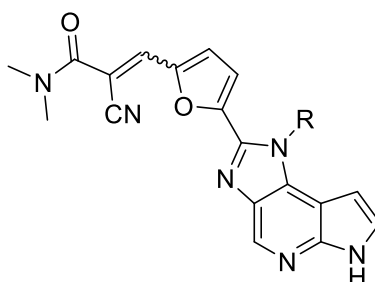
No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
26		139 ± 16	24 (i.v.) 125 (p.o.)	0,30	16	25
34		150 ± 30	29 (i.v.) 101 (p.o.)	1,38	18	6
35		114 ± 33	25 (i.v.) 68 (p.o.)	10,85	15	35
36		99 ± 16	15 (i.v.) 65 (p.o.)	1,62	9	3

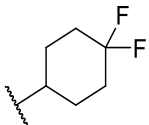

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV.

Da mit den bisherigen Serien noch keine Durchbrüche hinsichtlich der Steigerung von Halbwertszeit und Bioverfügbarkeit erreicht worden waren, wurden zwei neue Substituenten (**Tabelle 4.5**) für die JAK-Selektivitätstasche erprobt (und das N,N-dimethylamid beibehalten). Zum einen wurde ein 4,4-Difluorocyclohexan-Rest eingeführt (**22**), zum anderen eine kleine, gespannte Cyclopropylgruppe (**29**). Die Einführung von Fluor ist in der medizinischen Chemie ein beliebter Ansatz zur Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffes: Die C-F Bindung ist metabolisch deutlich stabiler als eine C-H Bindung und kann in gesättigten Systemen ggf. auch benachbarte Gruppen vor oxidativer Umsetzung schützen. Auch die Passage durch biologische Membranen kann durch Fluorierung gesteigert werden, was wiederum zu verbesserter Bioverfügbarkeit führt. Zudem wurde auch von spezifischen Interaktionen zwischen eingeführten Halogenen und Aminosäure-Resten in Zielproteinen berichtet, eine Erkenntnis die den Einsatz von Fluoriden in der Wirkstoffentwicklung in den letzten Dekaden erneut ausweitete.^{117,118} Dies trifft vor allem auf aromatische Systeme zu, wo die Einführung von Fluor zu einer Steigerung des log*P* führt. Bei der Fluorierung von Aliphaten ist insgesamt eher eine *Senkung* der Lipophilie zu erwarten.¹¹⁹

Der 4,4-Difluorocyclohexan-Rest wurde gut toleriert, die JAK3-Aktivität fiel gegenüber der Leitsubstanz nur um ca. Faktor 2 ab, was aber durch die verbesserten PK-Eigenschaften mehr als kompensiert werden dürfte; zudem ist der Stoff noch immer hochselektiv für die JAK3 (Kapitel 4.2.1). Halbwertszeit, Clearance und MRT waren vergleichbar mit denen des nicht fluorinierten Analogons **FM-381**. Die scheinbar ähnliche metabolische Stabilität legt nahe, dass die Substanzen an einer anderen Position metabolisiert werden. Die orale Bioverfügbarkeit konnte wie erhofft um das ca. 4,5-Fache auf 46 % gesteigert werden und es wurden deutlich höhere Plasmakonzentrationen erreicht. Selbst zum letzten Blutungszeitpunkt (8 h nach Verabreichung) waren noch quantifizierbare Mengen der Substanz im Plasma vorhanden, was für die bisherigen Testverbindungen nur selten beobachtet wurde. In Anbetracht der bereits diskutierten anderen Parameter ist davon auszugehen, dass der erhöhten Bioverfügbarkeit primär eine erhöhte Aufnahme des Stoffes (im Gegensatz zu vermindertem First-Pass Effekt) zugrunde liegt. Ähnlich zu **FM-381** führte die i.v. Injektion des Stoffes zu einer selektiven Anreicherung im Lungengewebe. Nach oraler Gabe wurden die höchsten Konzentrationen in Nieren (ca. 7 μM nach 8 h) und Galle (ca. 8 μM) gemessen, was eine gemischte Elimination nahelegt. Weitere Stoffe dieser Serie sind geplant um die Befunde zur BV zu bestätigen bzw. die PK-Eigenschaften noch weiter zu optimieren, waren aber nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit vorgesehen.

Tabelle 4.5: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte von **22** und **29**.



No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
22		28 ± 4	25 (i.v.) 137 (p.o.)	1,04	22	46
29		122 ± 18	135 (i.v.) 149 (p.o.)	0,07	128	7

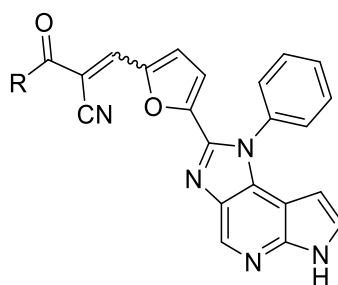
^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV.

Das Cyclopropyl-substituierte **29** war weniger aktiv gegen die JAK3 als vergleichbare Stoffe mit größeren Substituenten. Dies ist in Anbetracht der für die

Methylcyclopropan-Serie erhaltenen Werte wenig überraschend, da die Seitenkette die JAK-Selektivitätstasche nicht adäquat ausfüllt. Wie in *in vivo* Entzündungsmodellen gezeigt wurde (Kapitel **4.3.2**), konnte dieser Aktivitätsverlust aber durch die deutlich verbesserten PK-Eigenschaften überkompensiert werden: Die Plasmahalbwertszeit wurde gegenüber **FM-381** um ein über Fünffaches (auf 128 min) gesteigert. Auch nach 8 h konnten im Plasma beider Gruppen (i.v. und p.o. behandelt) noch Konzentrationen im dreistellig nanomolaren Bereich, oberhalb der JAK3 IC₅₀, gemessen werden. Mit der hohen Halbwertszeit einhergehend sank die Clearance des Stoffes auf 0,07 ml/min. Die deutliche Verbesserung der *in vivo* Stabilität führte zu der Vermutung, dass die mit dem Imidazol verbundene Position der Seitenkette einen metabolischen Schwachpunkt darstellt. Dort könnte z.B. durch CYP-Enzyme eine oxidative Umwandlung der Substanz stattfinden. Im Vergleich zu größeren Alicyclen ist der planare Cyclopropyl-Ring aufgrund der spitzen Winkel deutlich gespannter; die Baeyer-Spannung weicht stark von der idealen Geometrie eines Sechsrings ab. Infolgedessen ist die Abspaltung von Protonen am Ring erschwert, was das System robuster gegenüber oxidativem Metabolismus macht.⁹⁸ **29** verteilte sich nach i.v. Behandlung bevorzugt in die Lungen, allerdings in niedrigerer Konzentration als andere N,N-dimethylamide. Eine p.o. Gabe führte v.a. zur Verteilung in Ileum und Galle, allerdings mit hohen interindividuellen Schwankungen der Messwerte.

Aufgrund der aus der vorigen Serie gewonnenen Erkenntnisse wurde eine weitere Serie (**Tabelle 4.6**) synthetisiert, um die Theorie des oben beschriebenen metabolischen Hotspots zu bekräftigen. Als Substituent wurde nun ein Phenyl-Rest eingeführt, da dieser am zum Imidazol verbundenen Kohlenstoff über kein abstrahierbares Proton verfügt. Dies sollte analog zum Cyclopropyl-Rest den metabolischen Angriff an dieser Position verhindern und zu erhöhter *in vivo* Stabilität der Substanzklasse führen.

Die Serie war, verglichen mit ihren gesättigten Analoga, deutlich weniger aktiv gegen die JAK3. Die potenteste Verbindung **30**, die ein direktes aromatisches Gegenstück zu **FM-381** darstellt, hatte eine JAK3 IC₅₀ von 175 nM. Als plausibel erscheint, dass der aromatische Rest aufgrund seiner planaren, weniger flexiblen Struktur die Interaktion mit der Kinase erschwert.

Tabelle 4.6: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der Benzol-Serie.

No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
30		175 ± 27	138 (i.v.) 129 (p.o.)	0,17	133	1
31		671 ± 25	75 (i.v.) 239 (p.o.)	0,14	71	2
32		223 ± 34	164 (i.v.) 135 (p.o.)	0,23	182	3
33		394 ± 13	48 (i.v.) n.b. ^d (p.o.)	0,44	34	1

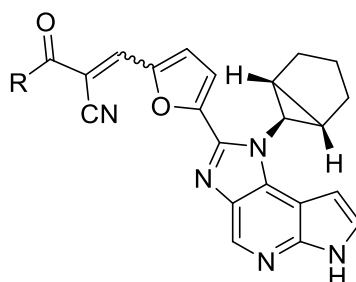
^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV. ^dNicht bestimmbar, da die Stoffkonzentrationen in Plasmaproben unterhalb der Quantifizierungsgrenzen lagen.

Die *in vivo* Stabilität konnte wie erwartet signifikant gesteigert werden: Verglichen mit ihren Cyclohexyl-Analoga verfügten die Testsubstanzen um zwischen Faktor 3-6 erhöhte Plasmahalbwertszeiten. Überraschenderweise erwies sich auch **32**, das über einen Methylsarcosin-Rest verfügt, als ausgesprochen stabil. Insbesondere nach i.v. Gabe wurden über einen langen Zeitraum hinweg hohe Plasmakonzentrationen des Stoffes detektiert, die Halbwertszeit berechnete sich auf ca. 3 h. Dies war insofern unerwartet, da die Analoga anderer Serien (z.B. **9** und **10**) im Plasma äußerst instabil waren, was v.a. dem Methylester zugeschrieben worden war. Die Serie wurde in vergleichsweise höheren Konzentrationen in der Leber detektiert, v.a. nach i.v. Behandlung. **32** reicherte sich zusätzlich noch stark in der Milz (i.v. Gruppen) und – in dreistellig mikromolaren Konzentrationen – in Ileum und Galle (p.o. Gruppen) an. Leider war die orale BV der Substanzklasse im Allgemeinen niedrig (zwischen 0,9 und 2,5 %) und es wurden nur niedrige Spitzenspiegel im Plasma erreicht.

Die nächste synthetisierte Serie sollte die metabolischen Vorteile eines gespannten Ringsystems und eines die Bindungstasche gut belegenden Sechsrings vereinen. Zu diesem Zwecke wurde eine Reihe an Verbindungen mit einem (*trans*-ständigen) Bicyclo[3.1.0]cyclohexan-Rest dargestellt. **Tabelle 4.7** zeigt die beiden

unkonjugierten Vertreter der Serie. Die verglichen mit Cyclohexan weniger flexible Seitenkette hat einen negativen Einfluss auf die JAK3-Aktivität, die Hemmkonstanten für **40** und **41** lagen ca. eine Zehnerpotenz höher. Weniger drastisch war der Unterschied bei dem Makrolidkonjugat **42**, bei dem sich die IC₅₀-Werte zum unverbrückten Analogon **37** nur um Faktor 2 unterschieden. In diesem Falle war auch, im Gegensatz zu anderen Serien, das Konjugat **42** aktiver als die unverknüpfte Substanz **40**. Interessant wäre eine Erfassung der Hemmkonstante von Stoffen mit der isomeren *cis*-ständigen Seitenkette. Bei der Synthese des Bicyclo[3.1.0]hexylamins fiel das dafür notwendige Isomer aber nur in äußerst geringen Mengen an, die eine Synthese bis zur fertigen Endverbindung extrem unwirtschaftlich gemacht hätten.

Tabelle 4.7: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der Bicyclo[3.1.0]hexan-substituierten Stoffe **40** und **41**.



No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
40		236 ± 18	74 (i.v.)	0,25	95	5
			77 (p.o.)			
41		185 ± 9	65 (i.v.)	0,39	85	1
			58 (p.o.)			

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV.

Die Plasmahalbwertszeiten konnten wie schon in der vorigen Serie deutlich gegenüber den Cyclohexyl-Analoga gesteigert werden (um ein Vierfaches für **40**, achtfach für **41**), waren aber etwas geringer als bei **29** bzw. der Phenyl-Serie. Das für **29** vorgefundene Prinzip der Stabilitätssteigerung durch einen gespannten Ring an der Seitenkette ließ sich demnach gut übertragen. Die orale scheinbare Bioverfügbarkeit war mit 5 bzw. 1 % eher gering, **40** erreichte aber nach p.o. Gabe dennoch relativ hohe Plasmakonzentrationen (C_{max} = 700 nM). Beide Stoffe wurden vermutlich hauptsächlich renal eliminiert, ihre Konzentrationen waren meistens im Nierengewebe am höchsten.

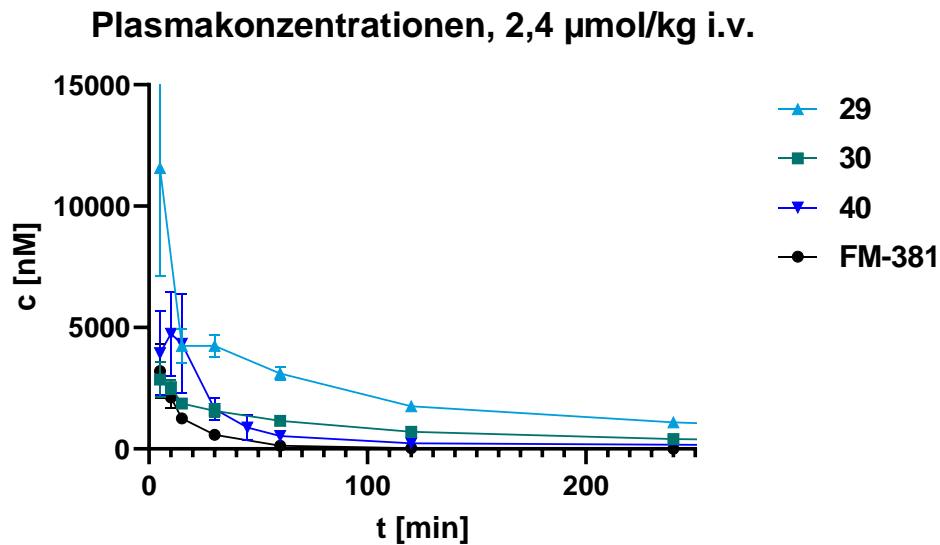
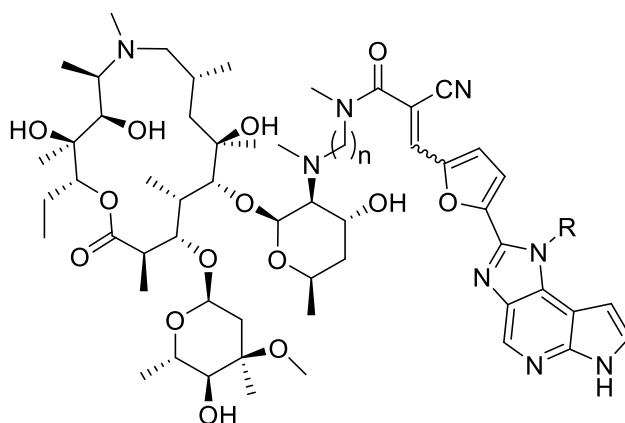


Abbildung 4.5: Vergleich der Plasmaspiegel der Leitsubstanz **FM-381** mit ihren stabileren Derivaten **29**, **30** und **40** nach i.v. Injektion von 2,4 mmol/kg der jeweiligen Substanz. Alle drei Derivate waren noch wesentlich länger im Plasma nachweisbar als **FM-381**, insbesondere das Cyclopropyl-substituierte **29**. Konzentrationen sind dargestellt als Mittelwert \pm SD. $n = 3$.

Von den drei zur Stabilitäts-Optimierung erprobten Seitenketten erwies sich der Cyclopropylrest von **29** als am besten geeignet, da er sowohl die höchsten Plasmaspiegel (**Abbildung 4.5**) als auch die niedrigste Hemmkonstante aufwies. Die Potenz im JAK3-ELISA war zwar nicht optimal, der Stoff zeigte aber sowohl im JAK-Selektivitäts-Assay (Kapitel **4.2.1**) als auch vor allem im *in vivo* Entzündungsmodell (**4.2.2**) hohe Aktivität. Er wurde demnach zur näheren Untersuchung einer potentiellen Weiterentwicklung als präklinischer Kandidat in eine Reihe weiterer Studien eingeschlossen.

Die strukturell distinkteste und auch pharmakologisch interessanteste der dargestellten Serien an Testverbindungen war die der Makrolidkonjugate: Die JAK3-Inhibitor Warheads wurden über den Rest am Cyanacrylamid und einen kurzen Linker mit einem auf Azithromycin basierten Carrier verknüpft (Kapitel **3.3**). Dies führte vor allem im Rahmen der PK-Eigenschaften zu deutlichen Unterschieden gegenüber den nicht-konjugierten Substanzen. Die synthetisierten Konjugate lassen sich ferner noch in drei Subkategorien einteilen: Zunächst wurde der Carrier über die 2'-Position am Desosamin mit den Warheads verknüpft. Als Linker dienten dabei kurze Alkyl-Ketten (**Tabelle 4.8**).

Tabelle 4.8: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der 2'-alkyl-verlinkten Makrolid-Serie.

No.	R =	n =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
13		2	192 ± 12	109 (i.v.) 236 (p.o.)	0,43	98	6
14		2	409 ± 39	65 (i.v.) 153 (p.o.)	0,37	75	3
16		2	751 ± 92	59 (i.v.) 147 (p.o.)	0,28	55	3
37		3	35 ± 3	23 (i.v.) 106 (p.o.)	0,42	96	4
39		3	109 ± 12	72 (i.v.) 142 (p.o.)	0,06	85	2
42		3	69 ± 17	84 (i.v.) 100 (p.o.)	0,49	84	2
44		4	136 ± 31	154 (i.v.) 183 (p.o.)	0,08	95	4
45		4	933 ± 202	107 (i.v.) 138 (p.o.)	0,02	99	2

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet.
^cScheinbare orale BV.

Allgemein wurde für die Konjugate eine gegenüber den unkonjugierten Analoga verringerte JAK3-Aktivität im zellfreien Assay festgestellt; vergleicht man sie jeweils miteinander, war die „freie“ Substanz (das jeweilige N,N-Dimethylcyanacrylamid-Analogen) stets potenter. Denkbar ist, dass die voluminösen Makrolide – trotz, dass sie zur Solvens-exponierten Seite der Bindetasche ausgerichtet sind – die Bindung des Warheads zur Kinase und die Verdrängung von ATP erschweren. Der Aktivitätsverlust bezog sich aber vor allem auf den rein enzymatischen Assay, der nicht zwingend die Aktivität auf zellulärer Ebene bzw. im lebenden Organismus widerspiegelt, wo auch Verteilung, Stabilität und weitere PK-Parameter eine tragende Rolle spielen. Dies zeigte sich z.B. auch durch die gute Wirksamkeit der Stoffklasse in den durchgeführten Entzündungsmodellen (Kapitel **4.2.3**, **4.3.2**). Als optimaler Linker dieser Serie erwies sich ein Propyl-Linker: Sowohl das Cyclohexyl-substituierte **37** und das N-methylpiperidin-haltige **39** wiesen die jeweils niedrigste JAK3 IC₅₀ ihrer Reihen auf. **37** war dabei auch insgesamt das potenteste Konjugat, die IC₅₀ lag mit 35 ± 3 nM nur knapp über den meisten Hemmwerten der unkonjugierten Cyclohexyl-Serie. Es ist anzunehmen, dass der vorliegende Linker ausreichend Abstand und Flexibilität zwischen Carrier und Warhead erlaubt, um eine gute Bindung zur JAK3 zu ermöglichen. Wurde der Linker um eine weitere Methylengruppe verlängert (**44**, **45**) oder verkürzt (**13**, **14**, **16**, nahm die Aktivität wieder ab.

Die Pharmakokinetik der JAK-Hemmer konnte durch die Konjugation mit den Azithromycin-Derivaten deutlich verbessert werden: Die Plasmahalbwertszeiten der Stoffe wurden stark gesteigert und lagen für die meisten Vertreter der Serie bei ungefähr 90 min in BALB/c Mäusen. Zudem war der Hauptgrund für die (initiale) Elimination der Makrolide aus dem Plasma nicht etwa metabolische Instabilität oder direkte Exkretion, sondern eine Umverteilung der Stoffe in periphere Organe. In der Tat wurden von den Konjugaten typischerweise selbst 8 h nach Verabreichung noch hohe Konzentrationen in den meisten oder gar allen Organproben (ohne ZNS) gefunden. Gerade die starke Anreicherung in Nieren- und Lebergewebe deckt sich gut mit den für Azithromycin bekannten

Verteilungsmustern.^{120–122} Dies legt nahe, dass der Makrolid-Carrier einen gegenüber den Warheads dominanten Einfluss auf die PK-Eigenschaften hat. Um dies zu unterstreichen, wurde die Carrier-Vorstufe **60a** ebenfalls in die PK-Studien eingeschlossen. Auch diese zeigte starke Anreicherung in den peripheren Organen (s. **Anhang**, **7.1**).

Ebenfalls typisch für die Konjugate waren sekundäre Plasmapeaks nach p.o. Behandlung, meist nach 90 oder 120 min. Die vorgefundenen Muster sprechen dafür, dass die Testsubstanzen einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen; es kommt

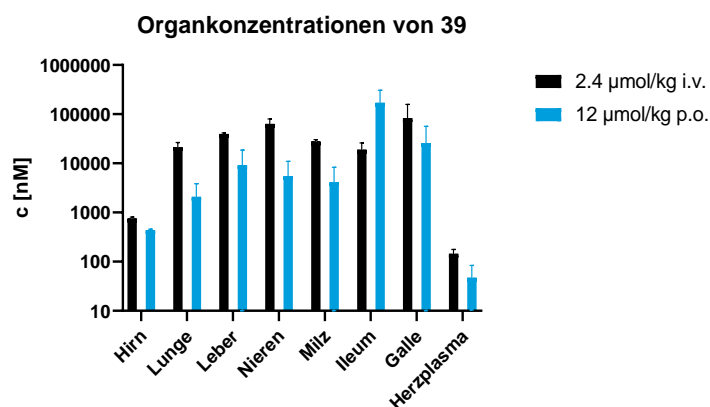


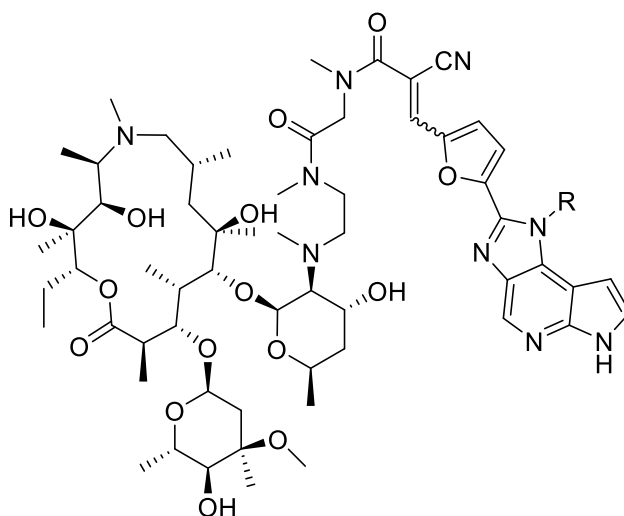
Abbildung 4.6: In Organen 8 h nach Verabreichung gemessene Konzentrationen (Mittelwert ± SD) von **39** in BALB/c Mäusen. $n = 3$

also zur Redistribution aus dem Plasma in den GI-Trakt, gefolgt von erneuter Absorption in die Peripherie. Zu dieser Annahme passen auch die erwähnten hohen Konzentrationen in Ileum und Galle. Besonders stark reicherten sich die N-methylpiperidin-substituierten Konjugate, z.B. **39** (**Abbildung 4.6**), in den Organen an. Wie schon für die unkonjugierte analoge Serie diskutiert handelt es sich hier vor allem um einen Effekt der zusätzlichen Base. Auch die Aminogruppen des Makrolidcarriers tragen deutlich zur Verteilung in Zielgewebe bzw. zum „acid trapping“ bei, wie bereits an anderer Stelle ausgeführt wird (Kapitel **4.2.5**). Selbst in Hirngewebe konnte **39** in recht hoher Konzentration detektiert werden (753 ± 54 nM nach i.v., 441 ± 18 nM nach p.o. Behandlung), was für ein Molekül dieser Größe eher unwahrscheinlich erscheint. Wie auch für **18** vermutet könnte es sich hier um eine Folge aktiver Transportprozesse handeln.

Die Bioverfügbarkeiten der Serie waren mit 2-6 % auf den ersten Blick ernüchternd niedrig. Es sollte aber bedacht werden, dass es sich dabei nur um die bereits diskutierte scheinbare orale BV handelt, die sich rein aus den – relativ niedrigen – Plasmaspiegeln berechnet und nicht die hohen Konzentrationen in den Organen miteinbezieht. Ein vermutlich geeigneterer Parameter wäre das Verteilungsvolumen unter „steady-state“ Bedingungen, d.h. nach wiederholter, regelmäßiger Behandlung und Einstellung eines Gleichgewichts. Hierfür wären aber längerfristige Kinetikstudien und ein entsprechend hoher Einsatz an Substanz nötig, was erst für die spätere Weiterentwicklung ausgewählter Kandidaten sinnvoll erscheint.

Weitere drei Konjugate wurden über einen N-methyl,N-ethyl-acetamid-Linker verknüpft (**Tabelle 4.9**). Die Substanzen waren *in vitro* weniger aktiv als ihre über eine Propyl-Brücke verknüpften Derivate (**37**, **39**, **42**). Die ist vermutlich auf die reduzierte Flexibilität der Serie zurückzuführen, die die Bindung zur JAK3 erschwert: Die Amidgruppe ist aufgrund mesomerer Effekte planar angeordnet und mindert die Beweglichkeit des Linkers. Trotz der *in vitro* gering erscheinenden Potenz als JAK3-Inhibitor zeigte **38** aber große Wirksamkeit in allgemeinen Entzündungsmodellen (Kapitel **4.3.2**) und im Colitismodell (Kapitel **4.3.5**). Die Substanz wurde durch den Bedarf für weitere Studien in größerer Menge nachsynthetisiert und für den neuen Batch erneut die Hemmstärke erfasst. Dabei ergab sich eine deutlich höhere Potenz, die in etwa der von **37** entsprach.

Ein weiterer Grund für die *in vivo* Wirksamkeit von **38** könnte auch die Entstehung aktiver Metabolite wie z.B. **48** (**Tabelle 4.1**) sein, die nach Aufnahme in den Körper frei werden und selber stärkere JAK3-Hemmung zeigen als die Konjugate.

Tabelle 4.9: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der 2'-N-ethyl, N-methylacetamid-verlinkten Makrolid-Serie.

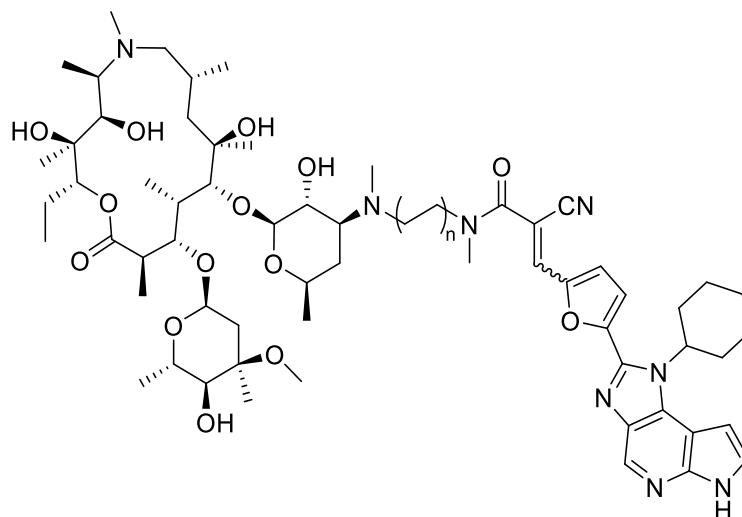
No.	R =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
38		213 ± 15 ^d ,	78 (i.v.)	0,09	97 ^e	2
		39 ± 2 ^d	130 (p.o.)			
49		375 ± 26	85 (i.v.)	0,08	73	0,2
			131 (p.o.)			
43		1051 ± 39	71 (i.v.)	0,19	72	2
			94 (p.o.)			

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV. ^dVon **38** wurden zwei Batches angefertigt, für die jeweils der Hemmwert bestimmt wurde. ^eMittelwert aus zwei Studien.

Die Plasmahalbwertszeiten waren ähnlich hoch wie die der zuvor beschriebenen Makrolide und gingen mit niedrigen Clearance-Werten einher. Nach i.v. Injektion reicherten sich die Substanzen in allen entnommenen peripheren Organen an, insbesondere aber in Leber und Nieren. **49** wurde ebenfalls in zwei- bis dreistellig nanomolaren Konzentrationen im Hirngewebe nachgewiesen. Orale Verabreichung führte vor allem zur starken Aufnahme ins Ileum. (z.B. 17 ± 2 µM für **43**). Gleichzeitig war die orale BV aber für alle drei Stoffe sehr niedrig (0,2-2 %), denkbar ist eine Anreicherung im GI-Trakt mit nur geringer nachfolgender Passage ins Plasma. Die bevorzugte Verteilung in das Darmgewebe bei geringer oraler BV macht die Konjugate dieser Serie zu vielversprechenden Kandidaten für Studien zu entzündlichen Darmerkrankungen (**4.3.5**), da hierdurch gute lokale Wirkung bei nur geringen systemischen Effekten zu erwarten ist.

Um den Einfluss der Linker-Position am Desosamin auf die JAK3-Inhibition zu testen, wurden zwei über die dortige 3'-Position verknüpfte Konjugate synthetisiert:

Tabelle 4.10: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der 3'-alkyl-verlinkten Makrolide **46** und **47**.



No.	n =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
47	1	191 ± 23	151 (i.v.)	0,18	120	4
			191 (p.o.)			
46	2	152 ± 13	112 (i.v.)	0,11	105	3
			224 (p.o.)			

^aMittelwert ± SEM (n = 3). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet.
^cScheinbare orale BV.

47 stellt dabei das 3'-Analogon von **13** und **46** das von **44** dar. Aus den jeweils sehr ähnlichen Hemmwerten der Konstitutionsisomerenpaare **44/46** (136 bzw. 152 nM) und **13/47** (192 bzw. 191 nM) geht hervor, dass es offenbar keinen Einfluss auf die JAK3-Inhibition hat, ob die Linker über die 2'- oder die 3'-Position des Desosamin-Zuckers verknüpft sind. Dies deckt sich mit der Annahme, dass sich der Makrolid-Carrier des Konjugats außerhalb der katalytischen Domäne aufhält und keine relevanten Wechselwirkungen mit der Kinase eingeht. Im zellulären LPS-Modell (s. **4.2.3**) zeigten die 2'-substituierten Konjugate eine geringfügig stärkere Wirkung als ihre Gegenstücke. Dies kann aber neben einer höheren JAK3-Affinität ebenso ein Resultat besserer Aufnahme in die Zellen, höherer Stabilität oder weiterer Parameter sein.

Die beiden Testsubstanzen waren *in vivo* stabil und hatten Plasmahalbwertszeiten von 120 (**47**) bzw. 105 (**46**) min. Wie bei den an Position 2' verbundenen Analoga reicherten sich die Stoffe stark in den Organgeweben an, v.a. in Leber, Nieren und Ileum, wo noch 8 h nach i.v. Injektion zweistellig mikromolare Konzentrationen erreicht wurden. Beide Substanzen wurden auch in unerwartet hohen Konzentrationen ($2,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$ für **46** i.v., $2,2 \pm 1,7 \mu\text{M}$ für **47** i.v.) im Hirn vorgefunden, wenn auch mit starker Streuung zwischen den Tieren. Auf molekularer Ebene sollte der Wechsel vom 2'- zum 3'-verknüpftem Linker aber keinen nennenswerten Einfluss auf die Passage der BHS haben. Weiterführende PK-Studien sind anzuraten, um diesen Befund zu bestätigen und Kontamination der Hirnproben auszuschließen.

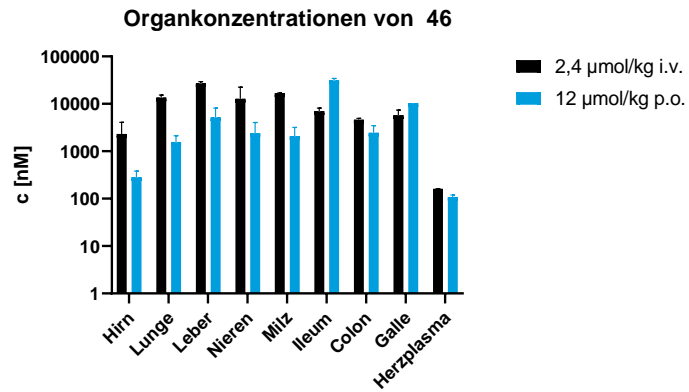
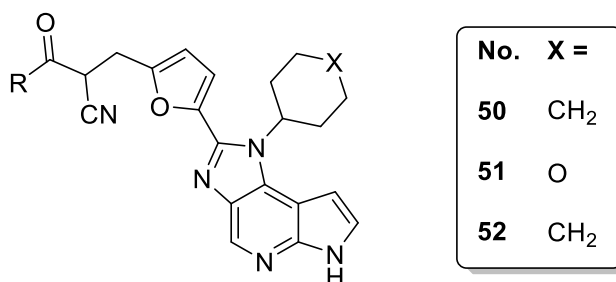


Abbildung 4.7: In Organen 8 h nach Verabreichung gemessene Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **46** in BALB/c Mäusen. $n = 3$

Um die Bedeutung des elektrophilen Michael-Akzeptor Warheads für die JAK3-Aktivität der Substanzen näher zu erforschen, wurde eine Reihe gesättigter Derivate verschiedener Testsubstanzen synthetisiert (**Tabelle 4.11**). Diese können keine kovalente Bindung mehr zu C909 eingehen, was zu einem Verlust an Potenz und auch an Selektivität führen sollte. In der Tat nahm die Aktivität durch die Reduktion der relevanten Doppelbindung signifikant ab: Im Falle des aus **FM-381** erhaltenen Derivats war die JAK3-Hemmkonstante um ein über 50-Faches höher. Für die beiden Tetrahydropyran-substituierten Stoffe **51** und **52** waren die Unterschiede zu den ungesättigten Vorstufen mit Faktor 20 bzw. 14 vergleichsweise geringer, aber immer noch markant.

Tabelle 4.11: PK-Parameter und JAK3-Hemmwerte der reduzierten Serie.

No.	R ² =	JAK3 IC ₅₀ [nM] ^a	MRT [min]	Clearance [ml/min]	t _{1/2} [min] ^b	BV ^c [%]
50		657 ± 31	23 (i.v.) 69 (p.o.)	0,60	16	45
51		469 ± 43	43 (i.v.) 68 (p.o.)	0,85	28	7
52		286 ± 48	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d	n.b. ^d

^aMittelwert ± SEM ($n = 3$). ^bBiologische Halbwertszeiten wurden aus den Kurven der i.v. PK-Studien berechnet. ^cScheinbare orale BV. ^dNicht bestimmbar, da die Stoffkonzentrationen in Plasmaproben unterhalb der Quantifizierungsgrenzen lagen.

Der Verlust an Aktivität ist deutlich drastischer als bei den von Michael Forster beschriebenen Acrylamiden (**Abbildung 4.8**), wo er z.B. bei der strukturell ähnlichsten Substanz und deren reduziertem Derivat gerade mal das Dreifache beträgt.⁷² Aufgrund dieser Tatsachen konnte bei den Acrylamiden nicht von kovalenter Bindung an C909 ausgegangen werden, während der größere Unterschied von **FM-381** zu **50** dem schon mehr entspricht (und die beiden Bindemodi der Cyanacrylamide in der JAK3 schon im Rahmen der Forster-Arbeit nachgewiesen wurden).

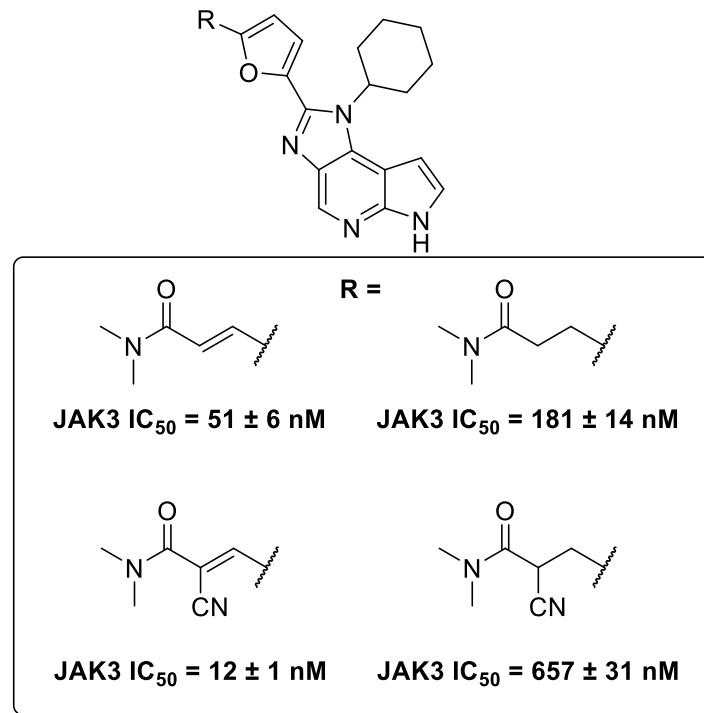


Abbildung 4.8: Einfluss des Michael-Akzeptors sowie der α -Nitril-Gruppe auf die JAK3-Aktivität. Die oberen beiden Substanzen wurden in einer Publikation von Michael Forster veröffentlicht.⁷² Die JAK3 IC₅₀ des unten links abgebildeten **FM-381** entspricht der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Charge. Die unten rechts abgebildete Struktur stellt das reduzierte Analogon **50** dar. Der wesentlich größere Aktivitätsverlust nach Reduktion des Cyanacrylamids (verglichen mit dem Acrylamid) legt die Bedeutung des kovalenten Bindemodus für die JAK3-Hemmung nahe.

Interessanterweise lag die antiinflammatorische Potenz von **50** im *in vitro* LPS-Assay (Kapitel 4.2.3) nicht hinter denen der ungesättigten Analoga zurück: Der Stoff war ebenso wie die anderen Substanzen potent darin, die TNF α -Freisetzung stark zu reduzieren (s. **Anhang, 7.2.4**).

Die Plasmahalbwertszeiten der Substanzen wurden durch die Reduktion nicht wesentlich beeinflusst. Allerdings stieg die orale Bioverfügbarkeit des **FM-381**-Derivats **50** bemerkenswert an (von 10 % auf 45 %) und es wurden durch p.o. Gabe hohe Spitzenkonzentrationen im Plasma erreicht. Eine mögliche Erklärung ist, dass das reaktivere **FM-381** in der Lage ist, unspezifische Michael-Reaktionen mit Nucleophilen im GI-Trakt bzw. in dessen Schleimhäuten einzugehen, was die verfügbaren Mengen an unveränderter Substanz mindert. Alternativ könnte es nach der Aufnahme in Darmzellen zu einer Reduktion der Doppelbindung durch Glutathion oder andere Reduktionsmittel kommen. Für das Tetrahydropyran-substituierte Paar **8/51** wurde keine derartige Steigerung der Bioverfügbarkeit beobachtet (wenngleich die Plasmaspiegel von **51** sowohl nach i.v. als auch nach p.o. Verabreichung höher lagen als bei gleich dosiertem **8**). Möglicherweise ist der Tetrahydropyran-Rest in dieser Hinsicht limitierend, weil er relativ schnell metabolisch umgewandelt wird. Die Substanzen der reduzierten Serie werden wahrscheinlich hauptsächlich hepatisch-biliär eliminiert, die höchsten Konzentrationen zum Terminationszeitpunkt lagen in Ileum, Galle und der Leber vor.

4.2 Weitere in vitro Testverfahren

4.2.1 Selektivität innerhalb der JAK-Familie

Die Selektivität der von Michael Forster entwickelten Leitverbindung **FM-381** über das menschliche Kinom hinweg wurde bereits dargelegt und in der Einleitung ausführlich beschrieben (Kapitel **1.7.2**).^{4,45} Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Testsubstanzen sind strukturell verwandte Derivate, die ebenfalls den (zur Selektivität beitragenden) Cyanoacrylamid-Warhead aufweisen. Dennoch können sich die eingeführten Änderungen, z.B. der Austausch des Cyclohexyl-Rests, auf das Selektivitätsprofil auswirken. Die Selektivität von vier Testsubstanzen (drei mit neuer Seitenkette in der Selektivitätstasche sowie ein Makrolidkonjugat) innerhalb der JAK-Familie wurde mit dem radiometrischen Assay der Firma Reaction Biology bestimmt. Der Assay nutzt ATP, dessen in γ -Position befindliche Phosphatgruppe mit ³³P markiert wurde. Die Übertragung des radioaktiven Phosphatrests auf das Substrat kann so – nach Fixierung des Substrats und Auswaschen von verbliebenem ATP – szintigrafisch quantifiziert werden. Über den Einsatz der Testsubstanzen in einer Verdünnungsreihe wird die Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermöglicht, aus der die IC₅₀-Werte für die jeweilige Kinase bestimmbar sind.

Tabelle 4.12: IC₅₀-Werte der Verbindungen **18**, **22**, **29** und **37** für die vier JAK-Isoformen.

IC ₅₀ [nM] ^a				
No.	JAK1	JAK2	JAK3	TYK2
18	541 ± 101	5116 ± 86	12 ± 0,3	> 10 µM
22	> 10 µM	4128 ± 197	8 ± 0	7212 ± 251
29	> 10 µM	1965 ± 30	16 ± 1,5	9647 ± 0
37	1339 ± 36	584 ± 48	9 ± 0,8	1059 ± 68

^aIC₅₀-Werte aus einem radiometrischen Assay der Firma Reaction Biology mit 10-Punkt Duplikatmessung (Von 10 µM bis 0,3 nM). [ATP] = 1 µM (JAK1), 0,3 µM (JAK2) oder 0,1 µM (JAK3, TYK2).

Generell lagen die JAK3-Hemmwerte der Testsubstanzen im radiometrischen Assay deutlich niedriger als im JAK3 ELISA (Kapitel **4.1**). Die beiden Assays unterscheiden sich aber in Aspekten wie der eingesetzten Konzentration der Kinasen, ATP und DTT, sowie im Ablauf (im radiometrischen Assay lagen die Testsubstanzen und ATP gleichzeitig in Lösung vor, bevor Enzym und Substrat zugegeben wurden; im ELISA werden zunächst Substrat, ATP und Inhibitor vorgelegt, bevor die Kinase zugegeben wird). Auf einige Unterschiede und deren potentielle Auswirkungen wurde bereits ausführlich in Michael Forsters Arbeit eingegangen.⁴

Interessant ist unter diesen Gesichtspunkten auch, wie sich die JAK3-Aktivitäten der Inhibitoren relativ zueinander verhalten. Die Spanne der ermittelten JAK3 IC₅₀-Werte

im radiometrischen Assay betrug ca. 8-16 nM, somit waren die Hemmwerte für alle vier Stoffe recht ähnlich (zum Vergleich: Beim ELISA lagen die Werte zwischen 28 und 122 nM). Die beiden N,N-dimethylcyanoacrylamide **22** und **29**, die sich von **FM-381** nur über die am Imidazol befindliche Seitenkette unterscheiden (4,4-Difluorocyclohexan bzw. Cyclopropan), zeigten beide ausgezeichnete Selektivität für JAK3: Die Hemmwerte für JAK3 lagen im ein- bzw. niedrig zweistelligen nanomolaren Bereich, während andere Kinasen deutlich schwächer gehemmt wurden (IC_{50} Werte im mikromolaren Bereich bzw. sogar außerhalb der Assay-Grenze von 10 μ M). Die Präferenz für JAK3 der Leitsubstanz konnte also beibehalten werden. **18**, das über eine N-methylpiperidin-Seitenkette am Imidazol und einen N-methyl-methylglycinat-Rest verfügt, hemmte die JAK3 ebenfalls potent ($IC_{50} = 12$ nM). Auch die JAK1 wurde in gewissem Maße inhibiert, allerdings um ca. Faktor 45 geringer als die JAK3. Möglicherweise rührt der Selektivitätsverlust von der – in der JAK3 weniger gut tolerierten – basischen Seitenkette her, die die Selektivitätstasche adressieren soll. Gegen die anderen beiden Isoformen wurde für **18** kaum Aktivität festgestellt. Das sterisch anspruchsvolle Makrolidkonjugat **37** inhibierte die JAK2 im dreistellig nanomolaren Bereich und JAK1/TYK2 im niedrigen mikromolaren. Auch wenn dabei immer noch eine starke Präferenz für JAK3 vorlag (ca. 65-fach gegenüber JAK2), sollte dies bei der Interpretation von zellulären oder *in vivo* Daten mit **37** im Gedächtnis behalten werden. Die Makrolide reichern sich bekanntermaßen stark in bestimmten Zellkompartimenten bzw. Geweben an (Kapitel **4.1**), wodurch – aufgrund der hohen vorliegenden Konzentrationen – auch eine Inhibierung der off-target Kinasen nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. In den LPS Challenge Modellen (Kapitel **4.2.3**, **4.3.2**) zeigen die vier genannten Substanzen ähnlichen Einfluss auf die Freisetzung von IL-6, IL-10 und $TNF\alpha$ wie **FM-381**, was nahelegt, dass es sich um JAK3-abhängige Effekte handelt. Die off-target Hemmung anderer Kinasen scheint bei den dort eingesetzten Konzentrationen noch keinen relevanten Einfluss auf die Readouts zu haben.

Zur Interpretation der Daten sollten auch die jeweiligen Michaelis-Menten-Konstanten (K_m -Werte) der Kinasen und die verwendeten Konzentrationen an ATP beachtet werden. Der K_m -Wert gibt die Affinität einer Kinase zu einem bestimmten Substrat wieder und beschreibt die Konzentration an Substrat, bei der die enzymatisch katalysierte Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit stattfindet. ^{33}P -ATP wurde je nach Kinase in einer Konzentration von 0,1-1 μ M eingesetzt, was in etwa den für diesen Assay angegebenen K_m -Werten entspricht. Die Konzentrationen lagen somit für alle vier Kinasen deutlich niedriger als die intrazelluläre ATP-Konzentration, die üblicherweise im niedrigen millimolaren Bereich liegt.¹²³ Im Gegensatz zu den anderen JAK-Isoformen zeigt die JAK3 eine höhere Affinität zu ATP. Mit anderen Worten: Es ist bei hypothetisch gleicher ATP-Konzentration schwieriger für Hemmstoffe, ATP aus der JAK3 zu verdrängen und selbst die ATP-Bindetasche zu besetzen, als bei den anderen JAKs. Demnach ist zu erwarten, dass bei hohen (= physiologischen) ATP-Konzentrationen die Selektivität eines Inhibitors für die JAK3 geringer ausfällt als bei niedrigen (bzw. dass der Aktivitätsverlust gegenüber der JAK3 stärker ist als gegenüber anderen Isoformen). Vor allem bei rein reversibel bindenden Inhibitoren kann dies problematisch sein. Bei den hier eingesetzten Testsubstanzen handelt es sich aber wahrscheinlich wie bei **FM-381** um kovalent-reversibel bindende Inhibitoren. Diese sind nur *teilweise* ATP-kompetitiv, nach Ausbilden der kovalenten Bindung zur Kinase ist eine Verdrängung des Hemmstoffs durch ATP nicht mehr möglich. Bei den von

Michael Forster dargestellten Cyanoacrylamiden konnte so auch noch bei ATP-Konzentrationen weit über dem K_m -Wert gute JAK3-Selektivität beobachtet werden.^{4,72}

4.2.2 Zelluläre Aktivität gegen die JAK3

Um die Aktivität der Testverbindungen gegen die JAK3 auf zellulärer Ebene nachvollziehen zu können, wurden diese im Rahmen eines nanoBRET Assays getestet. Im Gegensatz zum zellfreien ELISA an der isolierten Kinase sind die Gegebenheiten hier komplexer und entsprechen mehr den realen Bedingungen. Unter anderem fallen nun ebenfalls die Aufnahme, Verteilung und Stabilität der Testsubstanzen in Zellen ins Gewicht.

Beim (nano)BRET-Verfahren werden Zellen eingesetzt, die ein Fusionsprotein aus der zu untersuchenden Kinase – bzw. deren katalytischer Domäne – sowie einer für die Biolumineszenz verantwortlichen Luciferase exprimieren. Die durch die Luciferase (NanoLuc) emittierte Energie wird vom Fluorophor eines Tracer-Moleküls aufgenommen, welches wiederum ein Fluoreszenz-Signal emittiert. Für diesen Energieübertragungsvorgang ist die räumliche Nähe von Luciferase und Tracer notwendig. Werden Tracermoleküle durch die Testsubstanz verdrängt, sinkt die Intensität des gemessenen Signals.

Zusätzlich zum üblichen Verfahren mit intakten Zellen wurde auch eine Variante des Assays durchgeführt, bei dem die Zellen mithilfe von Digitonin lysiert wurden. Die Lyse wurde nach der Inkubationszeit der Zellen mit den Stoffen, aber vor Zugabe des Tracers durchgeführt. Ziel war es, die Potenz der Hemmstoffe auch unabhängig von Faktoren wie der intrazellulären Anreicherung in Subkompartimenten (wie z.B. in den Lysosomen) und von der Membranpassage zu evaluieren. Die Ergebnisse beider Verfahren sind in **Tabelle 4.13** dargelegt:

Tabelle 4.13: Zelluläre Aktivität gegen JAK3, bestimmt durch nanoBRET-Verfahren.

No.	IC ₅₀ , intakt [µM] ^{a,b}		IC ₅₀ , lysiert [µM] ^{a,c}		Verhältnis
Tofacitinib	0,89	± 0,4	0,23	± 0	3,9
FM-381	0,35	± 0,2	0,10	± 0	3,5
13	>45		16,5	± 2,6	/
15	1,03	± 0,4	0,27	± 0	3,8
18	1,36	± 0,2	0,21	± 0	6,5
21	0,88	± 0	0,12	± 0	7,7
22	0,60	± 0,1	0,13	± 0	4,6
26	n.b. ^d		0,27	± 0	/
29	3,81	± 0,1	0,44	± 0,1	8,7
30	9,71	± 1,5	0,47	± 0,1	20,5
37	19,86	± 3,8	2,2	± 0,1	9,0
38	>45		9,53	± 0,7	/
39	12,56	± 5,4	0,76	± 0,1	16,42
40	8,43	± 4,9	1,33	± 0,2	6,4

^aErhalten aus den BRET-Signalverhältnissen bei elf Verdünnungsschritten. ^bn = 4. ^cn = 2. ^dDie Verdrängung des Tracers konnte für diesen Stoff nicht bestimmt werden, da es zu einer Störung des BRET-Signales kam.

Die ermittelten Aktivitäten der Testsubstanzen im ersten Assay (intakte Zellen) decken sich, relativ zueinander betrachtet, im Allgemeinen gut mit jenen aus den zellfreien Experimenten (4.1). **FM-381** zeigte nach wie vor die höchste Potenz unter den JAK3 Inhibitoren (IC₅₀ = 0,35 ± 0,2 µM). Der andere Vertreter der Cyclohexyl-Serie, **21**, und das Difluorcyclohexyl-substituierte **22** waren ebenfalls hoch aktiv (IC₅₀ = 0,88 ± 0 bzw. 0,60 ± 0,1 µM) und vergleichbar mit Tofacitinib. Das N-methylpiperidin Analog von **FM-381**, **15**, zeigte die vierthöchste Aktivität unter den Testsubstanzen (IC₅₀ = 1,03 ± 0,4 µM) und war damit unerwarteter Weise deutlich potenter als im zellfreien Assay, wo der Aktivitätsverlust gegenüber **FM-381** stärker ausgeprägt war (dort ca. Faktor 12). Als möglicher Grund ergibt sich die gesteigerte Aufnahme in die Zellen aufgrund des tertiären Amins; durch die erhöhten Konzentrationen könnte der Potenzverlust durch die - für die Hemmung weniger günstige - Base teilweise ausgeglichen werden.

Die Makrolide (**13**, **37-39**) schnitten im ersten Experiment alle eher schlecht ab, ihre Hemmwerte lagen alle im zweistellig mikromolaren Bereich bzw. außerhalb der Bestimmungsgrenzen. Es bieten sich mehrere Erklärungsansätze: Zum einen könnte eine schlechte Aufnahme der voluminösen Stoffe in die HEK293T-Zellen zu niedrigen intrazellulären Konzentrationen führen. Dies widerspricht allerdings den Befunden der fluoreszenzmikroskopischen Experimente (Kapitel 4.2.5), bei denen für die Makrolide gute intrazelluläre Anreicherung beobachtet wurde. Ein weiterer Grund könnte die Struktur des JAK3/nanoLuc-Fusionsproteines sein: Es ist größer als die natürliche JAK3 und gegebenenfalls erschwert die zusätzliche nanoLuc-Domäne den Zugang zur ATP-Bindetasche vor allem für sterisch anspruchsvolle Inhibitoren. Zuletzt könnte die erwähnte Anreicherung der Stoffe, die vor allem im lysosomalen Kompartiment stattfindet, einen Nachteil für die Aktivität darstellen. Zu hohe Anreicherung dort würde

potentiell die Konzentration im Cytosol mindern, wodurch letztendlich weniger Moleküle zur Inhibition der (zytosolischen) Kinasen zur Verfügung stehen. In anderen Experimenten, wie z.B. der Stimulation von Zellen mit Lipopolysacchariden (Kapitel **4.2.3**), war die (antiinflammatorische) Wirksamkeit der Makrolide vergleichbar mit der ihrer unkonjugierten Gegenstücke, was gegen einen tatsächlichen starken Aktivitätsverlust spricht.

Im zweiten Experiment (lysierte Zellen) wurden für alle Stoffe niedrigere IC_{50} -Werte ermittelt als im Vorigen. Die Aktivität war tendenziell am meisten erhöht für Stoffe, für die bei den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten eine starke intrazelluläre bzw. intralysosomale Anreicherung beobachtet wurde (Kapitel **4.2.5**). Dies betrifft z.B. das N-methylpiperidin-substituierte Makrolidkonjugat **39**, dessen Aktivität sich im lysierten Assay um ein Sechzehnfaches steigerte (IC_{50} von $12,56 \pm 5,4$ auf $0,76 \pm 0,1 \mu M$). Damit war es sogar noch potenter als **37** ($IC_{50} = 2,2 \pm 0,1 \mu M$), das in den zellfreien Messungen noch das aktivste Makrolid war (Kapitel **4.1**). Plausibel erscheint, dass die Lyse der Zellmembranen auch zum Zusammenbruch der Membranen intrazellulärer Kompartimente, z.B. der Lysosomen, führt. Dies würde große Mengen der dort über „acid trapping“ angereicherten Testsubstanzen freisetzen, die dann in hoher Konzentration vorlägen um die Kinase zu binden.

Ein erwähnenswertes Problem des Assays für die verwendeten Stoffe lag in der Signalerfassung: Das von der nanoLuc-Luciferase ausgestrahlte Licht wird bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert, die des Tracermoleküls bei 610 nm. Farbintensive bzw. fluoreszierende Testsubstanzen könnten, vor allem bei höheren Konzentrationen, die Signalerfassung stören und die Ergebnisse verfälschen. Zum Zeitpunkt der Durchführung war das Absorptions- und Emissionsverhalten der dargestellten Stoffe noch nicht bekannt. Durch ihr ausgeprägtes π -System absorbiert bzw. emittiert die überwiegende Mehrheit davon aber in für die Messung relevanten Bereichen (Kapitel **4.2.5**). Sollte die Emission einer durch das Luciferase-Signal angeregten Testsubstanz sich mit der Emission des Tracers überschneiden, würde dies eine schwächere Inhibition der Kinase (bzw. weniger gute Verdrängung des Tracers) vortäuschen. Zusammengefasst ist also nicht auszuschließen, dass die wahre Aktivität der Testsubstanzen höher liegt als die Messungen nahelegen. Dies würde besonders auf die Vertreter mit guter intrazellulärer Anreicherung, z.B. **18** und die Makrolidkonjugate zutreffen.

4.2.3 Zytokinausschüttung nach LPS-Stimulus

Neben der Bestimmung der spezifischen Potenz als JAK3-Inhibitoren wurden sämtliche Testsubstanzen auch auf ihre allgemeine antiinflammatorische Wirksamkeit untersucht. Das hierzu eingesetzte Routineverfahren umfasst die Inkubation von Immunzellen mit den JAK-Hemmern vor Zugabe bakterieller Lipopolysaccharide (LPS), die für einen Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) -basierten Entzündungsreiz sorgen (siehe auch Kapitel **4.3.2**). Anschließend werden per ELISA die Konzentrationen der produzierten Zytokine quantifiziert. Gemessen wurden i. d. R. $TNF\alpha$ als pro- und IL-10 als antiinflammatorischer Marker sowie in einigen Fällen das ebenfalls proinflammatorische IL-6.

Die Auswirkungen der Hemmung verschiedener JAKs *in vitro* sind in manchen Fällen stark von den experimentellen Bedingungen wie Zelltypen, Polarisierung der Zellen, Stimulus und Konzentration der Inhibitoren abhängig. So wurden beispielsweise für die Hemmung der JAK1 und 3 sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte festgestellt.^{124,125}

Die Substanzen wurden üblicherweise in menschlichem Buffy Coat (HBC) getestet, welcher reich an Granulozyten, Monozyten, aber auch den Zellen der adaptiven Immunantwort ist. Das Gemisch verschiedener Zelltypen bietet den Vorteil, dass es realitätsnäher ist als der Einsatz einer einzelnen, definierten Zelllinie; dafür können die Ergebnisse aber wiederum nicht auf einen bestimmten verantwortlichen Zelltyp zurückgeführt werden. Deswegen wurden für einige Substanzen noch weiterführende Experimente in anderen Systemen, z.B. mit Vollblut, PBMCs und monoklonalen Zelllinien durchgeführt. Bei den HBC- und Vollblut-Assays ist zu beachten, dass es sich um unbekannte und stets verschiedene Spender handelte, was aufgrund individueller Schwankungen des Blutbilds den quantitativen Vergleich der durchgeführten Experimente erschwert. Eine Auswahl an repräsentativen Datensätzen werden im Folgenden diskutiert. Weitere Assay-Ergebnisse sind **im Anhang** (Kapitel **7.2.4**) zu finden.

4.2.3.1 Selektivitätsvergleich in HBC

Die kommerziell verfügbaren JAK-Inhibitoren Upadacitinib (selektiv für JAK1), Ruxolitinib (JAK1/2) und Tofacitinib (pan-JAK) wurden mit dem als JAK3-selektiv bekannten **FM-381** verglichen (**Abbildung 4.9**). So sollten *in vitro* „Zytokinprofile“ für die jeweiligen Selektivitäten unter den vorliegenden Assaybedingungen erfasst werden.

Generell ähnelten sich die Zytokinmuster der kommerziellen Vergleichsstoffe, was nahelegt, dass die Effekte aus der (den Stoffen gemeinsamen) Inhibition der JAK1 resultieren. Bei allen dreien kam es zu einem deutlichen Anstieg der TNF α -Freisetzung (bis zu ca. dem Doppelten der Kontrollzellen), der für Upadacitinib und Tofacitinib konzentrationsabhängig verlief. Höhere Konzentrationen (5 μ M) an Ruxolitinib führten wiederum zu einer Normalisierung der TNF α -Werte auf Kontrollniveau; dies lässt sich entweder auf beginnende off-target Effekte (oder zunehmende Auswirkungen der JAK2-Hemmung) zurückführen, oder aber auf Zytotoxizität des Stoffs bzw. verminderte Viabilität der Immunzellen. Der selektive JAK3-Inhibitor **FM-381** erzeugte dagegen eine konzentrationsabhängige Senkung der TNF α -Freisetzung, die bei höheren Dosen sogar nahezu vollends gestoppt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit den anderen in dieser Arbeit dargestellten JAK3-Hemmern erzielt (s.u. bzw. **Anhang, 7.2.5**).

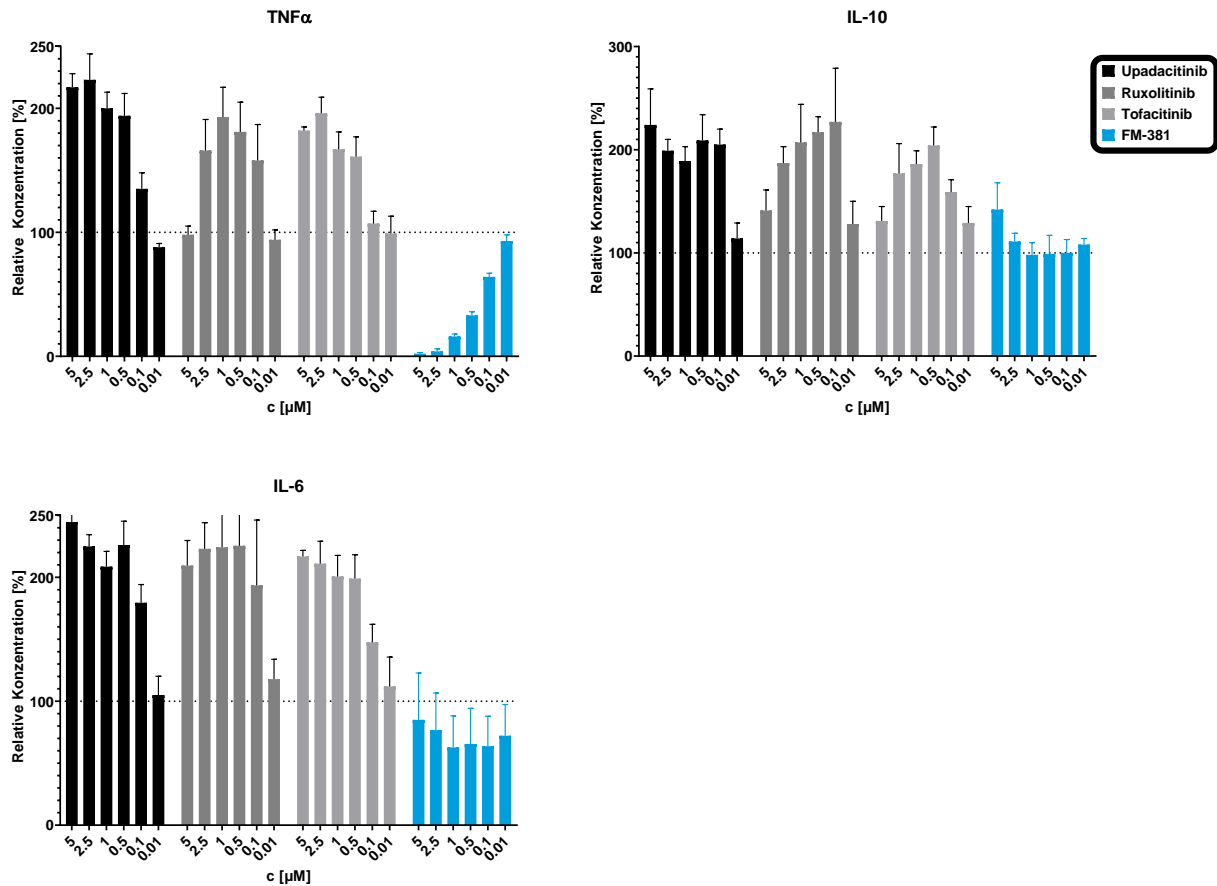


Abbildung 4.9: Nach Behandlung von HBC-Zellen mit verschiedenen JAK-Inhibitoren und LPS gemessene Konzentrationen von TNF α (oben links), IL-10 (oben rechts) und IL-6 (unten links). Die kommerziell erhältlichen Inhibitoren Upadacitinib, Ruxolitinib und Tofacitinib, denen die Hemmung der JAK1 gemein ist, hatten ähnliche Effekte auf die bestimmten Zytokine. Durch sie kam es zu einer gesteigerten Ausschüttung von TNF α , IL-6 und IL-10 (jeweils bis ca. Faktor 2). Das JAK3 selektive **FM-381** führte dagegen zu einer konzentrationsabhängigen Senkung der TNF α -Produktion (auf < 10 % der Kontrolle bei 2,5 μ M **FM-381**), während IL-6 und IL-10 relativ unbeeinflusst blieben. $n = 3$.

Ähnlich zu TNF α wurde das proinflammatorische Zytokin IL-6 in mit den (u.a.) JAK1-hemmenden Inhibitoren behandelten Zellen ebenfalls verstärkt produziert bzw. freigesetzt (bis zu ca. 250 % der LPS-Kontrolle bei 5 μ M Upadacitinib). Upadacitinib, Ruxolitinib und Tofacitinib unterschieden sich dabei nur geringfügig in ihrer Wirkung. Es ist erneut davon auszugehen, dass der Effekt durch die Inhibition der JAK1 ausgeht. Im Gegensatz dazu war eine selektive Hemmung der JAK3 mit einer (geringfügigen) Senkung des detektierten IL-6 verbunden. In den meisten Experimenten waren die Auswirkungen der dargestellten Testsubstanzen auf IL-6 aber eher gering. Gelegentlich kam es bei höheren Konzentrationen auch zu gesteigerter Freisetzung von IL-6 (s.u.); es ist aber anzunehmen, dass es sich hier eher um ein Symptom beginnender Zytotoxizität handelt, als um einen JAK3-assoziierten Effekt.

Auch bezüglich der Freisetzung des antiinflammatorischen IL-10 verhielten sich die kommerziellen Inhibitoren ähnlich, es kam bei den meisten verwendeten Konzentrationen zu einer Steigerung. Interessanterweise unterschieden sich aber Ruxolitinib und Tofacitinib bei höheren Konzentrationen von Upadacitinib: Die gemessenen IL-10 Konzentrationen näherten sich wieder dem Kontrollniveau, während sie bei Upadacitinib weiterhin stark erhöht blieben. Dies legt nahe, dass die durch beide

Stoffe hervorgerufene JAK2-Hemmung bei diesen Konzentrationen potentiell einen IL-10 senkenden Einfluss haben könnte. **FM-381** hatte bis ca. 1 μM keine nennenswerten Auswirkungen auf die IL-10 Spiegel, erst bei höheren Konzentrationen kam es zu einer Steigerung über den Kontrollwert. Ähnlich verhielt es sich auch in weiteren Assays mit verwandten Substanzen, wobei – in Abhängigkeit von Spender bzw. Zelltyp und Substanz – auch Senkungen der IL-10 Freisetzung beobachtet wurden. Letztere waren aber meist nur gering ausgeprägt (s.u. bzw. **Anhang, 7.2.5**). Eine Senkung der $\text{TNF}\alpha$ Produktion bei unbeeinflussten bzw. sogar gesteigerten IL-10 Spiegeln ist zur Bekämpfung akuter oder chronischer Entzündungen besonders potent und wünschenswert. Auch *in vivo* wurden diese Effekte für die in dieser Arbeit hergestellten JAK3-Hemmer dargelegt (Kapitel **4.3.2**).

4.2.3.2 Vergleich von FM-381 mit verschiedenen Derivaten

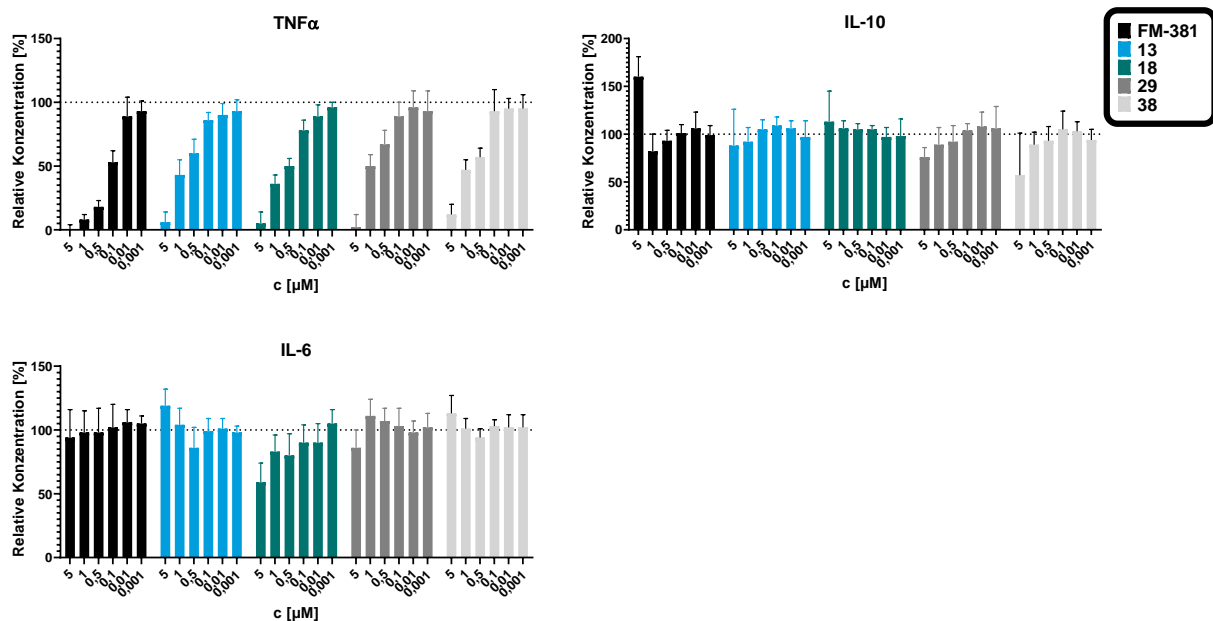


Abbildung 4.10: Nach Behandlung von HBC-Zellen mit verschiedenen JAK3-Inhibitoren und LPS gemessene Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ (oben links), IL-10 (oben rechts) und IL-6 (unten links). Die Stoffe folgen dem bereits für **FM-381** beschriebenen Muster einer konzentrationsabhängigen Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion und nur geringfügiger Beeinflussung von IL-6 und IL-10. $n = 3$.

Abbildung 4.10 zeigt einen typischen Datensatz aus HBC. Verglichen wurde **FM-381** mit verschiedenen Derivaten, die sich entweder im Substituenten an der JAK-Selektivitätstasche (**18**, **29**) unterscheiden, oder an einen Makrolid-Carrier verlinkt wurden (**13**, **38**). Im Allgemeinen erzeugten die Substanzen sehr ähnliche Zytokinprofile, was als indirektes Indiz für deren recht selektive Hemmung der JAK3 gewertet werden kann.

Wie für **FM-381** bereits beschrieben kam es auch bei Einsatz der anderen Substanzen zu einer starken Reduktion der $\text{TNF}\alpha$ Freisetzung, die durch die höchste Dosis gegen

Null gesenkt wurde. **FM-381**, das unter den Substanzen die höchste Aktivität gegen die JAK3 zeigt, hatte dabei auch den stärksten Effekt auf die $TNF\alpha$ Werte.

Auf die IL-6 Spiegel hatten die Testsubstanzen überwiegend geringen Einfluss; einzig **18** führte bei höheren Konzentrationen zu einer Senkung (auf ca. die Hälfte des Kontrollwerts bei 5 μM des Wirkstoffs).

Die Freisetzung von IL-10 wurde ebenfalls nur schwach beeinflusst. Für höhere Konzentrationen einiger Stoffe wurde eine leichte Minderung beobachtet, die aber aufgrund der starken Streuung nur von geringer Aussagekraft ist. Wie schon im zuvor gezeigten Experiment führte die höchste Dosis von **FM-381** zu einer deutlichen Steigerung der IL-10 Werte. Potentielle Ursachen werden bereits an anderer Stelle diskutiert.

4.2.3.3 Vergleich mit Tofacitinib und Ruxolitinib

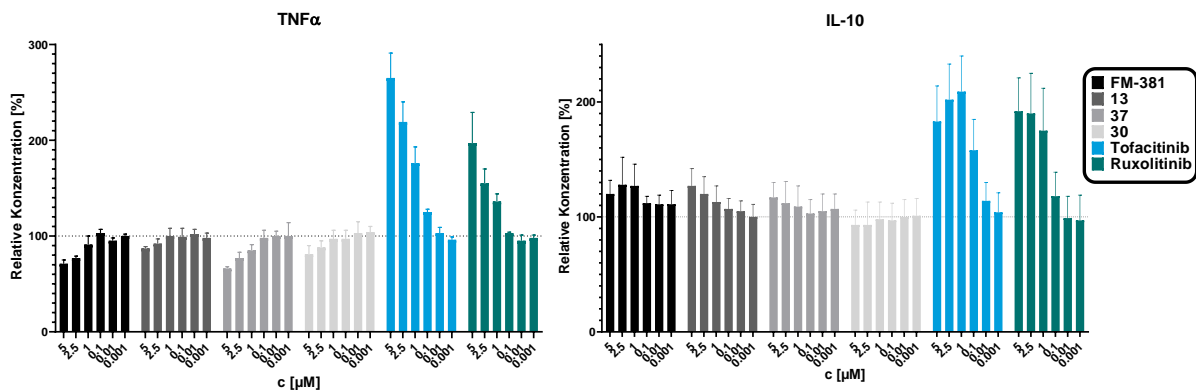


Abbildung 4.11: Nach Behandlung von HBC-Zellen mit JAK3-Inhibitoren (**FM-381**, **13**, **37**, **30**), Tofacitinib oder Ruxolitinib und LPS gemessene Konzentrationen an $TNF\alpha$ (links) und IL-10 (rechts). Wieder kam es zur $TNF\alpha$ -Senkung durch die JAK3 Hemmer, während die (u.a.) JAK1 inhibierenden Vergleichssubstanzen zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der $TNF\alpha$ -Ausschüttung führten. Die IL-10 Konzentrationen wurden von Tofacitinib und Ruxolitinib stark (bis auf das Doppelte), von den JAK3 Hemmern **FM-381**, **13** und **37** nur mäßig (bis zu ca. 20 %) erhöht. $n = 3$.

Tofacitinib und Ruxolitinib wurden in vielen Assays als Vergleichssubstanzen miteingeschlossen. **Abbildung 4.11** zeigt die Ergebnisse eines solchen Assays, bei dem **FM-381** mit zwei Makrolid-verknüpften Derivaten sowie dem phenyl-substituierten **30** verglichen wurde. Die nicht JAK3-selektiven Inhibitoren hatten die gleichen Effekte auf die Zytokinfreisetzung wie schon in **Abbildung 4.9** dargestellt: Sowohl die $TNF\alpha$ - als auch die IL-10-Spiegel wurden mit steigenden Wirkstoffkonzentration deutlich erhöht.

Die JAK3-selektiven Testsubstanzen zeigten das typische Muster aus $TNF\alpha$ -Senkung und schwach gesteigerter IL-10 Produktion (mit Ausnahme von **30**, bei dem die IL-10 Konzentrationen bei höheren Dosen stattdessen geringfügig abnahmen). Die $TNF\alpha$ -Werte spiegeln zudem gut die unterschiedliche Potenz der Stoffe wieder: **37**, dessen JAK3 IC_{50} um ein ungefähr Sechsfaches niedriger liegt als jene von **13**, führte bei gleicher Konzentration auch zu stärkerer Senkung der $TNF\alpha$ -Werte.

4.2.3.4 Vergleich unkonjugierter Testsubstanzen mit Makrolid-konjugierten Derivaten und den Carrier-Vorstufen

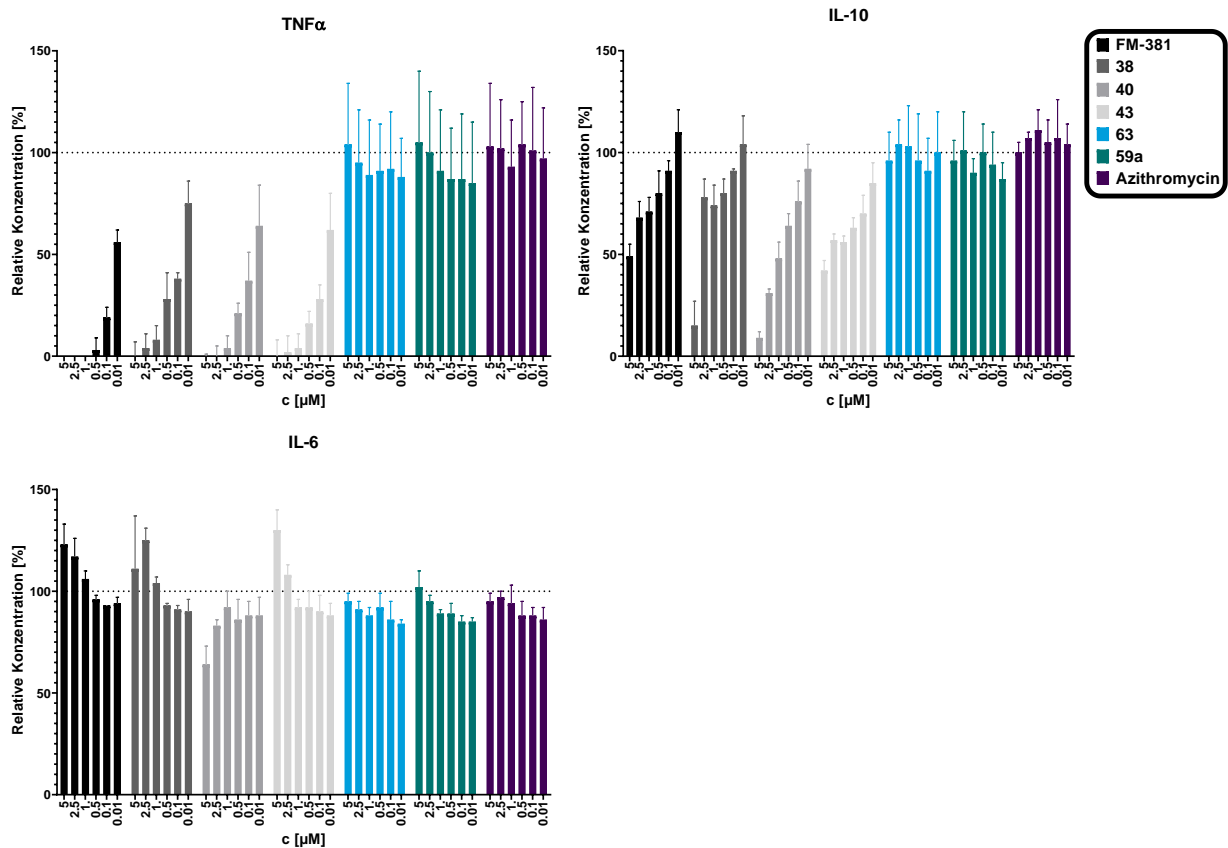


Abbildung 4.12: Nach Behandlung von HBC-Zellen mit LPS sowie JAK3-Inhibitoren oder deren makrolidbasierten Vorstufen (**59a**, **63**) bzw. Azithromycin gemessene Konzentrationen an TNF α (oben links), IL-10 (oben rechts) und IL-6 (unten links). Weder Azithromycin noch **59a** oder **63** hatten in den eingesetzten Konzentrationen (0,01-5 μM) einen nennenswerten Einfluss auf die Produktion von TNF α , IL-6 oder IL-10. $n = 3$.

Aufgrund der für Makrolide wie Azithromycin und dessen Derivate postulierten immunomodulatorischen Effekte (Kapitel **1.8**) wurden die unkonjugierten Testsubstanzen **FM-381** und **40** mit den konjugierten Analoga **37** und **43** sowie den Carrier-Vorstufen **59a**, **63** und Azithromycin verglichen. Ziel war darzulegen, ob der Makrolidkern der Konjugate im LPS-Modell ebenfalls einen Einfluss auf die Zellen bzw. deren Zytokinfreisetzung ausübt, oder ob die Effekte rein auf Hemmung der JAK3 basieren. Wie **Abbildung 4.12** zeigt, waren die genannten Vorstufen bzw. Azithromycin bei den eingesetzten Konzentrationen nahezu inert. Eine schwache Hemmung der IL-6 Freisetzung konnte für niedrige Dosen der Stoffe beobachtet werden, die aber nicht über ca. 10 % hinausging.

4.2.3.5 Vergleich 2'- und 3'-verlinkter Makrolidkonjugate:

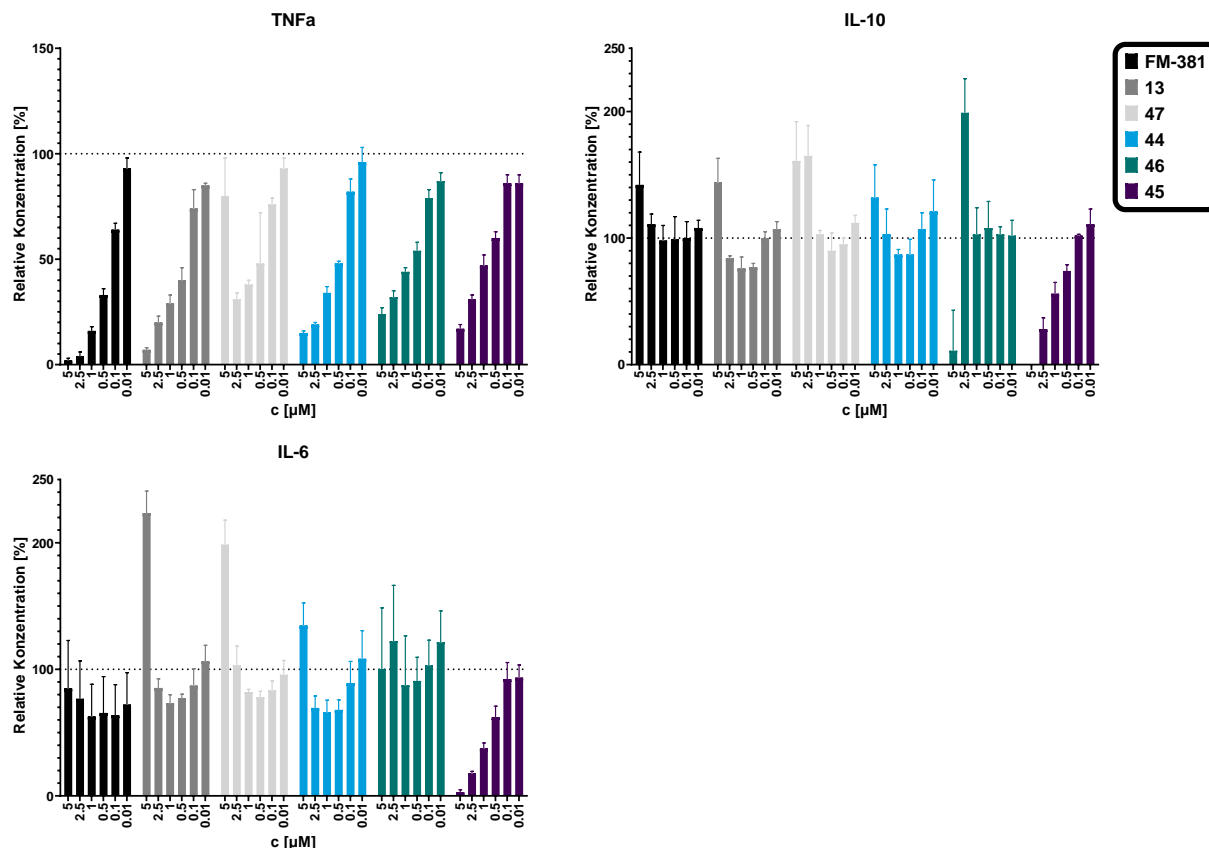


Abbildung 4.13: Nach Behandlung von HBC-Zellen mit JAK3-Inhibitoren und LPS gemessene Konzentrationen an TNF α (oben links), IL-10 (oben rechts) und IL-6 (unten links). Die Makrolid-Konjugate **13** und **44** sind über Position 2' am Desosamin mit den JAK-Warheads verknüpft, die jeweiligen Strukturanaloga **46** und **47** über die 3'-Position. $n = 2$.

Im Zuge der Optimierung des Makrolidcarriers wurden sowohl über die 2'- als auch die 3'-Position des Desosamin-Zuckers verlinkte Konjugate dargestellt. Diese waren sich sowohl in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften als auch in ihrer Potenz im enzymatischen JAK3-Assay (**Tabelle 4.8**, **Tabelle 4.10**) äußerst ähnlich. Die Aktivität sollte nun auch im zellulären Kontext verglichen werden, wo u.a. auch die Aufnahme und (intrazelluläre) Stabilität der Stoffe und eventuelle off-target Effekte eine Rolle spielen. Als Surrogatparameter für die allgemeine antiinflammatorische Wirksamkeit wurde hier TNF α verwendet, da die Herabsetzung dieses Zytokins üblicherweise gut mit der Aktivität der Stoffe im JAK3-Assay einherging. Davon ausgehend zeigten sich die 2'-verknüpften Stoffe (**13**, **44**) als etwas wirksamer als ihre 3'-Gegenstücke (**47**, **46**). Bei beiden Klassen der Konjugate kam es in der höchsten Konzentration (5 μ M) zu einem sprunghaften Anstieg der IL-6 Freisetzung. Wie bereits diskutiert wurde, handelt es sich hier vermutlich primär um Folgen beginnender zytotoxischer Stoffkonzentrationen.

Das Zytokinprofil des ebenfalls im Experiment eingeschlossenen, N-methylpiperidin-substituierten Konjugats **45** unterscheidet sich deutlich von dem der anderen Stoffe: Sowohl die Freisetzung von IL-6 als auch die von IL-10 sanken

konzentrationsabhängig, bis hin zu einem kompletten Ausfall bei 5 μM des Stoffes. Die $\text{TNF}\alpha$ -Senkung war dagegen mit jener der anderen Stoffe vergleichbar. Eine ähnliche, ebenfalls konzentrationsabhängige Senkung der IL-10 Werte wurde auch für die phenyl-substituierte Serie (**30-33**) und zwei Vertreter der Bicyclo[3.1.0]hexyl-Serie (**40, 41**) festgestellt (s. **Anhang, 7.2.4**). Denkbar ist eine Inhibition anderer Kinasen zusätzlich zur JAK3, die Selektivität dieser Stoffe wurde aber bisher nicht näher untersucht.

4.2.3.6 Durchführung in U937-Zellen

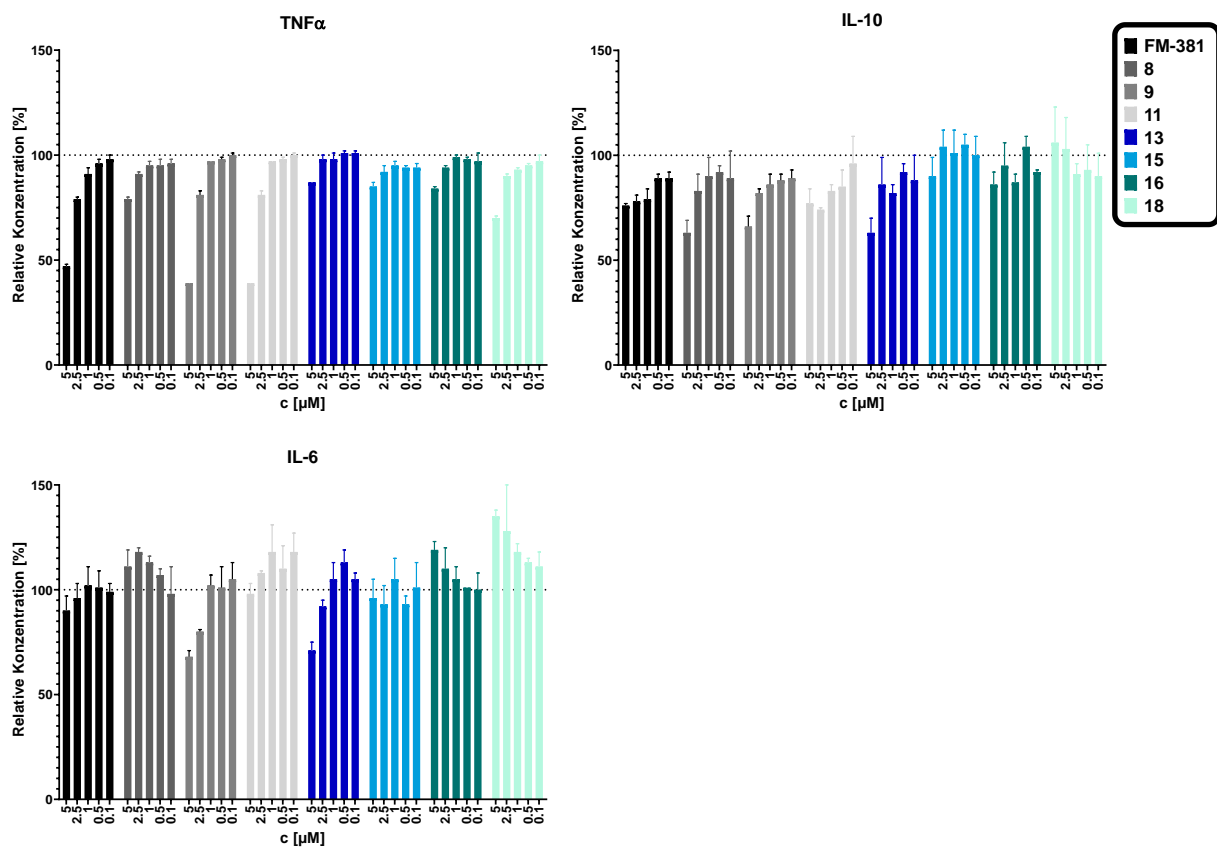


Abbildung 4.14: Nach Behandlung von (Monozyten ähnlichen) U937-Zellen mit JAK3-Inhibitoren und LPS gemessene Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ (oben links), IL-10 (oben rechts) und IL-10 (unten links). Im Vergleich zu HBC waren die Effekte der Stoffe bei identischen eingesetzten Konzentrationen geringer ausgeprägt. $n = 3$.

Abbildung 4.14 zeigt einen aus U937-Zellen erhaltenen Datensatz. Die aus einem Lymphom-Patienten isolierten, immortalisierten U937 Zellen entsprechen in etwa den menschlichen Monozyten. Letztere sind relativ große Fresszellen myeloischen Ursprungs, die je nach Stimulus zu Makrophagen oder dendritischen Zellen ausdifferenzieren können. Tendenziell verhielten sich die Stoffe gleich wie im komplexeren HBC. Die Auswirkungen auf die Zytokinfreisetzung, insbesondere auf $\text{TNF}\alpha$ bezogen, fielen aber geringer aus: So konnte z.B. die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung durch **FM-381** erst bei einer Konzentration von 5 μM auf unter 50 % gesenkt werden,

während dies in HBC üblicherweise schon mit einem Zehntel dieser Dosis erreicht wurde.

4.2.3.7 Durchführung in menschlichem Vollblut

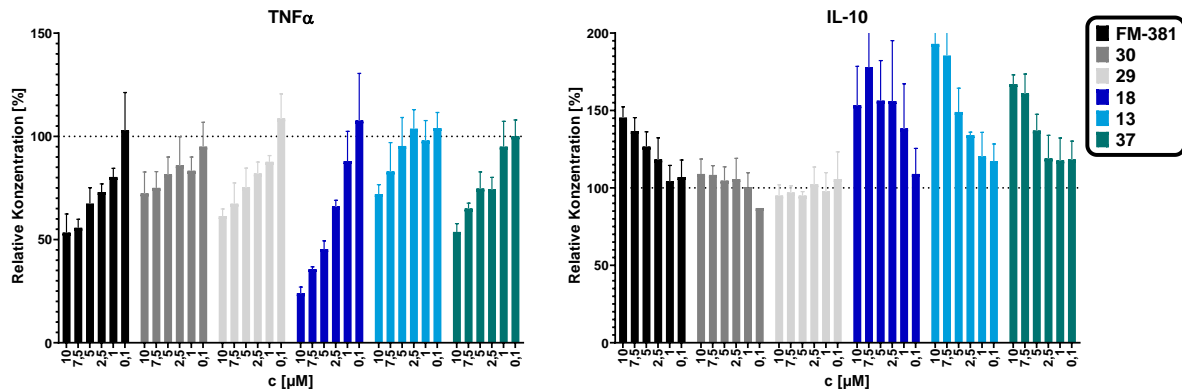


Abbildung 4.15: Nach Behandlung von menschlichem Vollblut mit JAK3-Inhibitoren und LPS gemessene Konzentrationen an TNF α (links) und IL-10 (rechts). Sowohl durch **FM-381**, dessen konjugierte Derivate **13** und **37** als auch durch N-methylpiperidin-Analog **18** wurde die Freisetzung von IL-10 gesteigert. $n = 3$.

Auch in menschlichem Vollblut wurde eine Auswahl an Stoffen getestet, um ein noch realitätsnäheres Medium zu untersuchen. Im Vergleich zum HBC sind nun noch weitere Blutbestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten und ggf. höhere Anteile an Plasmaproteinen enthalten. Von ihnen ist zwar keine direkte Interaktion mit den Substanzen zu erwarten, es kann aber beispielsweise zu unspezifischer Bindung (z.B. an Albumin oder die Oberfläche von Erythrozyten) kommen. Zudem ist die relative Konzentration der Immunzellen im Vollblut deutlich niedriger.

Die TNF α -Senkung war schwächer ausgeprägt als im HBC bzw. erforderte höhere Konzentrationen der Substanzen für den gleichen relativen Effekt. Als Grund lässt sich hier die bereits erwähnte veränderte Zellzusammensetzung bzw. deren Anteile im Medium anführen. Die Freisetzung des antiinflammatorischen IL-10 konnte im Vollblut deutlich durch **FM-381** und vor allem durch dessen Makrolid-Analoga (**13**, **37**) sowie das N-methylpiperidin-substituierte **18** gesteigert werden. Für **29** und **30** wurde dies nicht beobachtet. Beide waren allerdings auch in anderen *in vitro* Experimenten weniger potent; es ist also nicht auszuschließen, dass noch höhere Stoffkonzentrationen ebenfalls Auswirkungen auf die IL-10 Spiegel haben könnten.

Diskussion: Die Literatur liefert diverse Beispiele mit verschiedenen Zelllinien, in denen ebenfalls JAK-Hemmer in ähnlichen Experimenten verwendet und die Zytokinfreisetzung erfasst wurden:

In M2-Makrophagen führt TLR4-Stimulus zur Aktivierung des JAK3/STAT3-Signalwegs. Unter diesen Bedingungen wurden von Quero *et al.* bereits Tofacitinib und **FM-381** verglichen. Der pan-JAK Inhibitor erzielte eine starke Steigerung der IL-6 Freisetzung,

während die IL-10 Spiegel bis zu einer Dosis von 1 μM unbeeinflusst blieben, erst bei $C_{\text{(Tofacitinib)}} = 5 \mu\text{M}$ kam es schließlich zur Abnahme.¹²⁶ Der IL-10 Anstieg durch Tofacitinib im in **Abbildung 4.8** gezeigten Datensatz ist also auf andere Zelltypen zurückzuführen. Auch in Monozyten wurde für Tofacitinib eine erhöhte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ nach LPS-Stimulus dargelegt. Dabei kam es allerdings zu einer Senkung statt Steigerung der IL-10 Konzentrationen, was ggf. über die recht hohe eingesetzte Dosis (10 μM) zu erklären ist.¹²⁷

Die Blockade von JAK1 unterbindet die Signalfunktion von IL-10, da u.a. JAK1 an den IL-10 Rezeptor assoziieren muss, damit das Signal ins Zellinnere weitergegeben werden kann.^{125,128} Dies erklärt die deutlich verstärkte Ausschüttung von IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ in den mit JAK1-Hemmern behandelten Zellen. Ihr antiinflammatorisch wirksamer Gegenspieler IL-10 wird zwar freigesetzt, kann aber keine hemmende Wirkung mehr auf die Produktion der beiden Zytokine ausüben. Die ebenfalls erhöhte Freisetzung von IL-10 selbst lässt sich dadurch erklären, dass ohne Transkription des IL-10 Signals auch keine Autoinhibition bzw. negative Feedback-Mechanismen stattfinden und die Zellen vermehrt IL-10 nachbilden.

Bei den von Quero *et al.* mit 1 μM **FM-381** behandelten M2-Makrophagen kam es zu einer leicht gesteigerten IL-6 Freisetzung und einer zeitgleichen Senkung von IL-10. In (eher proinflammatorisch agierenden) M1-Makrophagen erzeugten sowohl Tofacitinib als auch **FM-381** dagegen eine dosisabhängig verringerte Ausschüttung von IL-6.¹²⁶

Im komplexeren, aus verschiedenen Typen von Immunzellen zusammengesetzten HBC unterschieden sich die Befunde von denen der genannten Makrophagen-Experimente: In den meisten Fällen (s.o. sowie **Anhang, 7.2.4**) hatte die Behandlung mit den dargestellten JAK3-Inhibitoren nur geringe Effekte auf die IL-6 bzw. IL-10 Freisetzung; gelegentlich kam es zu einer leichten Senkung oder Steigerung. Die Schwankungen lassen sich wahrscheinlich auf die erwähnte spenderbedingt unterschiedliche Zusammensetzung des HBC zurückführen.

Die teils beobachtete Steigerung von IL-10 durch die JAK3-Hemmer (bei höheren Konzentrationen) lässt sich ggf. auf deren Wirkung auf dendritische Zellen rückführen: Für $\text{JAK3}^{-/-}$ dendritische Zellen wurde eine gegenüber Wildtyp deutlich erhöhte IL-10 Produktion – sowohl nach inflammatorischem Stimulus, als auch konstitutiv – festgestellt.¹²⁹ Eine starke Hemmung der JAK3 durch die Testsubstanzen könnte davon ausgehend auch im weniger homogenen HBC direkt zur IL-10 Steigerung führen. Der Anteil dendritischer Zellen im menschlichen Blut ist aber vergleichsweise gering.¹³⁰

Zusammengefasst führte der Einsatz selektiver JAK3-Inhibitoren im *in vitro* LPS Experiment zu einem hervorragenden antiinflammatorischen Profil aus gesenkter $\text{TNF}\alpha$ - sowie weitestgehend intakter oder gar gesteigerter IL-10 Freisetzung. Dieses äußerst günstige Verhältnis ließ sich später auch *in vivo* (Kapitel **4.3.2**) erzeugen.

4.2.4 Toxizitäts-Assays

Vor der Durchführung von *in vivo* Studien wurden die Testsubstanzen *in vitro* auf eventuelle Toxizität geprüft. Prinzipiell kamen dabei zwei Assays zum Einsatz, der MTT-Assay und das 7-Aminoactinomycin(7AAD)-basierte Live/Dead Staining.

MTT-Assay: Der MTT-Assay unterscheidet Zellen nicht anhand der Kriterien „lebend/tot“, sondern anhand ihrer Stoffwechselaktivität. Man nutzt den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid („MTT“), der durch mitochondriale Oxidoreduktasen unter Verbrauch von NADH zum blauen Formazanderivat reduziert wird. Die Viabilität der Zellen wird also in Abhängigkeit von der Zellatmung erfasst. Verwendet wurden U937 Zellen, eine den Monozyten ähnliche immortalisierte Linie, oder die ähnlichen J774 Zellen. Gezeigt werden nur einige repräsentative Datensets, weitere sind den **Anhängen (7.2.3)** zu entnehmen:

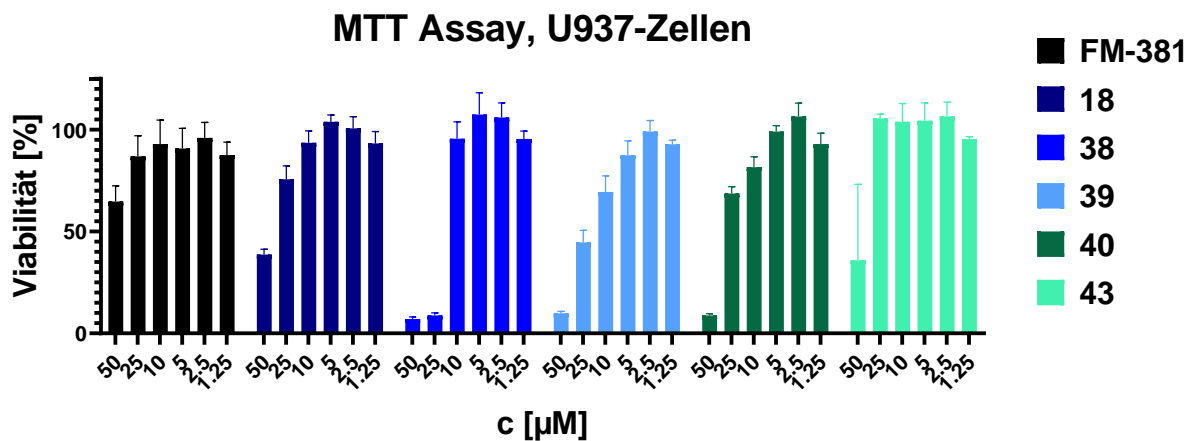


Abbildung 4.16: Durch Färbung mit MTT erfasste Viabilität von U937-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen. Die Spitzenkonzentrationen von 25-50 µM führten i.A. zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität. $n = 3$.

Grundsätzlich waren die meisten der dargestellten Testverbindungen in den für *in vitro* Experimente relevanten Konzentrationen (i. d. R. bis 10 µM) untoxisch und führten im MTT-Assay zu keiner nennenswert reduzierten Zellviabilität. Erst in höheren Konzentrationen (≥ 25 µM) kam es zu toxischen Effekten (**Abbildung 4.16**). Wie bereits erwähnt wurde in diesem Assay aber nicht direkt nach lebenden und toten Zellen unterschieden, sondern primär der mitochondriale Stoffwechsel erfasst. Ein nicht auszuschließender weiterer Grund für zytotoxische Effekte der Substanzen könnte auch die oft suboptimale Löslichkeit sein: Eine starke Anreicherung einer Verbindung in bestimmten Kompartimenten könnte zum Ausfallen des Stoffes führen, was wiederum Zellorganellen oder essentielle Membranen schädigen würde.

Auch in J774 Zellen (**Abbildung 4.17**) wurde die überwiegende Mehrzahl der Testsubstanzen gut toleriert:

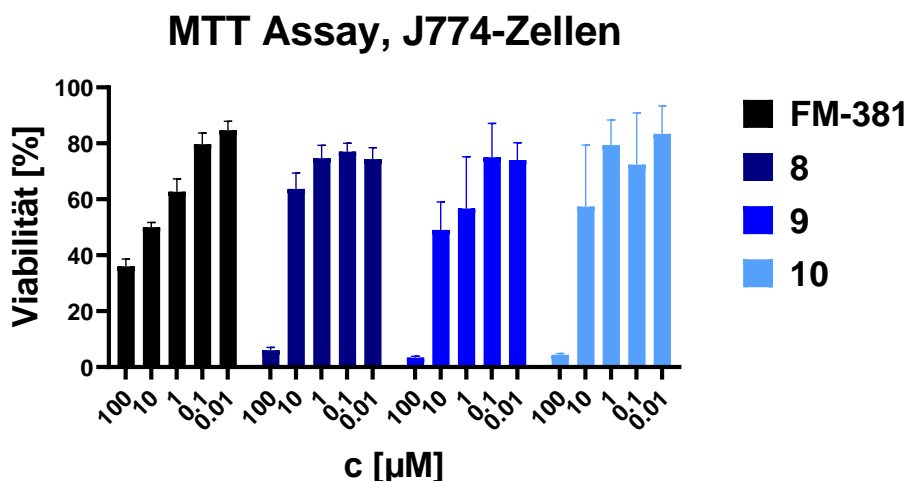


Abbildung 4.17: Durch Färbung mit MTT erfasste Viabilität von J774-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen. Wie schon in U937-Zellen beschrieben kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Viabilität. $n = 3$.

Im Gegensatz zu den humanen U937 Zellen sind J774 Zellen murinen Ursprungs. Sie entsprechen außerdem eher den (üblicherweise in Geweben vorkommenden) Makrophagen als (im Blut zirkulierenden) Monozyten. Die gute Verträglichkeit der Testverbindungen auch in murinen Zellen war eine grundlegende Voraussetzung für die späteren *in vivo* Studien in Mäusen.

Im Zuge der MTT-Screenings wurde für die beiden Makrolidkonjugate **37** und **42** Toxizität bei unerwartet niedrigen Konzentrationen festgestellt. Dies war bisher bei anderen, strukturell ähnlichen Konjugaten nicht beobachtet worden. Um sicherzustellen, dass es sich um stoffspezifische Toxizität handelt, wurde ein weiterer Batch von **37** synthetisiert. Dieser wurde mit dem anderen Batch sowie der Vorstufe **60b** verglichen, um Batch-spezifische bzw. aus vorigen Reaktionen mitgeschleppte toxische Verunreinigungen auszuschließen (**Abbildung 4.18**).

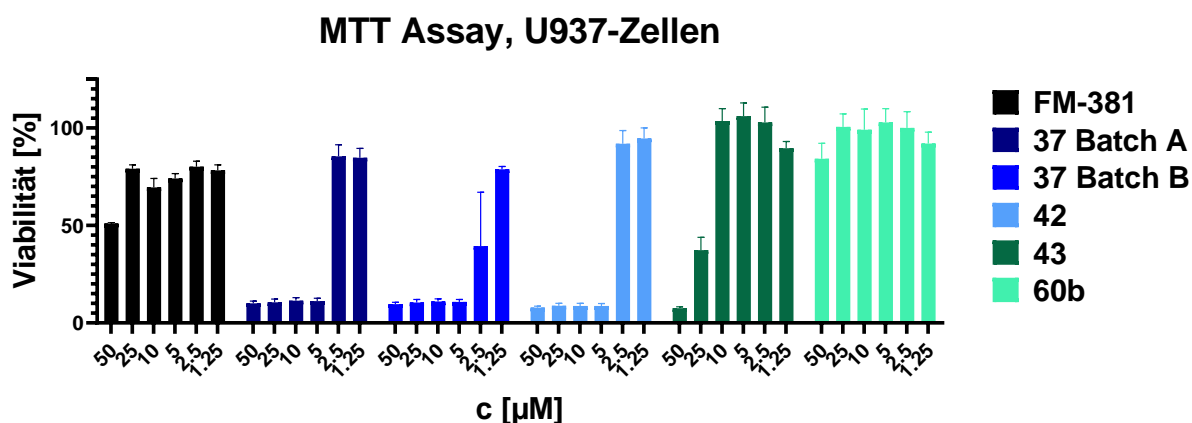


Abbildung 4.18: Durch Färbung mit MTT erfasste Viabilität von U937-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen. $n = 3$. Von **37** wurden zwei separat synthetisierte Batches („A“ bzw. „B“) verglichen. Um toxische Effekte aufgrund von mitgeschleppten Verunreinigungen der Vorstufe auszuschließen, wurde **60b** ebenfalls in den Versuch eingeschlossen. Beide Batches von **37** zeigten ähnliche Zytotoxizität ab einer Wirkstoffkonzentration von 5 µM. Die Vorstufe **60b** erwies sich dagegen selbst bei 50 µM als untoxisch.

Beide Batches sowie das über den gleichen Linker verbundene **42** zeigten schon bei 5 μM einen starken Abfall der Viabilität, die gemeinsame Vorstufe war dagegen auch in der höchsten Konzentration noch relativ untoxisch. Der Grund für die im MTT-Assay beobachtete Toxizität ist nicht bekannt. Sie ist auch im Hinblick auf die Strukturen der betroffenen Substanzen schwer erklärbar, da verwandte Stoffe erst bei deutlich höheren Konzentrationen Toxizität aufwiesen. Eine off-target Wirkung kann nicht ausgeschlossen werden, müsste aber spezifisch für Konjugate mit gleicher Linkerlänge vorliegen. Dagegen spricht, dass **39** in einem weiteren Assay erst bei 25 μM nennenswert toxisch war.

Live/Dead Staining: Bei diesem Verfahren wird durch Einsatz von 7AAD zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden. Der Farbstoff ist ein DNA-Interkalator und kann nur bei toten Zellen die Zellmembran durchdringen. Diese lassen sich dann anhand der Intensität des Fluoreszenz-Signals quantifizieren. Für das Live/Dead Staining wurden menschlicher Buffy Coat oder THP1-Zellen verwendet. Letztere entstammen einer Monozyten-Population, die einem Leukämiepatienten entnommen wurde. Auch im Folgenden werden nur einige Beispiele aus den erhobenen Datensätzen gezeigt.

Die Substanzen wurden für diesen Assay in eher niedrigen Konzentrationen getestet, in denen sie alle gut toleriert wurden. Auch der unselektive JAK-Hemmer Tofacitinib wurde miteinbezogen und zeigte ebenfalls keine bedenkliche Toxizität (**Abbildung 4.19**).

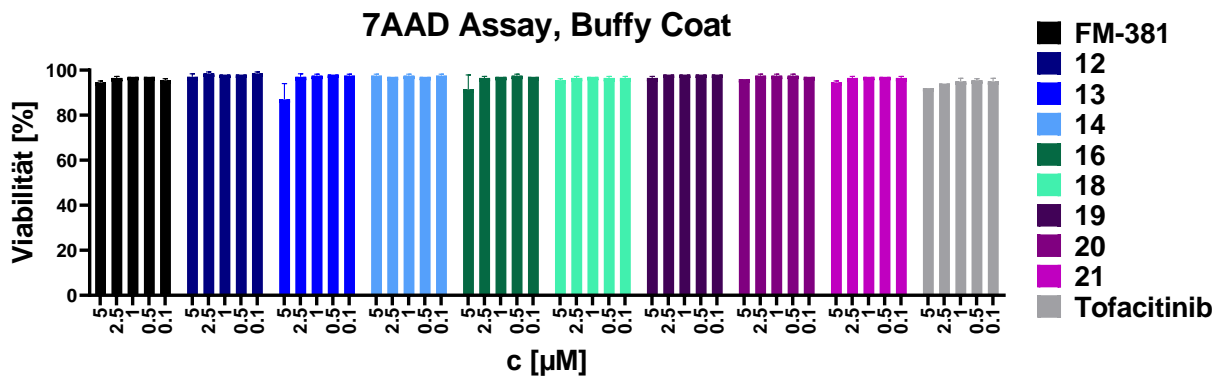


Abbildung 4.19: Durch Färbung mit 7AAD erfasste Viabilität einer gemischten Leukozytenpopulation (HBC) in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen. Weder die JAK3-Hemmer noch Tofacitinib zeigten im Bereich von 0.1-5 μM toxische Effekte. $n = 2$.

Die meisten 7AAD-basierten Assays wurden nicht als reine Toxizitäts-Experimente durchgeführt, sondern im Zusammenhang mit den routinemäßig durchgeführten „LPS challenge“ ELISAs (**4.2.3**). Dementsprechend wurden auch die gleichen dort verwendeten Stimuli (i. d. R. LPS) zugegeben. Ziel war zu zeigen, dass die im ELISA beobachteten Effekte (v.a. reduzierte $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung) durch die JAK-Hemmung zustande kamen und nicht etwa durch cytotoxische Nebeneffekte. Dementsprechend

wurden auch die gleichen Konzentrationen (i. d. R. bis 5 μM) wie im ELISA-Verfahren angewandt.

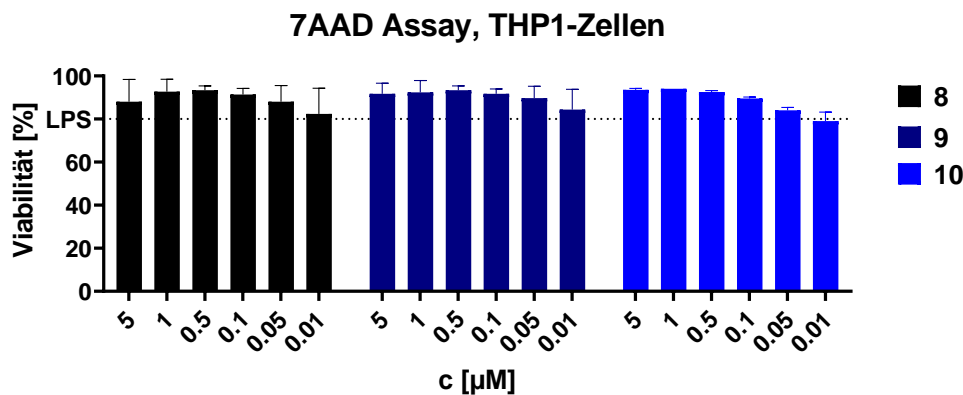


Abbildung 4.20: Durch Färbung mit 7AAD erfasste Viabilität von THP1-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen. Da es sich um einen Kontroll-Assay für ein LPS-basiertes Experiment handelte, wurden die Zellen hier ebenfalls mit LPS behandelt. Die Viabilität der Zellen wurde durch die JAK3-Hemmer **8-10** sogar über den Kontrollwert gesteigert. Dies spricht für eine Schutzwirkung gegenüber der durch LPS ausgelösten Schädigung der Zellen. $n = 3$.

Interessanterweise zeigten die Testsubstanzen bei solchen Assays sogar einen gewissen protektiven Effekt: Die Viabilität war für die meisten Stoffe und Konzentrationen erhöht gegenüber THP1-Zellen, die ausschließlich mit LPS behandelt worden waren (**Abbildung 4.20**). Angesichts des antiinflammatorischen Effekts der JAK3-Inhibitoren war dies zu erwarten und passt zu den Befunden aus den LPS-ELISAs, bei denen eine potente, konzentrationsabhängige $\text{TNF}\alpha$ -Senkung festgestellt wurde. Dies wiederum sorgt für eine Reduktion der Zellschädigung durch proinflammatorische Signalkaskaden bzw. Apoptose.

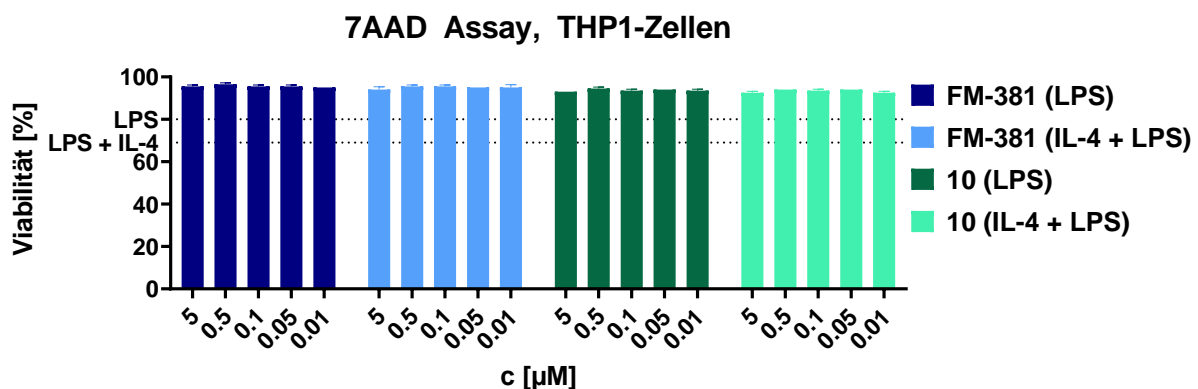


Abbildung 4.21: Durch Färbung mit 7AAD erfasste Viabilität von THP1-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen. Da es sich um einen Kontroll-Assay für ein LPS-basiertes Experiment handelte, wurden die Zellen hier ebenfalls mit LPS sowie LPS + IL-4 behandelt. Die durch LPS bzw. LPS + IL-4 verursachte Zytotoxizität konnte durch die JAK3-Hemmer **FM-381** und **10** schon ab einer Konzentration von 0,01 μM verhindert werden. $n = 2$.

In einem weiteren Assay wurde zusätzlich zu LPS auch mit IL-4 stimuliert (**Abbildung 4.21**). Durch die Kombination kam es in den ansonsten unbehandelten Proben zu einer weiteren Abnahme der intakten Zellen (auf ca. 69 %). Durch Einsatz der Testsubstanzen konnte die Viabilität jedoch in beiden Gruppen (nur LPS bzw. LPS + IL-4) auf ähnlich hohem Niveau gehalten werden. Der IL-4 Rezeptor leitet sein Signal über JAK1/JAK3-Heterodimere weiter, die Testsubstanzen konnten der IL-4 abhängigen Toxizität dementsprechend direkt entgegenwirken.

4.2.5 Fluoreszenzverhalten, Zellaufnahme-Experimente

Die Konjugation der JAK3-Inhibitoren an Makrolidcarrier diente nicht nur der Optimierung der generellen PK-Eigenschaften, sondern auch einer verstärkten Aufnahme in Leukozyten bzw. deren sauren Kompartimenten. Lysosomen sind Organellen, die u.a. zum Verdau von Makromolekülen und auch Pathogenen benötigt werden. Sie kommen in einer Vielzahl an Zellen vor, insbesondere aber in Immunzellen. Innerhalb der mit Membranen versehenen Lysosomen liegt ein saures Milieu vor (pH 4-5), das durch ATP-abhängige Protonenpumpen aufrechterhalten wird. Die lysosomalen Enzyme sind nur unter diesen sauren Bedingungen optimal aktiv; dies dient vermutlich zum Schutz der Zelle im Falle einer Membranschädigung.^{131,132} Von Azithromycin ist bereits bekannt, dass es sich rasch und in hohem Ausmaß in Immunzellen ansammelt, wobei ca. 70 % der gemessenen Stoffmenge im lysosomalen Kompartiment vorliegt.¹³³ Verantwortlich hierfür sind die beiden tertiären Amine, deren pK_a -Werte bei 8,1 bzw. 8,8 liegen:¹³⁴ Innerhalb der sauren Lysosomen liegt Azithromycin fast ausschließlich in protonierter Form vor und kann somit nicht mehr die lysosomale Membran passieren. Die Folge ist eine starke Anreicherung in Konzentrationen, die um ein Vielfaches über den cytosolischen und v.a. denen im Extrazellulärraum liegen (**Abbildung 4.22**).

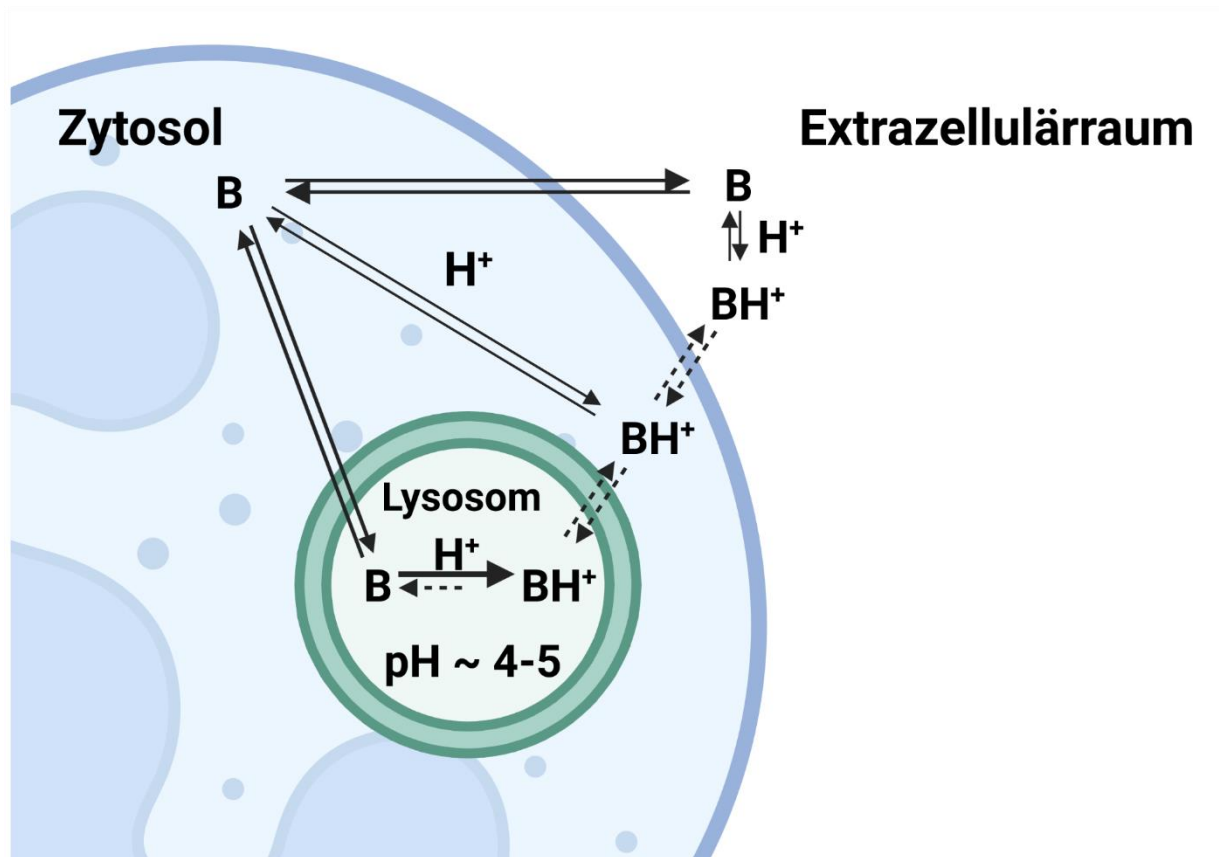


Abbildung 4.22: Schematische Darstellung des "base trapping" Mechanismus, durch den sich basische Substanzen („B“) in hohen Konzentrationen innerhalb saurer Kompartimente, z.B. den Lysosomen, anreichern. Geht ein ausreichend basischer Wirkstoff in das lysosomale Kompartiment über, wird er dort aufgrund des erniedrigten pH-Werts (ca. 4-5) protoniert („BH⁺“). Die Membranpassage ist für geladene Moleküle deutlich erschwert, wodurch es zu einer Anreicherung der Substanz im Lysosom kommt.

Die langsame Rückverteilung des Stoffes aus den Lysosomen ins Zytosol und von dort in die Peripherie ist einer der Gründe für die lange Verweildauer im Körper, selbst nach nur einmaliger Verabreichung.¹³³ Denkbar ist, dass dieser Verteilungsmechanismus auch genutzt werden kann um gezielt „leukotrope“ Wirkstoffe an Entzündungsherden zum Einsatz zu bringen: So wurde bereits gezeigt, dass Azithromycin sich in größerem Maße in infiziertes Gewebe verteilt, indem es zunächst von Phagozyten aufgenommen wird, die dann zum Ort des Infekts wandern und den Stoff dort wieder freigeben. Bei weniger basischen Makroliden, z.B. Clarithromycin, ist der Effekt nicht (oder nur vermindert) zu beobachten. Da auch bei nicht-infektbedingten Entzündungen hohe Konzentrationen an Leukozyten vorzufinden sind, kann dort ebenfalls mit einer bevorzugten Anreicherung der Azalide gerechnet werden.^{135,136} Eine solche Anreicherung ist auch für die hergestellten Konjugate denkbar, da ihr basisches Makrolid-Gerüst einen starken Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften und das PK-Profil ausübt. Die Aufnahme der Testverbindungen in Immunzellen wurde *in vitro* auf zwei Arten untersucht. Zum einen wurde die intrinsische Fluoreszenz der Substanzen ausgenutzt, um diese qualitativ per Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Zum anderen wurde die Anreicherung in Zellpellets per HPLC-MS quantifiziert.

Fluoreszenzmikroskopie: Die auf **FM-381** basierenden JAK3-Hemmer verfügen alle über ein ausgeprägtes π -Elektronensystem, was sich auch an ihrer intensiven Farbe zeigt. Ihr Absorptions- und Emissionsverhalten im UV/VIS-Bereich erwies sich als geeignet für die Detektion per Fluoreszenzmikroskopie, die Lage der Absorptionsmaxima ist für einige Beispiele in **Abbildung 4.23** gezeigt.

Absorptionsspektren ausgewählter Testsubstanzen

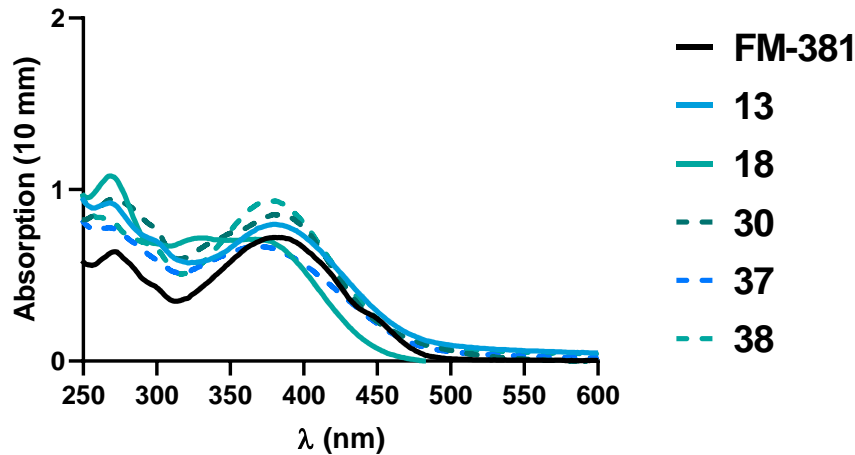


Abbildung 4.23: Absorptionsspektren von **FM-381** und einer Reihe von Derivaten bei pH 7,4 ($c = 50 \mu\text{M}$ in PBS + 0,5 % DMSO). Typisch für die Substanzklasse, inklusive der Konjugate, sind Absorptionsmaxima im Bereich von ca. 370-380 nm mit verhältnismäßig breiten Peaks.

Zwar ist die Absorption der Testsubstanzen im Bereich des blauen Lichts am intensivsten, allerdings sind sie durch die relativ breiten Banden noch immer gut geeignet für die Detektion im Green Fluorescent Protein (GFP) Filterbereich (ca. 460 ± 50 nm). Dies ermöglicht die Nutzung des blauen Filterbereichs für DNA-Farbstoffe wie DAPI. Da diese sowohl wesentlich intensiver fluoreszieren als auch im Zellkern gebündelt vorliegen, ist auch nicht mit Problemen durch die blaue Fluoreszenz der Testsubstanzen zu rechnen.

Neben pH 7,4 wurden auch Absorptionsspektren bei ungefähr lysosomalem pH (5) aufgenommen um sicherzustellen, dass die Substanzen auch nach der Verteilung in saure Kompartimente gut detektierbar sind. Es wurden für die meisten Substanzen keine bzw. geringfügige Unterschiede in Lage bzw. Intensität der Spektren festgestellt (s. **Anhang, 7.2.2**). Dementsprechend wurden sie als für die geplanten Experimente geeignet eingestuft.

Die Emissionsspektren wiesen üblicherweise recht breite Peaks mit Maxima zwischen 500 und 600 nm auf. Durch Detektion der Substanzen im GFP-Filter wird die gleichzeitige Beleuchtung im blauen und roten Filterbereich ermöglicht, wodurch auch Zellkerne (blau, Färbung durch Höchst-Farbstoff) und Lysosomen (rot, Färbung durch Cell Navigator Lysosomal Staining Kit) angefärbt werden können.

Da es sich bei den Testverbindungen nicht um „optimierte“, intensive Fluorophore handelt, wurde als Positivkontrolle das Fluorophor-Makrolidkonjugat **76 (Kapitel 3.6)** synthetisiert und mit dem unkonjugierten Äquivalent, Cumarin 343, verglichen.

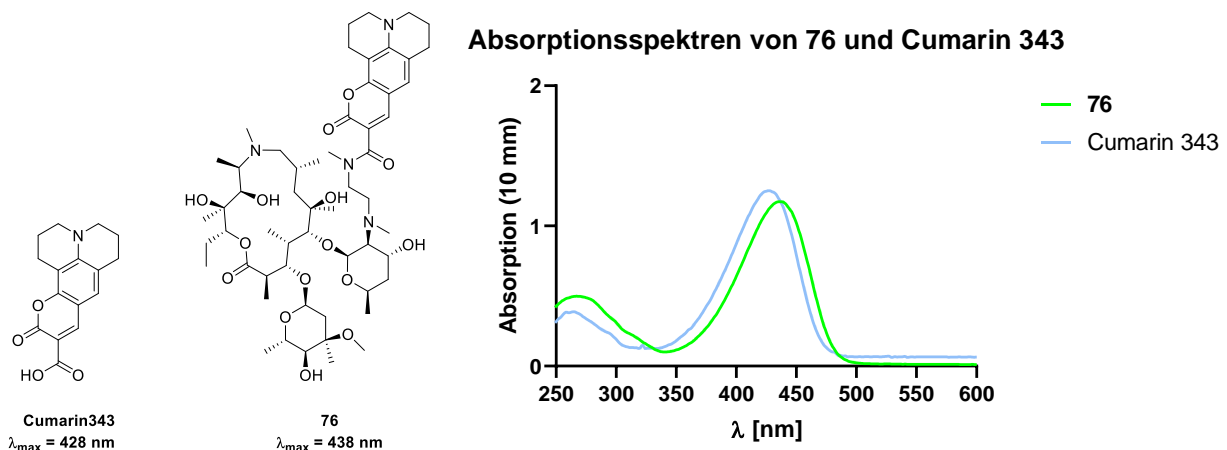


Abbildung 4.24: Strukturen und Absorptionsspektren von Cumarin343 und dem darauf basierenden Makrolid-Konjugat **76** bei $\text{pH} = 7,4$ ($c = 10 \mu\text{M}$ in $\text{PBS} + 0,5 \%$ DMSO). Lage und Intensität der Absorptionsmaxima wurden durch die Konjugation nur geringfügig beeinflusst.

Beide Stoffe weisen ein nahezu identisches Absorptionsprofil auf (**Abbildung 4.24**), allerdings liegt der freie Cumarinfarbstoff bei physiologischem pH überwiegend ionisch vor und reichert sich daher deutlich weniger in Zellen an. Der Unterschied wird deutlich, wenn beide Stoffe in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ mit suspendierten Immunzellen inkubiert werden (**Abbildung 4.25**): Nur das Konjugat akkumuliert in ausreichender Konzentration innerhalb der Zellen, um – bei gleicher Belichtungszeit – sichtbar zu fluoreszieren.

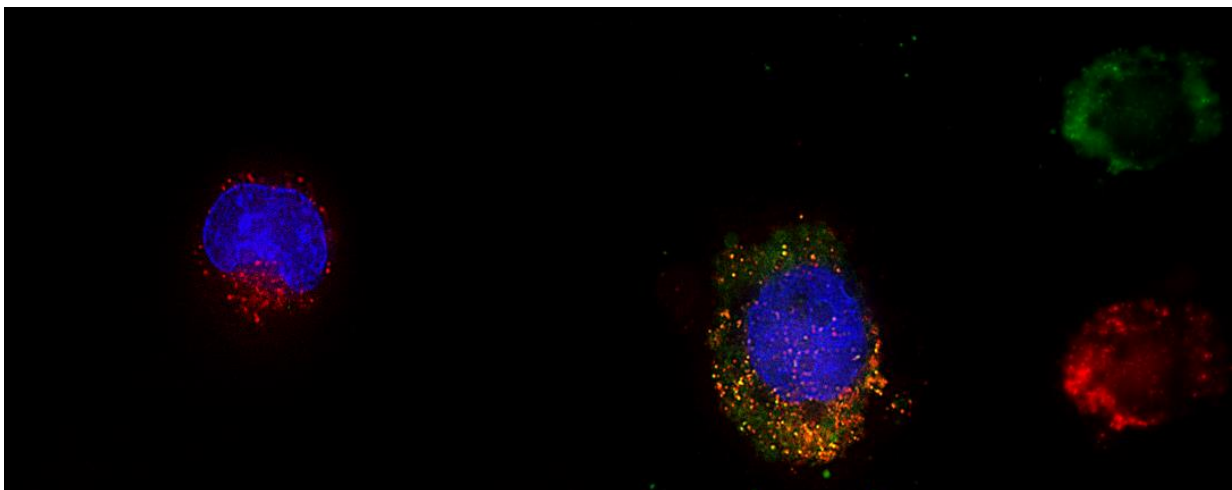


Abbildung 4.25: Mit Cumarin 343 (links) oder **76** (mittig) inkubierte U973 Zellen ($c = 10 \mu\text{M}$). Nur das Konjugat **76** reichert sich in ausreichender Konzentration innerhalb der Zelle an, um im GFP-Filter (grün) sichtbar zu werden. Zellkerne (blau) und Lysosomen (rot) sind ebenfalls angefärbt. Mit großen Konzentrationen an **76** angereicherte Lysosomen erscheinen durch Überlappung der Signale gelb. Rechts: Aufnahme einer mit **76** inkubierten U937 Zelle in zwei verschiedenen Kanälen, um entweder die Testsubstanz (grün) oder den Lysosomen-Farbstoff (rot) darzustellen.

Wie erwartet wurde **76** dabei nicht nur im Zytosol vorgefunden, sondern auch verstärkt in den Lysosomen, was durch Überlagerung des Signals mit dem des Lysosomen-Farbstoffes deutlich wurde.

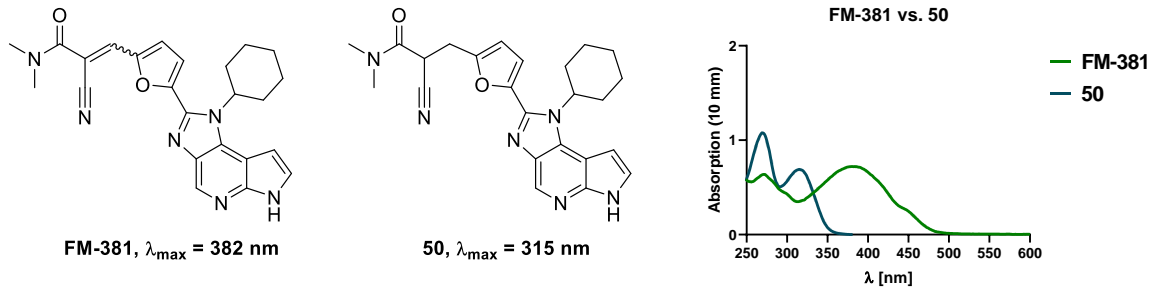


Abbildung 4.26: Die Reduktion des Michael-Akzeptors von **FM-381** zu **50** führt zu einer Verkürzung des delokalisierten Elektronensystems und damit zur hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um etwa 70 nm. Ähnlich verhielt es sich für die Paare **9/51** und **10/52** (s. **Anhang, 7.2.2**). $c = 50 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 7,4$.

Als Negativkontrolle wurden die reduzierten Analoga der JAK3-Warheads eingesetzt: Durch das Fehlen der Michael-Akzeptor Doppelbindung ist das π -System verkürzt und die Absorptions/Emissionsmaxima sind zu kürzeren Wellenlängen verschoben (**Abbildung 4.26**), wodurch keine Detektion im GFP-Filter mehr möglich ist. Durch die ansonsten gleiche Struktur der reduzierten Testsubstanzen sollte ein nahezu identisches Verteilungsmuster zu erwarten sein.

Eine Auswahl an Testsubstanzen wurde dann sowohl mit einzelnen Zelllinien wie U937 (Monozyten), HMC3 (Gliazellen) als auch mit komplexeren Systemen wie HBC und menschlichem Vollblut inkubiert. **Abbildung 4.27** zeigt als Beispiel die Aufnahme vier verschiedener Verbindungen in U937 Zellen:

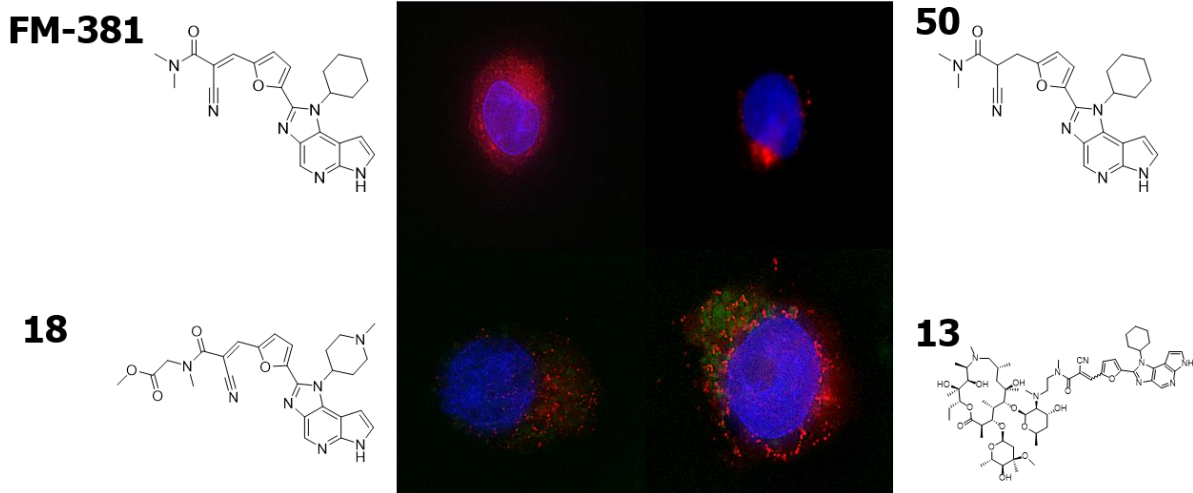


Abbildung 4.27: Vergleich der Aufnahmen von **FM-381** und den Derivaten **50**, **18** und **13** in U937 Zellen ($c = 10 \mu\text{M}$). Nur die über zusätzliche basische Gruppierungen verfügenden Substanzen (**18** und **13**) reichern sich ausreichend intrazellulär an, um sichtbar grün zu fluoreszieren.

Wie zu erwarten war, trugen die über zwei basische Aminogruppen verfügenden Makrolidcarrier dazu bei, die Anreicherung in Immunzellen deutlich zu steigern. Dies wurde gleichermaßen für das designierte Fluorophor **76** als auch für die konjugierten JAK3-Hemmer festgestellt. Erklären lässt sich dies durch das Phänomen des „ion trapping“, bei dem eine (ungeladene, basische) Substanz nach Passage in ein saures Kompartiment protoniert wird. In kationischer Form ist die Rückverteilung durch die das Kompartiment umfassende umschließende Membran deutlich erschwert, wodurch es zur starken Ansammlung der Substanz kommt. Auch unter den getesteten unkonjugierten Substanzen wurde eine Substanz in hohem Maße intrazellulär vorgefunden, das N-methylpiperidin-substituierte **18**. Freies N-methylpiperidin hat einen pK_a von ca. 10,¹³⁷ ein ähnlicher Wert kann für die Seitenkette angenommen werden. Nimmt man einen lysosomalen pH von 4,5 an, so wäre das Verhältnis an kationischem zu neutralem **18** im Bereich ca. 10^6 zu 1, was die verbesserte Aufnahme gegenüber anderen, weniger basischen Testsubstanzen erklärt.

Bei den anderen unkonjugierten Substanzen wurde nur selten bis nie eine für sichtbare Fluoreszenz ausreichende Akkumulation in den Zellen beobachtet. Der trizyklische Kern der getesteten JAK3-Hemmer ist selbst basisch, es wurden aber keine Säure- bzw. Basenkonstanten experimentell bestimmt. Der pK_a der konjugierten Säure von 7-Azaindol wird in der Literatur mit 4.59 angegeben,^{138,139} das Indolderivat ist also deutlich schwächer basisch als Azithromycin und dessen Folgeprodukte. Das mit dem Kern der Testsubstanzen konjugierte Cyanoacrylamid sorgt für einen zusätzlichen Elektronenentzug, was die Basizität weiter vermindert. In Kombination mit den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen ist demnach nicht von einer starken intrazellulären bzw. intralysosomalen Anreicherung der meisten unkonjugierten JAK-Hemmer auszugehen.

Neben der Mikroskopie von Zellen wurden auch *in vivo* Proben auf die Ansammlung fluoreszierender Testverbindungen in bestimmten Zellen bzw. Geweben analysiert, siehe dazu **4.3.1**.

Quantifizierung per LC-MS: Um deren Aufnahme in Immunzellen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ zu demonstrieren wurden die Testsubstanzen in Leukozytenreichem HBC bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Konzentrationen in den zentrifugierten Zellpellets per LC-MS bestimmt und das Verhältnis von im Pellet vorliegenden Substanzen zu jenen im Überstand erfasst.¹⁴⁰ Die Konzentrationsverhältnisse sind in **Tabelle 4.14** aufgelistet:

Tabelle 4.14: Aufnahme der Testverbindungen in menschliche Buffy Coat Zellen.

No.	C _{Pellet} [μM]	C _{Medium} [μM]	Verhältnis ^a
FM-381	5,0 \pm 2,0	0,8 \pm 0,2	4,3 \pm 1
13	36 \pm 12	0,5 \pm 0,4	114 \pm 54
18	4,0 \pm 2,5	0,6 \pm 0,1	7,1 \pm 1
29	2,0 \pm 0,8	0,6 \pm 0,2	4,0 \pm 1
30	2,6 \pm 0,7	0,5 \pm 0,1	5,0 \pm 2
38	20 \pm 3,7	0,7 \pm 0,4	23,0 \pm 1
37	20 \pm 3,3	0,6 \pm 0,2	44 \pm 4
39	12 \pm 3,1	0,7 \pm 0,0	13 \pm 2
42	18 \pm 1,1	0,4 \pm 0,0	42 \pm 11
43	9,8 \pm 1,0	0,9 \pm 0,1	11 \pm 2
50	3,5 \pm 1,8	0,6 \pm 0,2	5,2 \pm 2
76	8,7 \pm 1,0	0,6 \pm 0,1	17 \pm 1
Cumarin 343	1,5 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1	3,6 \pm 0

Buffy Coat von menschlichen Spendern wurde für 2 h bei 37 °C mit den Testsubstanzen auf einem Heizschüttler inkubiert ($c = 1 \mu\text{M}$). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanzen in Überstand bzw. Zellpellet per LC-MS quantifiziert ($n = 2$). ^aDie angegebenen Verhältnisse wurden aus den jeweiligen Pellet- zu Überstand-Verhältnissen der einzelnen Replikate berechnet.

Passend zu den qualitativen Beobachtungen aus den Mikroskopie-Versuchen wurden die Makrolide (**13**, **37-39**, **42**, **43** und **76**) in deutlich höheren Konzentrationen in den Zell-Pellets vorgefunden als im (zellfreien) Überstand. Besonders deutlich wird die Steigerung der Aufnahme, wenn man **FM-381** mit seinen konjugierten Derivaten **13**, **37** und **38** vergleicht; **13** war etwa dreißigfach höher in den Zellen konzentriert als **FM-381**. Unter den unkonjugierten Stoffen reicherte sich wie zu erwarten **18** am stärksten in den Zellpellets an. Die Konzentrationen waren aber sowohl in den Pellets als auch im Überstand vergleichsweise niedrig, da die Substanz wenig stabil ist. Allgemein ist bei der Interpretation der Ergebnisse anzumerken, dass nur intakte, unveränderte Moleküle per MS erfasst wurden. Im Falle der Umwandlung von Stoffen (z.B. durch intrazelluläre Enzyme) würden die gemessenen Konzentrationen vor allem im Zellpellet niedriger liegen, als man es erwarten würde.

4.2.6 Metabolische Stabilität

Neben den *in vivo* PK-Studien wurde die metabolische Stabilität einiger Testsubstanzen auch *in vitro* in murinen Lebermikrosomen untersucht. Auch wenn das System der Realität weniger getreu wird als eine Studie am lebenden Tier, bietet es dafür die Möglichkeit die Stabilität unabhängig von Verteilungs- bzw. Ausscheidungsprozessen zu betrachten.

Tabelle 4.15: Stabilität ausgewählter Testsubstanzen in murinen Lebermikrosomen.

No.	Verblieben nach 2 h ^a [%]	t _{1/2} [min]
FM-381	79 ± 9	142
18	4 ± 0	26
29	54 ± 1	133
30	44 ± 5	103

^aProzentsatz an nach 2 h Inkubation bei 37 °C noch verbliebenem Stoff in Relation zu t₀. Aliquote wurden zu 6 verschiedenen Zeitpunkten gezogen und per LC-MS quantifiziert (n = 3).

Im Gegensatz zu den *in vivo* Beobachtungen (Kapitel 4.1) zeigte **FM-381** höhere Stabilität als seine Cyclopropyl- bzw. Phenyl-substituierten Analoga **29** und **30**: Nach 2 h Inkubationszeit lagen noch über 75 % des Stoffes unverändert vor, während von **29** und **30** nur noch jeweils 54 ± 1 und 44 ± 5 % vorlagen. Über potentielle Metaboliten von **FM-381** wurde bereits in der Literatur berichtet.⁷²

Bei den Metaboliten von **29** handelt es sich wahrscheinlich um Produkte, die durch Demethylierung am Amid, Hydroxylierung an unterschiedlichen Positionen (verschiedene Metaboliten mit unterschiedlichen Retentionszeiten, aber gleichem m/z wurden detektiert) und Kombinationen dieser Schritte entstanden sind.

Der labile Methylester **18** wurde, wenig überraschend, am stärksten umgesetzt, am Ende der Inkubationszeit wurden nur noch 4 % der ursprünglichen eingesetzten Substanz detektiert. Die m/z-Verhältnisse und Retentionszeiten seiner detektierten Metaboliten deuten auf Hydrolyse des Esters und Demethylierung der N-Methylpiperidin-Seitenkette (oder des Amids) hin.

Für **30** wurden analoge Metaboliten detektiert, sowie m/z Werte die für einen Verlust der Phenyl-Seitenkette sprechen.

Während die berechneten Halbwertszeiten von **29** und **30** zu den aus *in vivo* Studien gewonnenen Werten passen, verfügte **FM-381** im Mikrosomen-Experiment offenbar über eine deutlich erhöhte Halbwertszeit (142 min, im Gegensatz zu 23 min *in vivo*). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass dessen rasche Elimination *in vivo* hauptsächlich ein Resultat von Verteilungsprozessen oder direkter Exkretion sein könnte, nicht aber von metabolischer Umwandlung in der Leber.¹⁴¹

Parallel zu den Experimenten in murinen Lebermikrosomen wurde der Metabolismus dreier Testverbindungen mit menschlichen Leberenzymen erforscht. **FM-381**, **29** und **30** wurden mit Enzymen der S9 Fraktion inkubiert und auf Stabilität sowie auftretende Metabolite untersucht. Es handelt sich dabei um eine Mischung aus Leberenzymen, die nach Zentrifugation aufgeschlossener Leberzellen bei 9000 g aus dem Überstand gewonnen werden.

Tabelle 4.16: Stabilität ausgewählter Testsubstanzen, inkubiert mit menschlichen Leberenzymen (S9-Fraktion).

No.	Verblieben nach 3 h ^a [%]
FM-381	72 ± 2
29	0
30	88 ± 17

^aProzentsatz an nach 3 h Inkubation bei 37 °C noch verbliebenem Stoff in Relation zu t₀. Die Proben wurden zum Abbruch der Reaktion mit EtOH versetzt, zentrifugiert und die Überstände per LC-MS quantifiziert (n = 3).

Die Leitstruktur **FM-381** zeigte ähnliche Stabilität wie im murinen Experiment, nach 3 h waren noch immer 72 % des Stoffes unverändert vorhanden. Detektiert wurde u.a. eine Metabolitenmasse, die im Vergleich zum eingesetzten Produkt um 2 u höher lag. Eine Reduktion der Doppelbindung am elektrophilen Warhead würde zwar zu einer passenden Masse führen, erscheint aber metabolisch unwahrscheinlich. Es handelt sich womöglich um ein Produkt, das durch eine komplexere Kombination verschiedener Schritte gebildet wurde.

Das Cyclopropyl-Analogon **29** verhielt sich deutlich anders als im vorigen Experiment: Am Ende der Inkubationszeit konnte die ursprüngliche Substanz nicht mehr detektiert werden, dafür aber ein polarerer Metabolit (s.u.). Ein möglicher Erklärungsansatz für die stark abweichenden Ergebnisse beider Metabolismus-Experimente könnten Unterschiede in den CYP-Ausstattungen von Mensch und Maus sein.^{106,107} Dies würde den Abbau von **29** durch humane CYPs bedingen, die die beiden anderen Testsubstanzen wiederum nicht oder nur in geringem Maße umsetzen.

Das Phenyl-substituierte **30** zeigte die größte Stabilität, nach 3 h waren noch ca. 88 % in unveränderter Form vorliegend. Auch hier wurde ein früher eluierender +2-Metabolit detektiert.

Bei allen Substanzen wurden zudem (in verschiedenem Ausmaße) Metaboliten detektiert, deren berechnete Massen um jeweils -27 von den ursprünglichen Verbindungen abweichen. Ein passender solcher Metabolit könnte z.B. durch Hydrolyse des Amids zur freien Säure entstehen, was durch Vergleich der Retentionszeiten des gefundenen Metaboliten von **FM-381** und dem selbst synthetisierten Carbonsäure-Analog **48** gezeigt werden sollte (**Abbildung 4.28**).

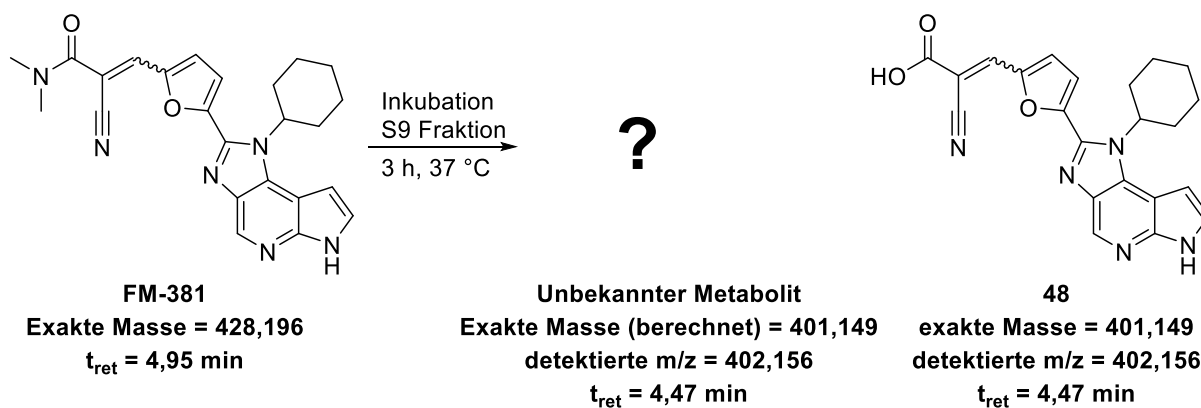


Abbildung 4.28: Die Retentionszeit des bei Inkubation von **FM-381** mit menschlichen Leberenzymen detektierten Metaboliten wurde mit dem synthetisierten **48** verglichen, um zu dessen Identifikation beizutragen. Der unbekannte Metabolit und **48** zeigen identische Fragmentationsmuster und Retentionszeiten.

Sowohl Retentionszeit als auch Massenspektrum des genannten Metaboliten und von **48** waren identisch, es kann also davon ausgegangen werden, dass die Testsubstanzen in der Tat zu den zugehörigen freien Säuren hydrolysiert wurden. Auch in *in vivo* PK-Studien (Kapitel **4.1** und **4.2.1**) wurde **48** u.a. in Leber- und Plasmaproben als Metabolit anderer Substanzen (z.B. **38**) detektiert.

Im Falle von **29** wurde zudem noch ein Metabolit mit um 25 u geringerer Masse als die Ausgangssubstanz gefunden, der womöglich aus einer Kombination des vorigen Schrittes und des „+2-Metaboliten“ entstand.

4.2.7 Stabilität in menschlichem Vollblut und Plasma

Mehrere Testverbindungen wurden in einem weiteren Stabilitätsassay in Vollblut inkubiert. Neben anderen Nucleophilen enthält menschliches Blut durchschnittlich ca. 850 $\mu\text{mol/l}$ Glutathion (GSH), welches potentiell mit ausreichend starken Elektrophilen reagieren könnte.¹⁴² Die Michael-Warheads der dargestellten Substanzen wurden zwar als reversibel bindende Elektrophile designt, die erst nach Stabilisierung in der Kinase kovalent gebunden bleiben sollten; dennoch sollte die Reaktion mit GSH nicht vollständig außer Acht gelassen werden. In Vorversuchen (Inkubation der Testsubstanzen mit GSH bei pH 7.4 und 37 °C) konnte allerdings keine Veränderung der Substanzen per MS oder in den Absorptionsspektren festgestellt werden. Neben der Reaktion mit GSH ist auch eine Umsetzung der Stoffe durch Blutzellen, z.B. durch intrazelluläre Enzyme wie Oxidoreduktasen, ein möglicher Faktor für den Abbau im Vollblut.

Als Kandidaten wurden **FM-381**, seine (*in vivo*) metabolisch stabileren Analoga **29**, **30** und **40** sowie zwei Makrolid-Abkömmlinge, **13** und **38**, in einer Konzentration von je 1 μM eingesetzt. Um den Einfluss individueller, spenderabhängiger Faktoren zu reduzieren wurde das Experiment insgesamt dreimal mit unterschiedlichen Spendern durchgeführt.

Tabelle 4.17: Stabilität ausgewählter Testsubstanzen in menschlichem Vollblut.

No.	Verblieben nach 24 h ^a [%]	t _{1/2} [h]
FM-381	12 ± 9	8,4
29	13 ± 18	7,7
30	4 ± 5	5,7
40	5 ± 3	6,1
13	77 ± 32	32,9
38	85 ± 6	48,4

^aProzentsatz ± SD an nach 24 h Inkubation bei 37 °C noch verbliebenem Stoff in Relation zu t₀. Aliquote wurden zu 8 verschiedenen Zeitpunkten gezogen und per LC-MS quantifiziert (drei biologische Replikate, Singlikatmessung pro Spender).

Die Halbwertszeiten der unkonjugierten Testverbindungen lagen zwischen 6 und 8 h (**Tabelle 4.17**). Unter ihnen erwiesen sich **FM-381** und das Cyclopropyl-Analogon **29** als am stabilsten, am Ende der Inkubationszeit lagen jeweils noch 12 ± 9 bzw. 13 ± 18 % der eingesetzten Substanz vor. Die Halbwertszeit von **30** und **40** lag jeweils bei ungefähr 6 h und die Stoffe waren zum 24 h Zeitpunkt nahezu vollständig abgebaut.

Die beiden Makrolide **13** und **38** erwiesen sich als wesentlich stabiler: Nach 24 h waren noch über 75 % beider Stoffe vorhanden. Die kalkulierten Halbwertszeiten lagen im Vergleich zum unkonjugierten Analog **FM-381** um ein Vierfaches (**13**, ca. 33 h) bzw. sogar um ein Sechsfaches (**38**, ca. 48 h) höher. Wie in anderen Experimenten dargelegt wurde (Kapitel **4.2.5**), werden die Makrolide zwar in hohem Maße in Blutzellen aufgenommen; sie scheinen aber robust gegenüber Abbau durch deren intrazelluläre Enzyme zu sein.

Zusammengefasst konnten die Verbindungen mit metabolisch optimierten Seitenketten, **29**, **30** und **40**, im Vollblut-Assay – im Gegensatz zu den *in vivo* PK-Studien - keinen Stabilitätsvorteil gegenüber **FM-381** demonstrieren. Dies legt nahe, dass die Elimination der genannten Stoffe im Tier wohl wie vermutet v.a. auf enzymatischer Umwandlung der Selektivitätstaschen-Seitenkette in der Leber beruht. Die dagegen auch in diesem Assay beobachtete hohe Stabilität der Makrolidkonjugate unterstützt die aus *in vivo* Studien gewonnenen Erkenntnisse über diese Substanzklasse.

Stabilität in menschlichem Plasma:

Als Folgeversuch wurde die Stabilität der gleichen Stoffe in menschlichem Plasma untersucht. Damit sollte der Einfluss des Abbaus durch Blutzellen ermittelt werden, da diese im Plasma im Gegensatz zum Vollblut fehlen. Anders gesagt wird durch den

Plasma-Versuch hauptsächlich die (In-)Stabilität der Testsubstanzen im Medium, unabhängig von Zellen, erfasst.

Tabelle 4.18: Stabilität ausgewählter Testsubstanzen in menschlichem Plasma.

No.	Verblieben nach 24 h ^a [%]	t _{1/2} [h]
FM-381	0,08 ± 0,02	2,4
29	0,03 ± 0,04	2,3
30	0,12 ± 0,03	2,8
40	0,02 ± 0	2,3
13	68 ± 6	66
38	30 ± 15	30

^aProzentsatz ± SD an nach 24 h Inkubation bei 37 °C noch verbliebenem Stoff in Relation zu t₀. Aliquote wurden zu 8 verschiedenen Zeitpunkten gezogen und per LC-MS quantifiziert (zwei biologische Replikate, Singlikatmessung pro Spender).

Für die Plasmastabilität ergab sich ein ähnlicher Trend zwischen den Substanzen wie im Vollblutversuch (**Tabelle 4.18**): Die Konjugate wiesen vielfach höhere Plasmahalbwertszeiten auf als die unverknüpften Substanzen. Letztere unterschieden sich kaum in ihrer Stabilität, die Halbwertszeiten lagen im Bereich von 2-3 h. Vergleicht man die beiden Assays fällt zudem auf, dass am Ende des Experiments für alle Testsubstanzen im Plasma weniger unveränderte Substanz vorlag als im Vollblut. Mit Ausnahme von **13** waren auch die aus den Plasmaproben berechneten Halbwertszeiten vergleichsweise niedriger. Der Verdacht des Abbaus der Stoffe durch intrazelluläre Enzyme konnte also nicht bestätigt werden, im Gegensatz scheinen diese im Cytosol sogar stabiler zu sein. Letzteres erscheint auch insofern plausibel, dass für die Makrolide generell auch eine stärkere intrazelluläre Anreicherung (Kapitel **4.2.5**) festgestellt wurde und diese im Vollblut deutlich stabiler waren als die unkonjugierten Analoga. Die höhere Stabilität der Konjugate im Plasma (gegenüber den nicht konjugierten Stoffen) lässt sich durch diesen Ansatz allerdings nicht erklären. Falls es v.a. durch verbliebene Plasmaenzyme zum Abbau der Substanzen kommt, sind die Konjugate aber ggf. aufgrund sterischer Hinderung besser geschützt.

4.2.8 Löslichkeit bei pH 7,4

Ein von **FM-381** bereits bekannter Nachteil war die geringe Löslichkeit in Wasser (24 mg/l), die die Handhabung höherer Konzentrationen in Assays erschwert und gegebenenfalls auch für die Formulierung für *in vivo* Studien ein limitierender Faktor sein kann. Durch Optimierung des Amidsubstituenten konnten diesbezüglich bereits Verbesserungen erzielt werden, ohne dass es zu nennenswerten Verlusten an Aktivität

kam.⁷² Auch Vertreter der in dieser Arbeit dargestellten Substanzen wurden auf ihre Löslichkeit untersucht und gegen **FM-381** verglichen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4.19** dargestellt:

Tabelle 4.19: Löslichkeit ausgewählter Testsubstanzen bei pH 7,4.

No.	Löslichkeit ^a [μM]	No.	Löslichkeit ^a [μM]
FM-381	3,9 \pm 0,7	26	103 \pm 31
8	20 \pm 16	27	26 \pm 11
9	61 ^b \pm 12	28	114 ^b \pm 16
11	420 ^b \pm 127	29	196 ^b \pm 33
15	0,0 ^c \pm 0	30	23 \pm 3,6
18	3268 ^b \pm 278	13	48 ^b \pm 21
19	78 \pm 16	37	40 \pm 1,3
20	138 \pm 17	38	834 ^b \pm 231
21	56 \pm 29	39	8762 ^b \pm 119
22	72 \pm 35	40	103 \pm 26
24	46 \pm 13	48	294 ^b \pm 15
50	176 ^b \pm 29		

^aKonzentration \pm SD im Überstand einer gesättigten, zentrifugierten Lösung des Analyten nach 24 h Inkubation in PBS bei RT ($n = 3$). ^bEiner oder mehrere Messwerte lagen oberhalb der Quantifizierungsgrenzen, es handelt sich also nur um ungefähre Werte. ^cAlle Messwerte lagen unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Vermutlich kam es zur Zersetzung des Stoffes oder anderweitiger chemischer Umwandlung.

Bis auf **15**, das unter den Assaybedingungen offenbar instabil war, lag die gemessene Stoffkonzentration im Überstand für alle Testsubstanzen höher als die von **FM-381**. Dies war insbesondere der Fall für Stoffe, die über eine zusätzliche basische Seitenkette verfügen (z.B. **18**, dessen Konzentration in der gesättigten Lösung mehr als 800-fach höher lag als bei **FM-381**). Der pK_a -Wert vieler tertiärer Aminogruppen beträgt ungefähr 10-11 (konjugierte Säure), bei physiologischem pH liegt demnach der Großteil der Moleküle in protonierter Form vor. Bei den Makroliden lagen mitunter wesentliche Unterschiede vor: Die beste Löslichkeit ergab sich bei den über einen N-Ethyl,N-methylethylamid-Linker verknüpften Substanzen **38** und **39**, die jeweils ca. 200- bzw. 2000-fach höher konzentriert vorlagen als **FM-381**. Die kürzerkettigen Analoga **37** und **13** waren dagegen nur ca. 10- bis 12-fach besser löslich als ihr

unkonjugiertes Analog. Bei ihnen kam es in *in vitro* Assays gelegentlich zur Präzipitatbildung beim Einsatz höherer Konzentrationen in wässriger Lösung. Modifikationen am Amid, z.B. der Einsatz hydrophiler Gruppen wie Morpholin (**19, 21**) oder Hydroxypiperidin (**28**) erwiesen sich als günstig und führten zu verbesserter Löslichkeit bei weiterhin guter Aktivität. Auch über Austausch der Cyclohexyl-Seitenkette (z.B. **8, 22, 29**) konnte eine Verbesserung der Löslichkeit erzielt werden, wobei die Änderungen ggf. mit verminderter Aktivität gegen die JAK3 einhergingen (Kapitel **4.1**).

4.3 Weitere *in vivo* Studien

4.3.1 Zusätzliche PK-Studien:

Neben dem für alle Testverbindungen vorgesehenen Standardmodell wurden für ausgewählte Kandidaten noch weiterführende PK-Studien durchgeführt: Unter anderem wurden verschiedene Vehikel und Applikationsarten verglichen, die orale Dosis verdoppelt und die PK-Eigenschaften in Wistar-Ratten untersucht.

4.3.1.1 Vehikel-Studie für orale Applikation

Der Einfluss der Formulierung auf die orale Aufnahme von **FM-381** und **18** wurde für drei verschiedene, für Synovo-Studien geläufige Vehikel getestet. Man verglich:

- a) 10 % DMSO in 0,5 % Zitronensäure
- b) PEG400/Polysorbat 80 (4:1), 20 % in 0,5 % Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)
- c) Miglyol812/Polysorbat 80 (4:1), 20 % in 0,5 % HPMC.

Formulierung a) war die für die bisherigen PK-Studien geläufige Standardformulierung und diente als Vergleichsvehikel. Das für b) verwendete Gemisch eignet sich aufgrund der emulgierenden Eigenschaften von Polysorbat 80 und der viskositätssteigernden HPMC für die Einarbeitung schwerlöslicher Substanzen. Für c) wird der PEG-Anteil durch ein Gemisch mittelkettiger Triglyceride ersetzt. Man fördert dadurch eine verzögerte bzw. verlangsamte Freisetzung der Wirkstoffe aus der Emulsion.

Zusätzlich wurde noch eine Gruppe in die Studie eingeschlossen, die mit einer niedrigeren Dosis intraperitoneal behandelt wurde (mit dem Vehikel PEG400/Polysorbat 80 4:1, 10 % in Wasser). Ziel war, die Eignung der intraperitonealen Verabreichung von **18** für eine geplante ca. zweiwöchige EAE-Studie (Kapitel **4.3.4**) zu evaluieren und die im Hirn erreichbaren Konzentrationen abzuschätzen. Aufgrund der raschen Umwandlung von **18** im Plasma wurde auch nach den Massen des demethylierten Metaboliten („Desmethyl-**18**“) gesucht. Im Folgenden sind deswegen auch die Konzentrationen an Desmethyl-**18**, nicht die der Ursubstanz, dargestellt.

Ergebnisse: Die Art der Formulierung hatte im Falle von **FM-381** sowohl Einfluss auf t_{\max} als auch auf die in Organe aufgenommenen Stoffmengen (**Abbildung 4.29**):

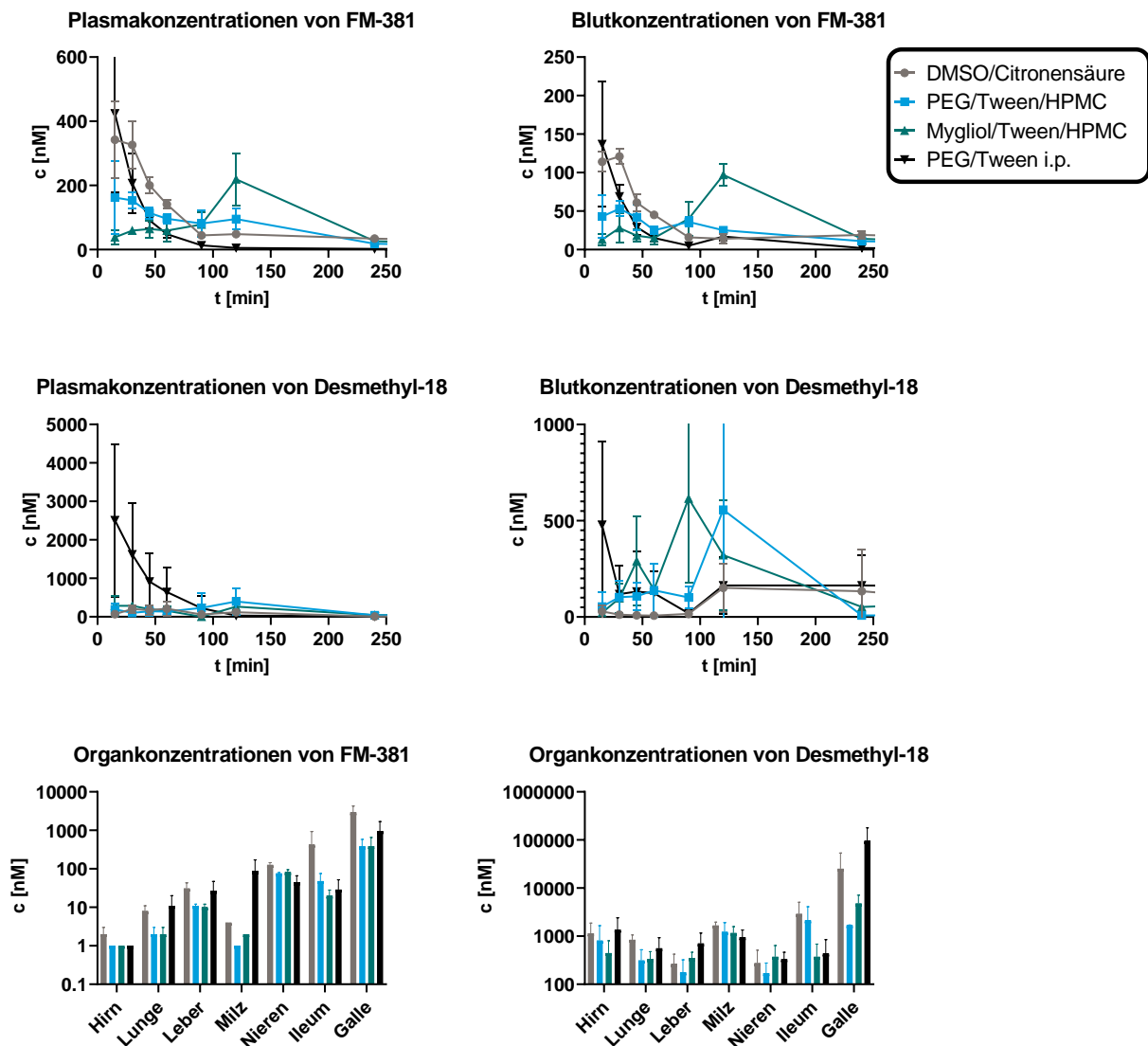


Abbildung 4.29: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **FM-381** und dem demethylierten Metaboliten von **18** in Plasma, Organen bzw. Blut von BALB/c Mäusen. Behandelt wurde entweder p.o. mit $12 \mu\text{mol/kg}$ in verschiedenen Vehikeln (s.o.) oder i.p. mit $2,4 \mu\text{mol/kg}$ in PEG/Tween/ H_2O . Die Organe wurden 8 h nach der Behandlung entnommen. $n = 3$.

Die übliche Formulierung aus 10 % DMSO in 0,5 Zitronensäure führte zu rascherer Absorption und höheren Spitzenspiegeln als die PEG/Tween/HPMC-Mischung. Auch die Organkonzentrationen waren generell höher als bei den anderen oralen Vehikeln. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da durch den DMSO-Anteil die Passage der Testsubstanzen durch Membranen gefördert wird und damit deren orale Aufnahme. Die Mygliol-haltige Emulsion sorgte im Falle von **FM-381** zu verzögerter Absorption, die höchste Konzentration wurde erst 2 h nach Verabreichung gemessen. Wahrscheinlich ist, dass die Substanz erst nach Abbau der Triglyceride durch Lipasen freigesetzt wird und zur Aufnahme zur Verfügung steht. Der Einfluss auf die

Organkonzentrationen war, bezogen auf die andere DMSO-freie Formulierung, vernachlässigbar gering. Die nach i.p. Injektion vorgefundenen Stoffmengen in Plasma und Organen entsprachen wie zu erwarten in ihrem Muster in etwa jenen nach i.v. Gabe, lagen aber tendenziell niedriger.

Die Plasmaspiegel des demethylierten Metaboliten von **18** waren über den Verlauf der Blutungszeitpunkte hinweg eher niedrig, während die Werte im Blut – je nach Formulierung – mitunter deutlich fluktuierten. Die in den Organen gefundenen Stoffmengen entsprechen dem in vorigen Studien für **18** gefundenen Verteilungsmustern, inklusive der Aufnahme ins ZNS. Auch nach intraperitonealer Gabe einer niedrigeren Dosis (2,4 $\mu\text{mol/kg}$) wurden erfreulich hohe Konzentrationen von Metabolit und Ursubstanz (nicht gezeigt) im Hirngewebe detektiert, wodurch diese Applikationsart als für die geplante EAE-Studie geeignet befunden wurde.

4.3.1.2 Hochdosierte p.o. Studie mit früherer Termination

Eine weitere Studie mit Balb/c Mäusen befasste sich mit den Kandidaten **18**, **29**, **37** und **40**. Diese hatten sich entweder bereits in anderen *in vivo* Studien (z.B. Colitis oder EAE Wirksamkeitsmodelle, s.u.) hervorgetan oder sollten als Kandidaten dafür in Betracht gezogen werden, weswegen ihre Aufnahme und Verteilung näher untersucht werden sollten. Die Gruppen wurden in zwei Terminationszeitpunkte (2 h und 4 h nach Behandlung) aufgeteilt, was im Vergleich zu den bisherigen Daten ($t = 8$ h) früher liegt. Zudem wurde die oral verabreichte Dosis auf 24 $\mu\text{mol/kg}$ (in 0,5 % Zitronensäure) verdoppelt. Es ist bekannt, dass bei p.o. gegebenen Stoffen aufgrund des First-Pass Effekts unter Umständen eine Schwellendosis existiert, unterhalb derer praktisch keine Aufnahme ins Blut oder die Peripherie erfolgt. Dementsprechend war es von Interesse, ob eine Steigerung der Dosis einen überproportionalen Effekt auf die Plasma- oder Gewebekonzentrationen haben könnte, oder ob bestimmte Stoffe nun auch weitere Zielorgane als bisher erfasst adressieren könnten. Für Letzteres lag das Augenmerk insbesondere auf der ZNS-Gängigkeit, die von den eingesetzten Substanzen bisher nur von **18** demonstriert worden war.

Ergebnisse: Die Plasmakonzentrationskurven der Testsubstanzen (**Abbildung 4.30**) entsprachen den jeweils bekannten Mustern.

Plasmakonzentrationen nach 24 $\mu\text{mol/kg}$ p.o.

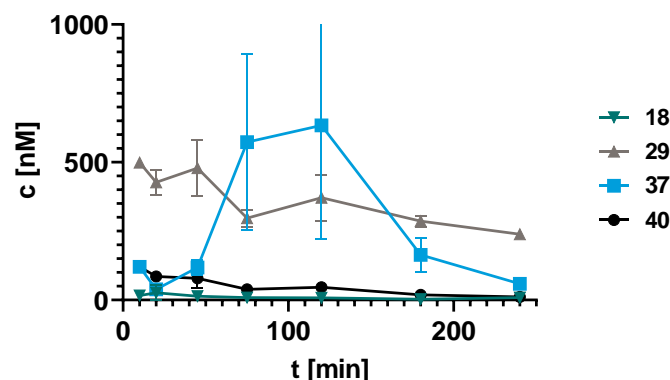


Abbildung 4.30: Plasmakonzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **18**, **29**, **37** und **40**, die BALB/c Mäusen in einer Dosis von 24 $\mu\text{mol/kg}$ p.o. in 0,5 % Zitronensäure-Lösung verabreicht wurden. $n = 3$.

Der labile Methylester **18** wurde wie zu erwarten kaum intakt im Plasma vorgefunden, und auch das Bicyclo[3.1.0]hexyl-substituierte **40** war nur in niedrigen Konzentrationen messbar. **37** zeigte den für die Makrolide typischen späten Peak um ca. 90-120 min nach Verabreichung, der dem enterohepatischen Kreislauf der Stoffklasse zugeschrieben wird. Erfreulich waren die über einen relativ langen Zeitraum stabilen Plasmaspiegel des metabolisch robusten Cyclopropyl-Analoges von **FM-381**, **29**. Aus therapeutischer Sicht ist dies besonders wünschenswert, um ein langes Dosierintervall zu ermöglichen und gleichzeitig toxische Spitzenspiegel direkt nach Applikation zu vermeiden. Die Daten unterstützen die Vermutung, dass die gute Wirksamkeit des Stoffes im *in vivo* LPS Challenge Modell (Kapitel **4.3.2**) vor allem den pharmakokinetischen Vorteilen zuzuordnen ist.

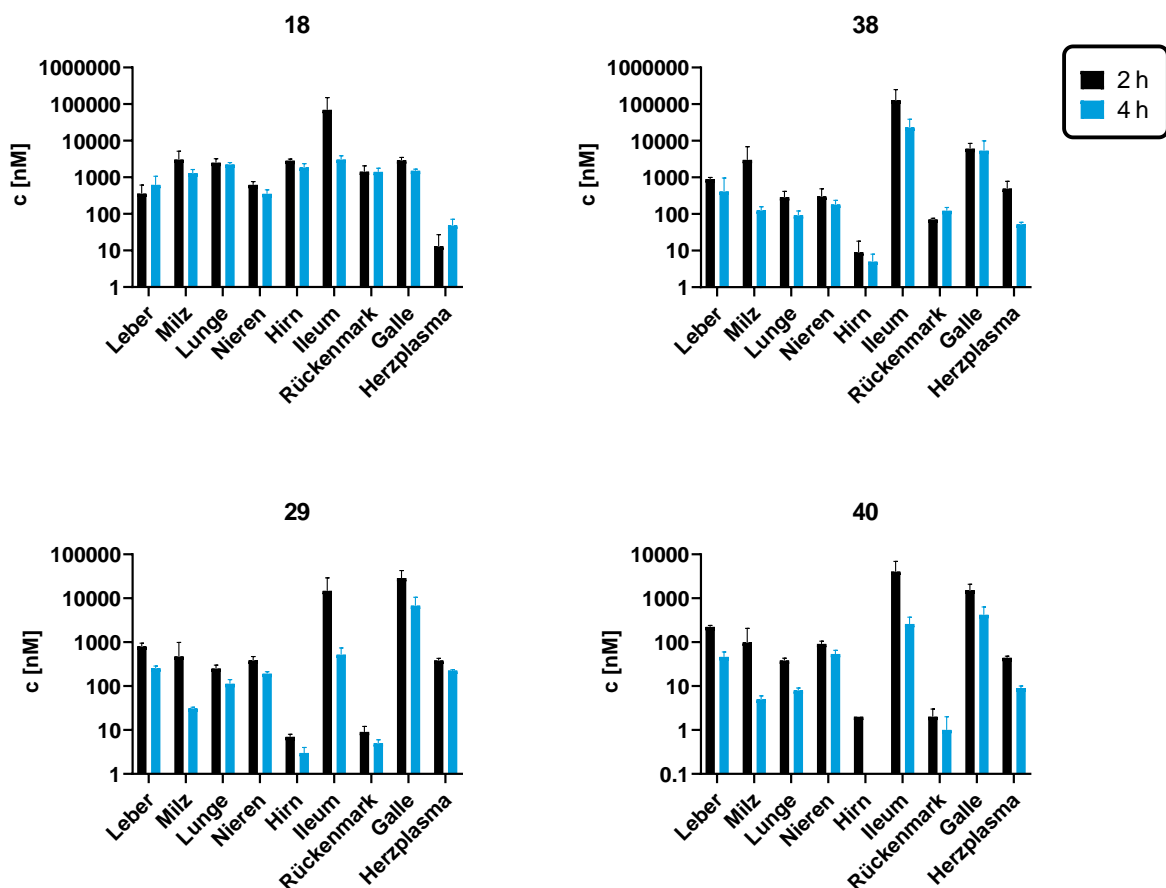


Abbildung 4.31: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **18**, **38**, **29** und **40** in diversen Organen von BALB/c Mäusen nach oraler Verabreichung von $24 \mu\text{mol/kg}$ des jeweiligen Stoffes in 0,5 % Zitronensäure-Lösung. Die Proben wurden entweder 2 h (schwarz) oder 4 h (blau) nach der Behandlung entnommen. $n = 3$.

Vergleicht man die in Organen vorgefundenen Konzentrationen mit jenen aus früheren Studien mit niedrigerer Dosis (und späterem Terminationszeitpunkt), lagen diese bei vielen Stoffen bzw. Organen deutlich erhöht vor (**Abbildung 4.31**). **18** lag im Plasma fast gar nicht in intakter Form vor, konnte aber in den meisten Organen in mikromolaren Konzentrationen nachgewiesen werden. Erfreulicherweise traf dies auch auf Hirn (ca. $3 \mu\text{M}$ nach 2 h, ca. $2 \mu\text{M}$ nach 4 h) und Rückenmark (ca. $1,4 \mu\text{M}$ zu beiden

Zeitpunkten) zu. Der Befund der ZNS-Gängigkeit konnte also bestätigt werden. Die erreichten Konzentrationen sprechen für die Möglichkeit einer oralen Therapie neurologischer Krankheitsbilder mit der Substanz. Die Stoffkonzentrationen im Ileum waren zwar enorm hoch, schwankten aber auch stark zwischen den Tieren (ca. $70 \pm 81 \mu\text{M}$), was am Ehesten mit unterschiedlich vorangeschrittener Darmpassage zusammenhängt. Eine Anwendung bei entzündlichen Darmerkrankungen könnte ggf. ebenfalls von Interesse sein.

38 reicherte sich wie schon in vorigen p.o.-Studien massiv im Ileum an ($128 \pm 120 \mu\text{M}$ nach 2 h). In anderen peripheren Organen war die Substanz zwar durchaus nachweisbar, die Konzentrationen lagen aber für ein Makrolid vergleichsweise niedrig (ca. dreistellig nanomolarer bis mikromolarer Bereich). Die bevorzugte Verteilung in den GI-Trakt macht den Stoff zu einem vielversprechenden Kandidaten zur Anwendung bei Modellen des Morbus Crohn und anderer Darmleiden.

Im Falle von **29** wurden zum 2 h Zeitpunkt hohe (zweistellig mikromolare) Konzentrationen im Ileum vorgefunden. Diese fielen zum 4 h Zeitpunkt hin schon wieder stark ab und waren in einer vorigen Studie nach 8 h näherungsweise null. Es ist denkbar, dass es sich bei den nach 2 h gemessenen Konzentrationen vor allem um Stoff handelt, der nach der oralen Verabreichung noch nicht aufgenommen worden war. Andere Organe wurden verhältnismäßig wenig adressiert.

Das Verteilungsmuster von **40** entsprach tendenziell dem von **29**, allerdings lagen die Werte im Vergleich dazu ca. eine Zehnerpotenz niedriger. Die Substanz scheint oral schlechter aufgenommen zu werden, was auch die niedrigeren Plasmaspiegel nahelegen.

Zusammengefasst konnte die Eignung von **18**, **38** und **29** für diverse *in vivo* Wirksamkeitsstudien bekräftigt werden, da sie wünschenswerte Verteilungsmuster, Aufnahme und Stabilität nach oraler Gabe zeigten.

4.3.1.3 PK-Eigenschaften von **76** und Scan von Metabolitenmassen Bicyclo[3.1.0]hexylsubstituierter Makrolide

Das Fluorophor **76** wurde zusammen mit den Bicyclo[3.1.0]hexyl-substituierten Makrolid-Konjugaten **42** und **43** in männlichen C57BL/6 Mäusen auf Verteilung und Stabilität untersucht. Ziel war sowohl die Ermittlung einer geeigneten Dosis von **76** für ein weiterführendes Experiment (s.u.), als auch der Scan nach potentiellen Metaboliten-Massen von **42** und **43** in Plasma und Leber. Um die Aufnahme in Hirn und Rückenmark auch in einem anderen Mäusestamm als BALB/c aufzuzeigen, wurde **18** ebenfalls in die Studie eingeschlossen. Die Dosis wurde – im Vergleich zu den standardmäßig für jede neue Substanz durchgeführten PK-Studien - auf $4,8 \mu\text{mol/kg}$ (i.v., 10 % DMSO in Serum) bzw. $24 \mu\text{mol/kg}$ (p.o., 0,5 % Zitronensäure) gesteigert, terminiert wurde 4 h nach Behandlung.

Ergebnisse: Die Plasmakurven (**Abbildung 4.32**) von **42**, **43** und **18** entsprachen im Wesentlichen den Beobachtungen aus vorigen Studien. Interessant war das späte Maximum von **18** nach oraler Gabe; hohe Plasmakonzentrationen der intakten Substanz sind für diesen Stoff unüblich, da der metabolisch labile Methylester rasch gespalten wird. Das Farbstoff-Konjugat **76** erwies sich als stabil, die

Plasmahalbwertszeit nach i.v. Gabe erwies sich mit ca. 80 min als vergleichbar mit jenen der beiden anderen eingesetzten Makrolide **42** und **43** (je ca. 90 min). Nach oraler Verabreichung des Fluorophors wurden vergleichsweise hohe Plasmaspiegel erreicht, die bis zum Ende der Studie relativ stabil blieben. Vermutlich kam es zur stetigen Rückverteilung von in peripheren Geweben aufgenommenen Stoffmengen ins Plasma, wodurch die dortigen Konzentrationen für längere Zeit konstant gehalten wurden.

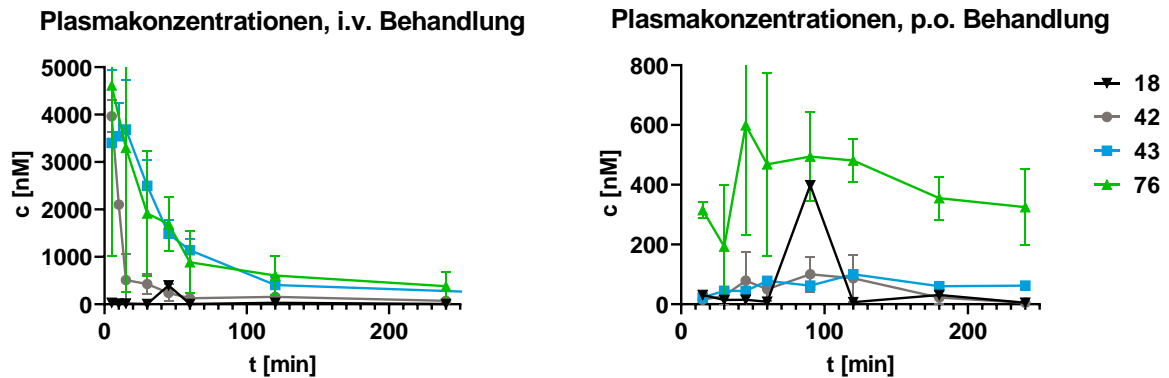


Abbildung 4.32: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **18**, **42**, **43** und **76** im Plasma von C57BL/6 Mäusen nach i.v. Injektion von 4,8 $\mu\text{mol/kg}$ (in 10 % DMSO in Serum, links) bzw. p.o. Gavage von 24 $\mu\text{mol/kg}$ (in 0,5 % Zitronensäure, rechts) des jeweiligen Stoffes. $n = 3$.

Die in peripheren Organen gefundenen Konzentrationen an **76** entsprachen den typischen Verteilungsmustern der Makrolide (**Abbildung 4.33**): Mikromolare Konzentrationen waren in Lunge, Leber, Milz, Nieren und vor allem (nach oraler Gabe) im Ileum detektierbar. Der Stoff wurde nur in geringen Mengen ins ZNS aufgenommen, die aber dennoch über der unteren Quantifizierungsgrenze lagen.

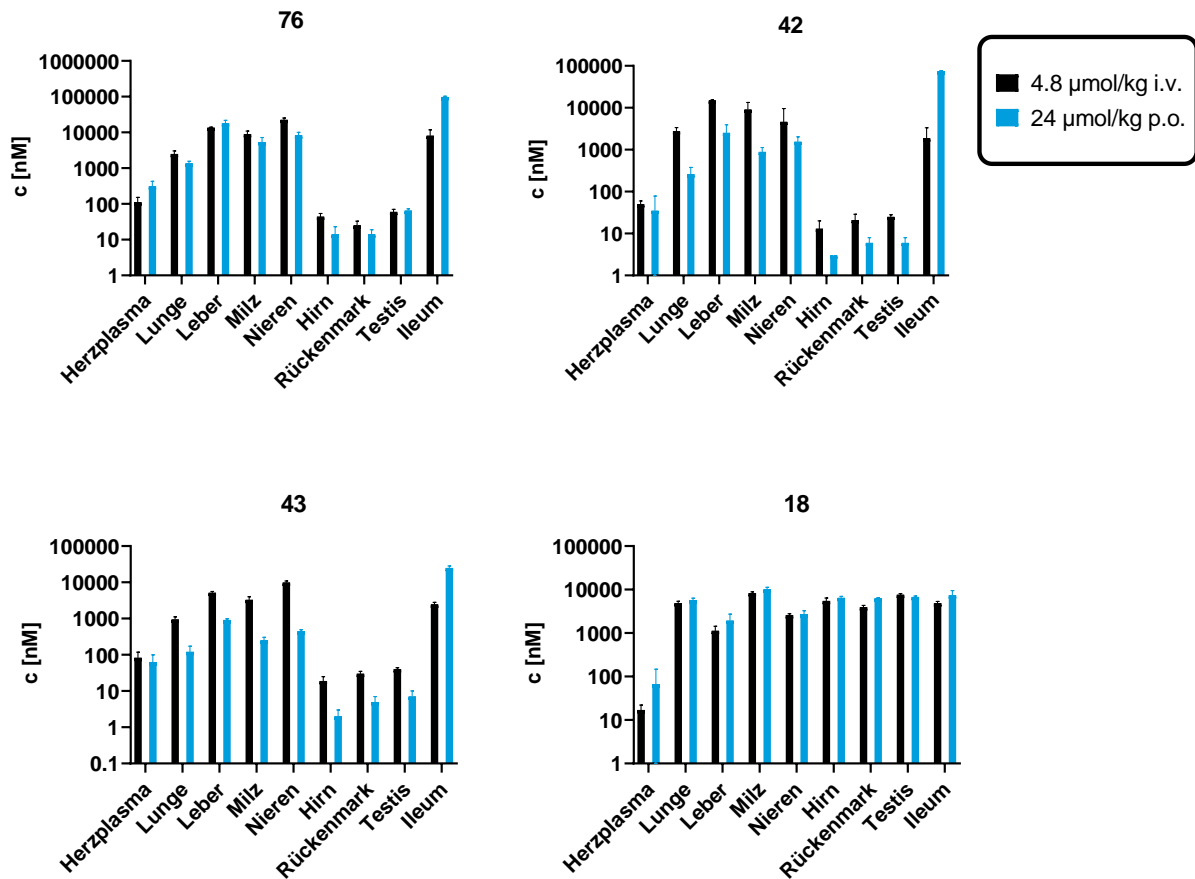
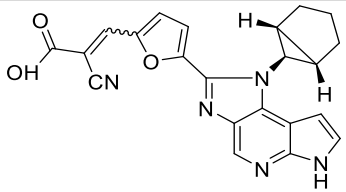
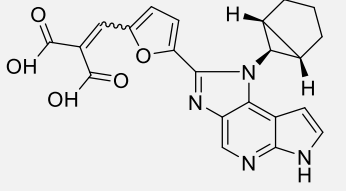
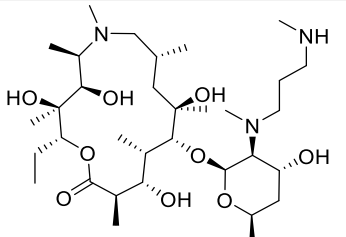
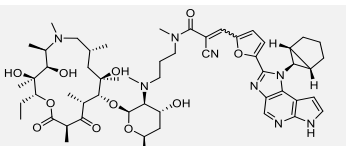
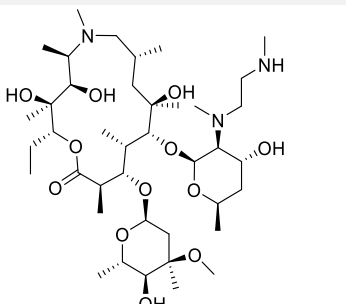
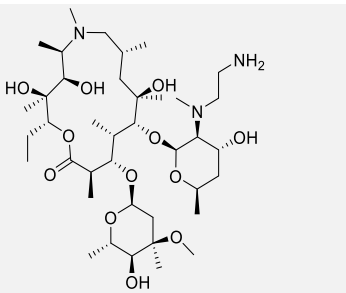


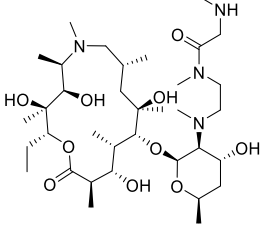
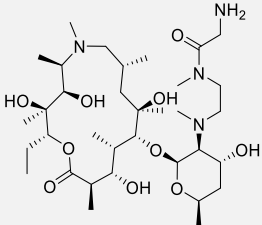
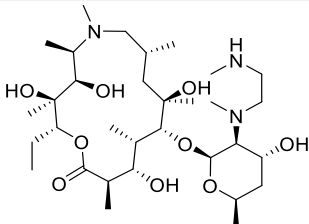
Abbildung 4.33: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **18**, **42**, **43** und **76** in diversen Organen männlicher C57BL/6 Mäuse, 4 h nach Gabe von 4,8 µmol/kg der Stoffe i.v. (in 10 % DMSO in Serum, schwarz) bzw. 24 µmol/kg p.o. (in 0,5 % Zitronensäure, blau). $n = 3$

Die Konjugate **42** und **43** zeigten ebenfalls die bekannten Makrolid-Verteilungsmuster: Hohe Stoffmengen wurden in den peripheren Organen gemessen, insbesondere im Ileum nach oraler Verabreichung ($75 \pm 2 \mu\text{M}$ für **42**, $25 \pm 3 \mu\text{M}$ für **43**). Das N-methylpiperidin-substituierte **18** wurde nach beiden Applikationsarten ausgesprochen gut in sämtliche entnommenen Organe, inklusive Testis, Rückenmark und Hirn, aufgenommen. Die im Hirn vorgefundenen Konzentrationen lagen mit $6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (p.o.) bzw. $5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (i.v.) um ein Vielfaches höher als die JAK3 IC_{50} des Stoffs. Noch höhere Konzentrationen wurden in den Milzen der Tiere gefunden, was auf eine gute Aufnahme in Immunzellen (und nachfolgende Wanderung jener Zellen ins Milzgewebe, wo der Stoff dann detektiert wurde) hinweist.

Herzplasma und Leber der Tiere wurden außerdem nach m/z-Werten potentieller Metaboliten von **42** und **43** durchsucht. Es handelt sich dabei um rein qualitative Angaben, da für eine Quantifizierung die jeweils zu suchende Substanz zur Verfügung stehen müsste.

Tabelle 4.20: In C57BL/6 Mäusen vorgefundene Massen potentieller Metaboliten der Makrolide **42** und **43**.

Vermutete Struktur	M _R	Metabolit von	Plasma	Leber	Kommentar
	399,4	42	Ja	Ja	Hydrolyse Amid
	418,4	42	Nein	Ja	Hydrolyse Amid und Nitril
	647,9	42	Nein	Ja	Hydrolyse Amid, Verlust von Cladinosose
	1027,3	42	Nein	Ja	Verlust von Cladinosose, Oxidation
	792,1	43	Nein	Ja	Spaltung Amid
	778,0	43	Nein	Ja	Spaltung Amid, Desalkylierung

	704,5	43	Nein	Ja	Spaltung Verlust von Cladinose	Amid,
	690,9	43	Nein	Ja	Spaltung Verlust Cladinose, Desalkylierung	Amid, von
	633,9	43	Nein	Ja	Spaltung Verlust von Cladinose	Amid,

Für beide Makrolidkonjugate wurden Massen detektiert, die plausibel zu erwarteten Metaboliten passen (**Tabelle 4.20**). Typisch für die Substanzklasse scheint eine Hydrolyse des Cyanacrylamids zu sein. Dies wurde ebenfalls in einer separaten Studie beobachtet, in der **48** als Metabolit von **38** nachgewiesen wurde. Auch hier wurde für **42** die Masse der vermuteten freien Säure des JAK-Warheads detektiert. Weitere Folgereaktionen scheinen die Hydrolyse des Nitrils und Desalkylierungen am Makrolid-Carrier zu umfassen. Auch der Verlust des Cladinose-Zuckers ist für beide Substanzen möglich; dabei kann es noch zu einer nachfolgenden Oxidation der verbliebenen Hydroxygruppe an Position 3 des Lactons kommen. Geht man davon aus, dass die von den Carriern abgespaltenen JAK-Warheads gute JAK-Aktivität zeigen (wie z.B. für **48** gezeigt wurde), liefern die Daten eine Erklärung für die gute *in vivo* Wirksamkeit der Konjugatwirkstoffe: Die intakten Substanzen werden aufgenommen und reichern sich in peripheren Geweben an, von wo sie sich langsam ins Blut zurückverteilen und für langanhaltend stabile Wirkstoffspiegel sorgen. Durch Spaltung am Cyanacrylamid werden dann die (weniger voluminösen und dafür aktiveren) JAK-Warheads frei und sorgen für potente Inhibition der JAK3. Man kann die Makrolidkonjugate in diesem Sinne also gewissermaßen auch als Prodrugs betrachten.

4.3.1.4 Vergleich weiterer Applikationsarten

Eine weitere Studie befasste sich mit dem Vergleich verschiedener Darreichungsformen: Die Testsubstanzen **FM-381**, **18** und **37** wurden dabei auf folgende Arten verabreicht:

- 5 ml/kg **p.o.** in 0,1 % Zitronensäure
- 0,5 ml/kg **topisch** in DMSO/PEG400 9:1
- 0,25 ml/kg **aurikulär** in Miglyol812/PEG400 9:1

Die Dosis betrug in sämtlichen Gruppen 12 $\mu\text{mol/kg}$. Die topische Formulierung wurde an einem rasierten Bereich des Hinterkopfs, zwischen den Ohren, aufgetragen. Zum Vergleich wurden später Proben sowohl dieser Stelle, als auch vom unbehandelten Rücken entnommen. Die Tiere wurden 2 bzw. 4 h nach Verabreichung terminiert und die Wirkstoffkonzentrationen in den entnommenen Organen bestimmt.

Ergebnisse: Die Plasmaspiegel der Stoffe waren nach oraler Gabe am höchsten, lagen aber insgesamt immer noch recht niedrig. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer PK-Studien, bei denen sowohl für **FM-381** als auch **37** nur eine vergleichsweise geringe orale Aufnahme ins Plasma festgestellt worden war. Die Konzentrationen lagen aber dennoch zeitweise mehrfach über der jeweiligen JAK3 IC_{50} der Stoffe. **18** wurde – für alle drei Applikationsarten - überhaupt nicht im Plasma detektiert, der Methylester wurde dort vermutlich schnell hydrolysiert.

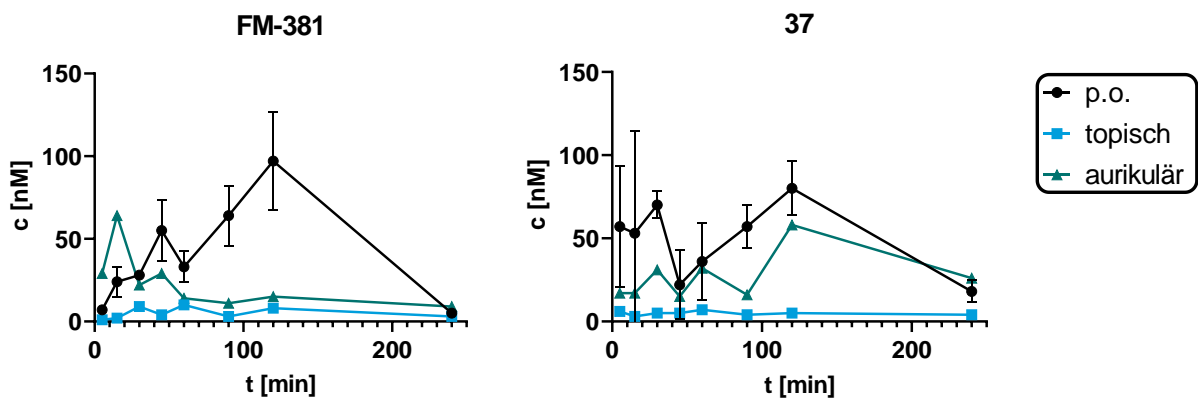


Abbildung 4.34: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **FM-381** (links) und **37** (rechts) im Plasma von BALB/c Mäusen nach Verabreichung von 12 $\mu\text{mol/kg}$ des jeweiligen Stoffes in oraler (schwarz), topischer (blau) oder aurikulärer (grün) Form. Nicht gezeigt ist **18**, da sämtliche für den Stoff im Plasma gemessenen Konzentrationen unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze lagen. $n = 3$.

Die Aufnahme ins Plasma aus der topisch angewandten DMSO/PEG400-Lösung bzw. den Ohrentropfen fiel sowohl für **FM-381** als auch für sein Makrolid-Analog **37** relativ gering aus, es wurden keine nennenswerten Spiegel erreicht. Dies ist positiv zu bewerten, da eine starke Aufnahme in den Körper nach topischer Anwendung im Üblichen nicht erwünscht ist und zu systemischen Nebenwirkungen führen könnte.

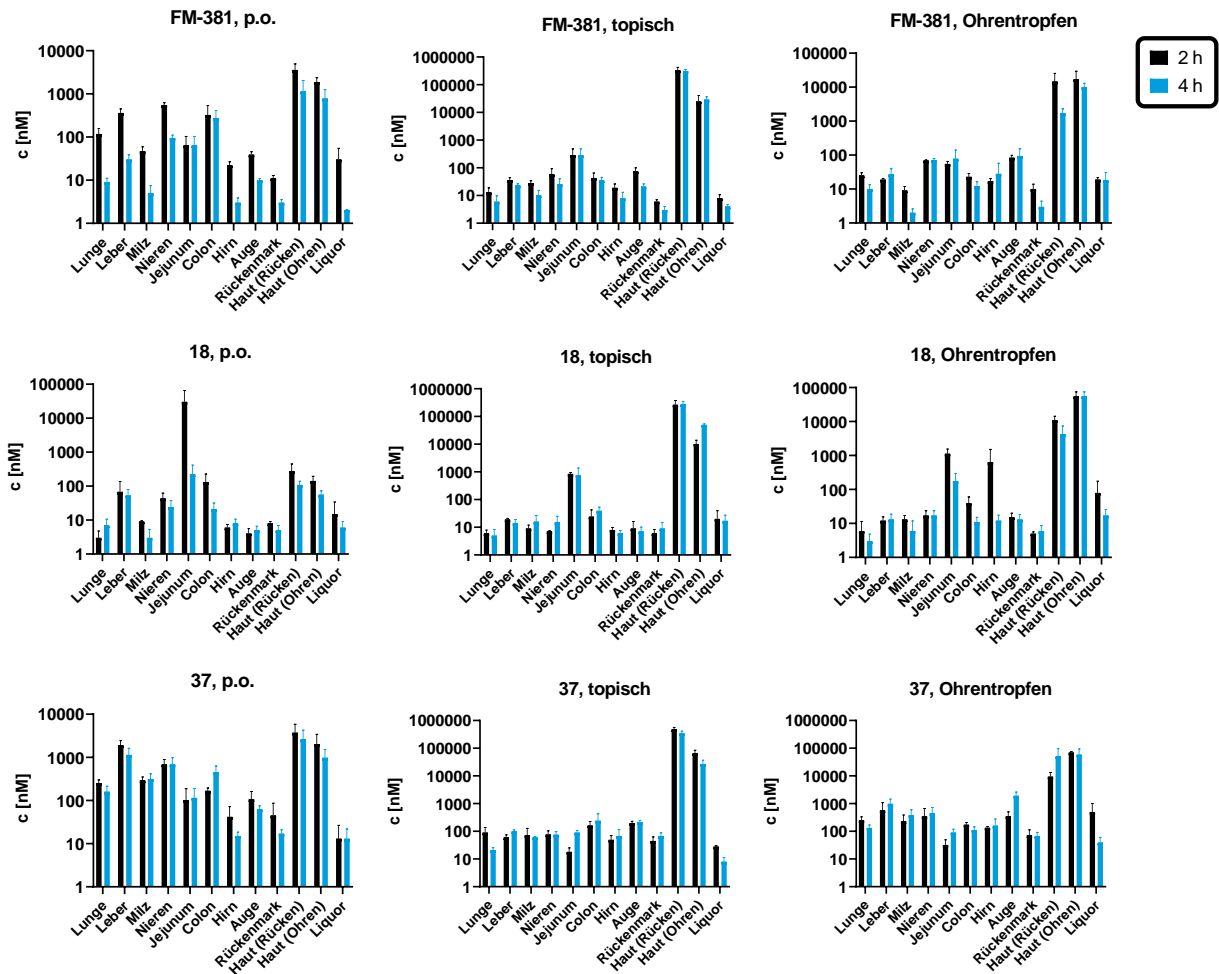


Abbildung 4.35: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) von **FM-381**, **18** und **37** in den Organen von BALB/c Mäusen nach Verabreichung von 12 $\mu\text{mol/kg}$ des jeweiligen Stoffes in oraler, topischer oder aurikulärer Form. Die Proben wurden 2 h (schwarz) bzw. 4 h (blau) nach Verabreichung entnommen. $n = 3$.

Die in peripheren Organen vorgefundenen Konzentrationen von **FM-381** waren überwiegend niedrig, auch nach oraler Verabreichung. Interessanterweise wurden aber in allen drei Behandlungsgruppen mikromolare Konzentrationen des Stoffes in den entnommenen Hautproben gemessen. Während dies in der topisch behandelten Gruppe nicht weiter verwunderlich ist (es wurde zwar eine andere Stelle behandelt, aber eine Verteilung der Lösung durch die Mäuse ist nicht auszuschließen), deuten die Messwerte in den beiden anderen Gruppen auf eine gezielte Verteilung des (lipophilen) Stoffes in Haut- bzw. Fettgewebe hin. Ansonsten war **FM-381** in den Organen von topisch bzw. aurikulär behandelten Tieren nur in niedrigen Konzentrationen (meist < 100 nM) vorzufinden, was eher gegen eine starke Aufnahme durch die Haut spricht.

18, das in anderen Studien in fast allen Organen angereichert vorgefunden wurde, lag in der p.o.-Gruppe in vielen Organen in überraschend geringen Konzentrationen vor. Die Ausnahme bildete das Ileum, in dem 2 h nach Gabe zweistellig mikromolare Konzentrationen gemessen wurden. Im Gegensatz zu vorigen Experimenten wurde auch im ZNS fast kein **18** detektiert. Da sich die Bedingungen (Dosis, Tierstamm, Vehikel) nicht wesentlich von anderen p.o.-Studien unterschieden ist nicht auszuschließen, dass es aufgrund externer Faktoren zu Instabilitäten der Proben (oder

bereits der formulierten Substanz) kam. Nach topischer Anwendung wurden nur im Ileum und in Hautproben höhere Konzentrationen gemessen. Das Verteilungsmuster in der mit Ohrentropfen behandelten Gruppe war ähnlich, hier wurde aber zusätzlich zu Ileum und Haut auch das ZNS erreicht: 2 h nach Behandlung wurden 640 ± 840 nM im Hirn und 79 ± 97 nM im Liquor Cerebrospinalis detektiert. Zum 4 h Zeitpunkt waren die Konzentrationen aber bereits wieder stark abgefallen.

Das Makrolidkonjugat **37** konnte nach oraler Verabreichung in den meisten peripheren Organen nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen lagen, wie schon bei **FM-381**, in den Hautproben vor. Auch in der Leber wurden zu beiden Terminationszeitpunkten mikromolare Konzentrationen erreicht. Die topisch mit **37** behandelten Tiere hatten, verglichen mit dem unkonjugierten **FM-381**, höhere Konzentrationen in der Mehrzahl der Organproben. Diese lagen aber immer noch nur im zweistelligen bis niederen dreistelligen nanomolaren Bereich. Gewisse Mengen des Stoffes wurden in der topisch behandelten Gruppe auch im ZNS detektiert. Die Verabreichung in Form von Ohrentropfen führte zu einem ähnlichen Verteilungsmuster, die Konzentrationen waren aber verglichen mit der topischen Applikation höher. Proportional gesteigerte Mengen wurden vor allem im Hirn (159 ± 119 nM nach 4 h) und den Augen ($1,9 \pm 0,7$ μ M nach 4 h) vorgefunden.

Allgemein ist zu den topisch behandelten Gruppen noch anzumerken, dass die in der (unbehandelten) Rückenhaut gefundenen Konzentrationen bei allen drei Testsubstanzen höher lagen als die in den in der (behandelten) Haut zwischen den Ohren. Denkbar ist, dass die topische Formulierung nicht ausreichend viskos war und in den Rückenbereich herunterlief, bevor sie vollständig aufgenommen wurde. Die nach topischer Behandlung erreichten systemischen Spiegel sind außerdem vermutlich eher den Eigenschaften von DMSO als Penetrationsbeschleuniger zuzuschreiben als einer intrinsischen Aufnahme der Testsubstanzen.

4.3.1.5 Pharmakokinetik nach i.n. Verabreichung

Im Rahmen der Erforschung alternativer Verabreichungsmethoden wurde eine PK-Studie durchgeführt, bei der intranasal behandelt wurde. Die i.n. Behandlung dient als Surrogat für die inhalative Gabe von Arzneimitteln beim Menschen, da letztere an Mäusen nicht sinnvoll durchführbar ist. Auch bei intranasaler Gabe werden hohe Wirkstoffkonzentrationen in der Lunge erreicht, und durch die gute lokale Durchblutung ist auch mit Aufnahme in den Kreislauf zu rechnen.

Getestet wurden insgesamt sechs Substanzen, die sich in vorigen Studien bereits durch eine hohe Aufnahme ins Lungengewebe ausgezeichnet hatten: Die Makrolide **37**, **38**, **44**, **46** und **47** sowie das unkonjugierte, Methylpiperidin-substituierte **18**. Die verabreichte Dosis war mit $1,68$ μ mol/kg vergleichsweise geringer als in vorigen Studien, da nur ein geringes Volumen (25 μ l pro Nasenloch) zur Verabreichung zulässig war. Höhere Wirkstoffkonzentrationen wären in dem begrenzten Volumen des Vehikels (5 % DMSO, 5 % PEG400 und ein molares Äquivalent Fumarsäure in Wasser) nur noch schwer löslich gewesen bzw. hätten den – schlecht tolerierten – Zusatz weiterer organischer Lösemittel erfordert. Terminiert wurde entweder 1, 2 oder 16 h nach Verabreichung und es wurden diverse Organe (s.u.) entnommen. Zudem wurde zu vier

Zeitpunkten nach Verabreichung Plasma aus der Schwanzvene entnommen und die Wirkstoffkonzentrationen bestimmt.

Ergebnisse: Schon 15 min nach der Verabreichung wurden mit den meisten Testsubstanzen hohe systemische Konzentrationen im mikromolaren Bereich erzielt (**Abbildung 4.36**). Die Ausnahme bildeten die über 3'-Position verknüpfte Konjugate **46** und **47**, bei denen die Messwerte etwa eine Zehnerpotenz niedriger lagen.

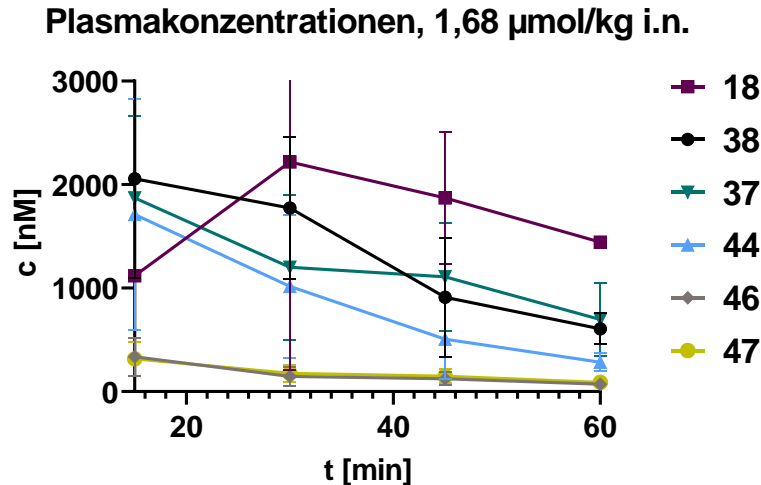


Abbildung 4.36: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) verschiedener Testsubstanzen im Plasma von BALB/c Mäusen nach intranasaler Verabreichung von 1,68 $\mu\text{mol/kg}$ der jeweiligen Substanz (5 % DMSO, 5 % PEG400 + 1,68 $\mu\text{mol/kg}$ Fumarsäure, 25 μl Lösung pro Nasenloch). $n = 5$.

Auch der erwartete Metabolit **48** wurde in niedrigen, aber quantifizierbaren Konzentrationen im Plasma nachgewiesen (nicht abgebildet). Eine Zuordnung zu einem bestimmten Vorgängerstoff ist aber nicht möglich, da die Testsubstanzen kassettenweise verabreicht wurden. Interessant sind die ungewöhnlich hohen Plasmakonzentrationen von **18**. Typischerweise lagen diese in anderen Studien – unabhängig der Applikationsroute – deutlich niedriger, oft sogar unterhalb der Quantifizierungsgrenzen. Die Werte sollten demnach vorsichtig interpretiert werden.

Von den Organen wurden Hirn, Lunge, Leber und Milz analysiert, ebenso die Bronchoalveolare Lavage-Flüssigkeit (BALF), welche durch Ausspülen der Atemwege (mit einem definierten Volumen) gewonnen wurde. Die Makrolidkonjugate zeigten alle ähnliche Verteilungsmuster (**Abbildung 4.37**): Die höchsten Konzentrationen wurden, wie erwartet, im Lungengewebe erreicht und lagen 1-2 h nach der Applikation noch im ein- bis zweistellig millimolaren Bereich. Starke Anreicherung wurde ebenfalls in Leber und Milz beobachtet und entspricht dem typischen Verhalten der Makrolide. Im Gegensatz zu den i.v.- und p.o. PK-Studien wurden für die Makrolide **44**, **46** und **47** aber zu keinem der drei Terminationszeitpunkte nennenswerte Konzentrationen im Hirngewebe detektiert.

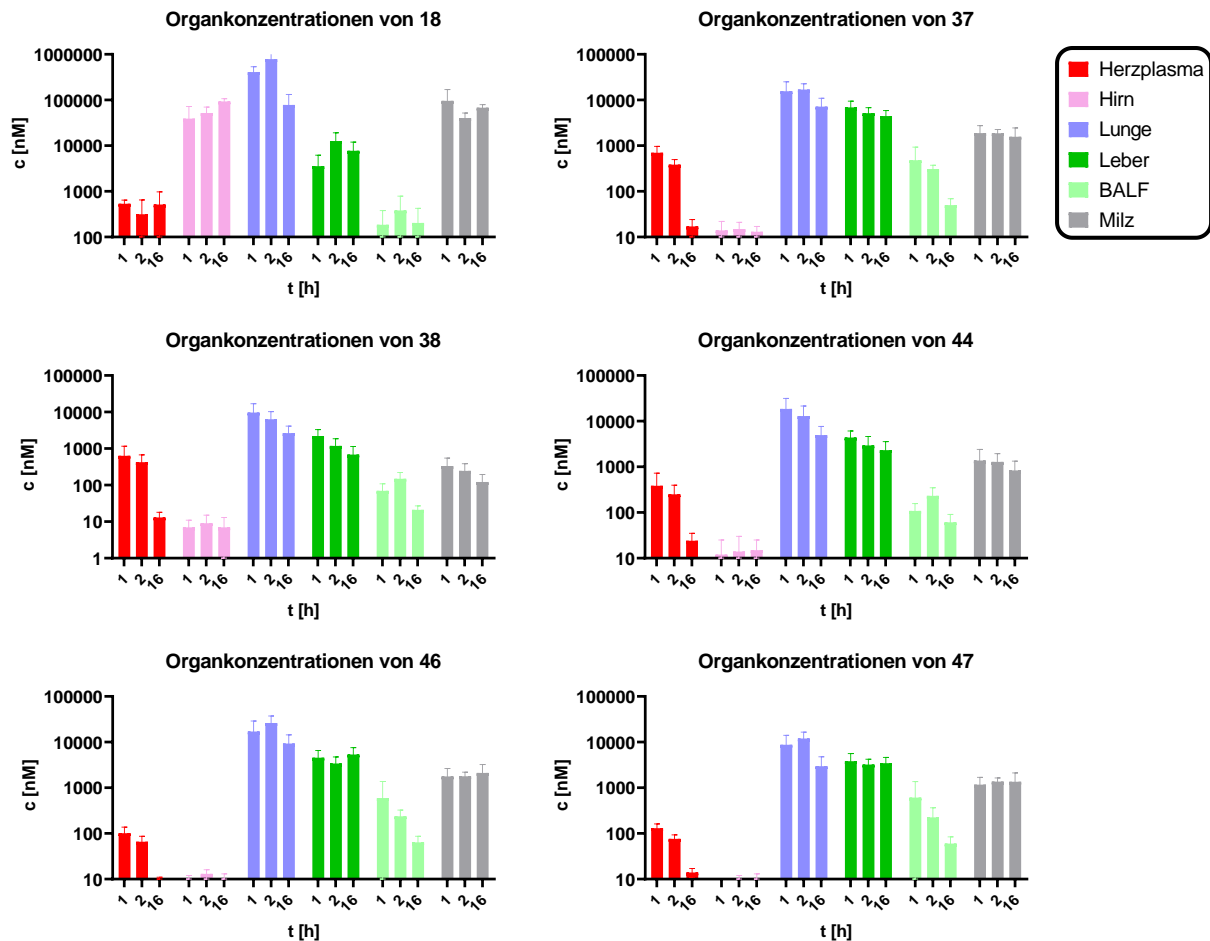


Abbildung 4.37: Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) verschiedener Testsubstanzen in den Organen von BALB/c Mäusen zu 1 h, 2 h und 16 h nach intranasaler Verabreichung von $1,68 \mu\text{mol/kg}$ der jeweiligen Substanz (5 % DMSO, 5 % PEG400 + $1,68 \mu\text{mol/kg}$ Fumarsäure, $25 \mu\text{l}$ Lösung pro Nasenloch). $n = 5$.

Im Gegensatz dazu reicherte sich **18** massiv im Hirn an und erreichte Konzentrationen zwischen 39 und $93 \mu\text{M}$ (1 bzw. 16 h nach Behandlung). Noch höhere Werte wurden in der Lunge detektiert, diese lagen mitunter oberhalb der Quantifikationsgrenze. Auch in Leber und Milz kam es zur starken Anreicherung des Stoffes, der selbst zum 16 h Zeitpunkt noch in ähnlichen Größenordnungen vorlag. Die Werte erscheinen im Hinblick auf bisherige Studien (mit anderer Applikationsart) unerwartet hoch. Die Standardkurven und Retentionszeiten der Testsubstanz aus den Rohdaten waren jedoch schlüssig, was gegen falsch positive Messwerte spricht. Dennoch sollten die Befunde ggf. durch eine Wiederholungsstudie überprüft werden, falls die i.n. Behandlung mit **18** für zukünftige Studien erwogen werden sollte.

4.3.1.6 Pharmakokinetik in Wistar Ratten

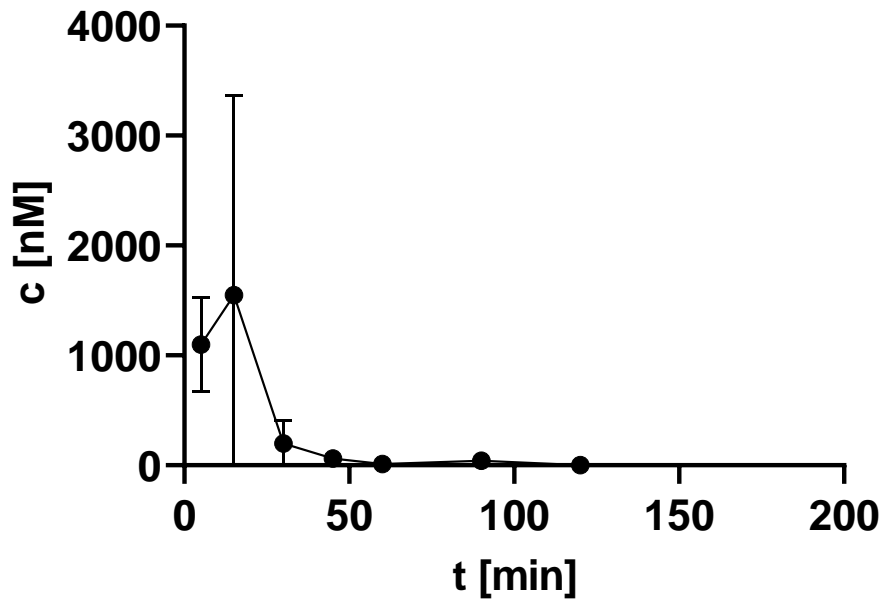
Eine Auswahl an Testsubstanzen wurde in einer weiterführenden Studie auf ihre PK-Eigenschaften in Ratten (Wistar) untersucht. Anzunehmen ist, dass sie zwischen verschiedenen Vertretern der Nagetiere ähnlich sind; es können aber, z.B. durch abweichende enzymatische Ausstattung der Leber, durchaus relevante Unterschiede auftreten.¹⁴³ Beispielsweise wurden große Unterschiede zwischen Maus und Ratte im First-Pass Metabolismus des NMDA-Antagonisten Memantin oder beim

enterohepatischen Kreislauf von Compound K, einem Inhaltsstoff des Ginsengs, beobachtet.^{144,145}

Bei der Studie in Ratten wurde sowohl intravenös (2,4 µmol/kg in 10 % DMSO in Serum) als auch oral (2,4 µmol/kg in 0,05 % Zitronensäure + 0,5 % Hydroxypropylmethylcellulose) mit **FM-381**, **13** und **29** behandelt. In einer weiteren p.o. Gruppe wurden noch **30** und **40** in die Studie eingeschlossen. 8 h nach Behandlung wurden die Tiere euthanasiert und Herzblut sowie Organproben entnommen. Von der Leber wurden verschiedene Abschnitte („Leber I bis VI“) genommen, die sich in ihrem Abstand zur Pfortader (I bis III, zunehmend) bzw. zum Gallengang (IV bis VI, zunehmend) unterscheiden.

Die Leitverbindung **FM-381** wurde nach i.v. Gabe rasch eliminiert (**Abbildung 4.38**): 2 h nach Applikation konnte keine Substanz mehr detektiert werden. In oral behandelten Tieren wurde in keiner der Blutproben noch intaktes **FM-381** gefunden, was für eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, einen hohen First-Pass Effekt oder eine Kombination beider Faktoren spricht. Im Gegensatz zu den standardisierten Mäusestudien wurde hier allerdings auch eine fünffach geringere Dosis (2,4 µmol/kg) angewendet. Möglicherweise wurde damit noch nicht die nötige Schwellendosis erreicht, um nach erster Leberpassage messbare Konzentrationen im Blut zu erreichen. Auch in der Mehrzahl der Organe war der Stoff nicht messbar, lediglich in Ileum und Caecum der p.o.-Gruppe war die Konzentration oberhalb der Quantifikationsuntergrenze (jeweils 92 ± 108 und 223 ± 149 nM). Das Fehlen messbarer Mengen des unveränderten Stoffes nach i.v. Gabe spricht für eine rasche und vollständige Umwandlung zu Metaboliten anderer Massen, die dann nicht mehr detektiert wurden. Eine Studie mit früherem Terminationszeitpunkt könnte hier von Nutzen sein, um die Vorgänge besser zu verstehen.

FM-381, i.v.



FM-381, Organkonzentrationen

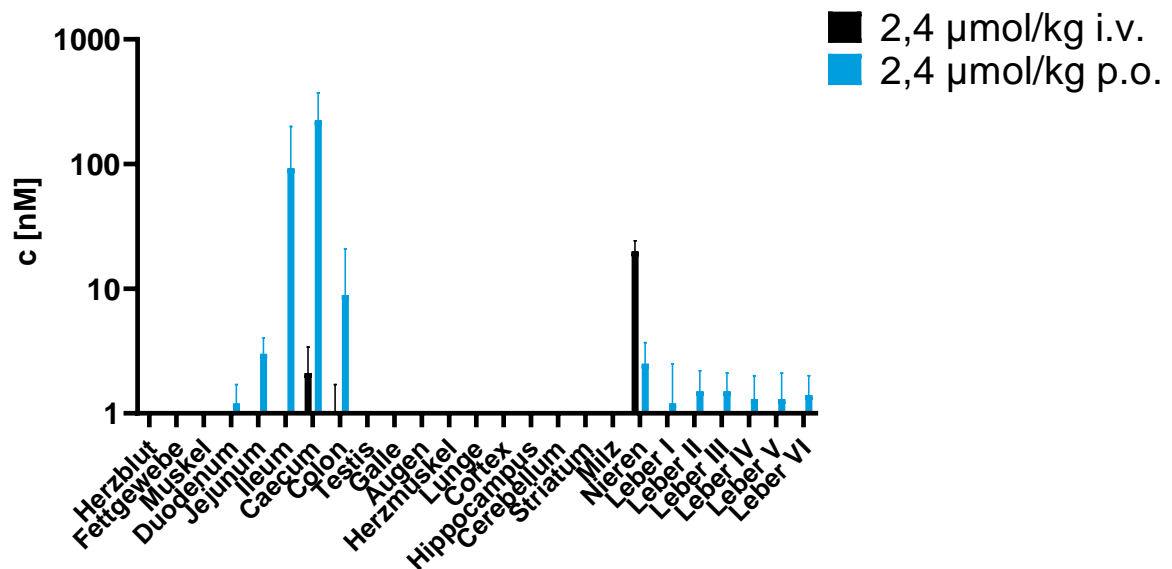


Abbildung 4.38: Konzentration (Mittelwert \pm SD) von **FM-381** im Blut von Wistar-Ratten nach i.v. Injektion von 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ (oben) bzw. in Organproben, die 8 h nach der Behandlung mit 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ i.v. (schwarz) bzw. p.o. (blau) entnommen wurden (unten). $n = 3$.

29, das sich in Studien mit Mäusen als stabiler erwiesen hatte, war ebenfalls 2 h nach Injektion nicht mehr detektierbar (**Abbildung 4.39**, oben links).

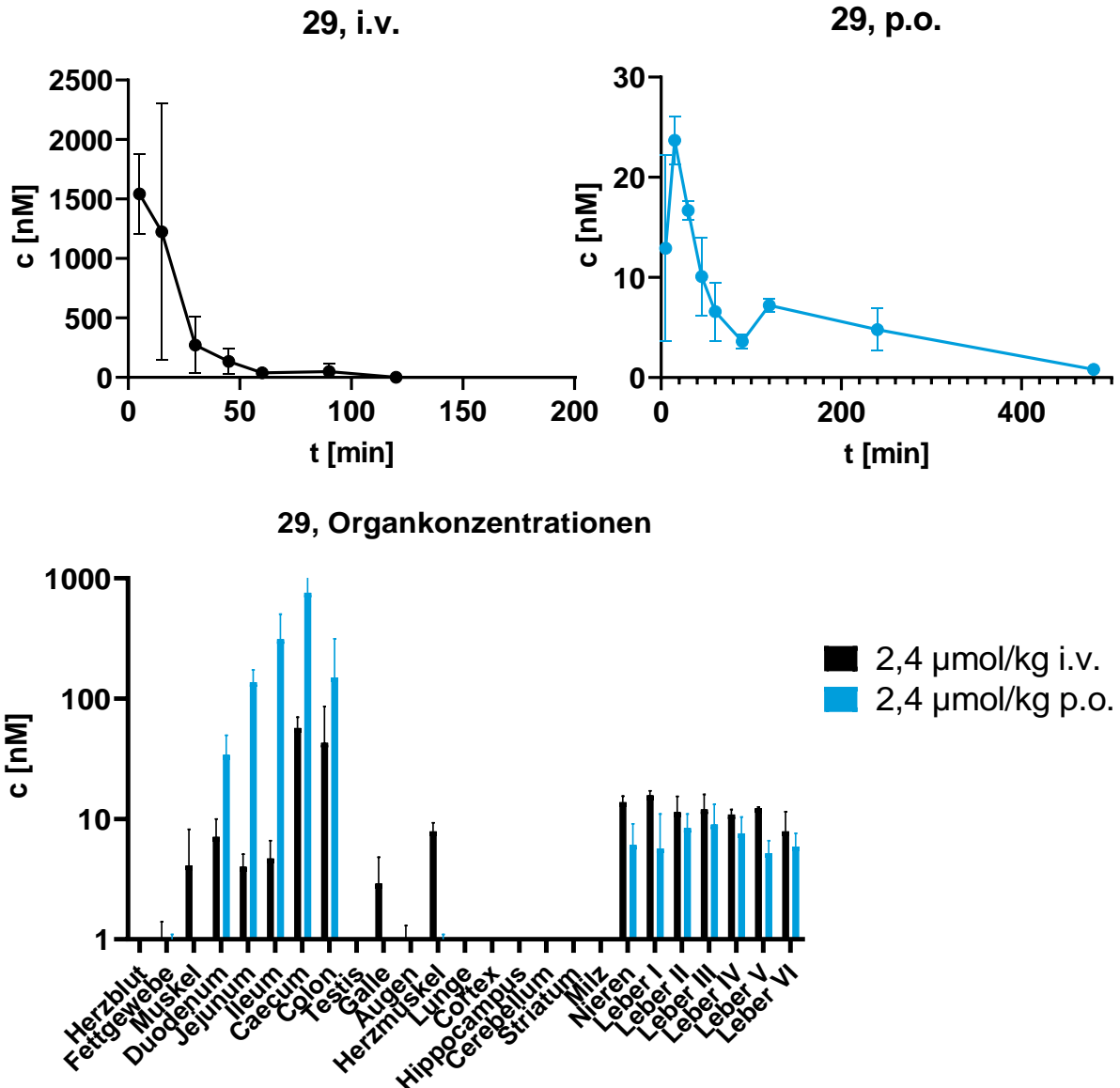


Abbildung 4.39: Konzentration (Mittelwert \pm SD) von **29** im Blut von Wistar-Ratten nach i.v. Injektion von 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ (oben links), p.o. Gabe von 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ (oben rechts) bzw. in Organproben, die 8 h nach der Behandlung mit 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ i.v. (schwarz) bzw. p.o. (blau) entnommen wurden (unten). $n = 3$.

Die AUCs der i.v. Kurven von **FM-381** und **29** waren zudem nahezu identisch (30257 vs. 31693). Auch die jeweiligen Halbwertszeiten nach Injektion lagen in ähnlichen Größenordnungen (**FM-381**: 8 min, **29**: 12 min). Eine andersartige Verstoffwechslung der als metabolischen Angriffspunkt vermuteten alicyclischen Seitenkette in Ratten wäre ein interessanter Erklärungsansatz für die scheinbar ähnliche Stabilität. Eine nähere Überprüfung durch weitere Studien war aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Die Blutkonzentrationen von **29** nach oraler Gabe waren zwar gering, aber zumindest messbar und ergaben eine orale BV von 8 %. Auch hier sind die für **FM-381** diskutierten Gründe für die niedrigen Werte anzumerken. Der Stoff wurde nach 8 h

v.a. im GI-Trakt (Caecum: 760 ± 366 nM nach p.o. Gabe) sowie in Spuren in der Leber gefunden.

Das Phenyl-Analogon von **FM-381**, **30**, wurde nur oral verabreicht. Zu keinem der Blutungszeitpunkte konnten quantifizierbare Konzentrationen des Stoffes gemessen werden. Auch hier handelt es sich um einen Stoff, der aufgrund der Studien in Mäusen als vergleichsweise stabil betrachtet wird. Eine schlechte orale Bioverfügbarkeit war allerdings schon in vorigen Studien aufgefallen.

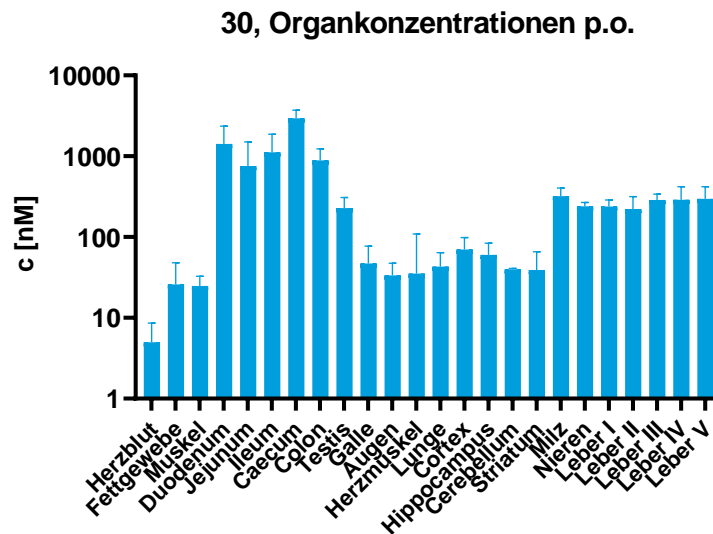


Abbildung 4.40: Konzentration (Mittelwert \pm SD) von **30** in Organproben von Wistar-Ratten, die 8 h nach der Behandlung mit $2,4 \mu\text{mol/kg}$ p.o. entnommen wurden. $n = 3$.

Im Gegensatz zu **29** war **30** jedoch in vielen der entnommenen Organproben (**Abbildung 4.40**) noch in relevanten Konzentrationen zu finden, insbesondere in den Darmabschnitten (z.B. Caecum: $3,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$) sowie in Leber (bis zu 297 ± 121 nM), Galle (228 ± 81 nM) und Niere (320 ± 83 nM). Die Substanz wurde auch im Hirngewebe (z.B. Hippocampus: 70 ± 29 nM) vorgefunden, was bei Vertretern dieser Klasse in den Mäusestudien nur vereinzelt beobachtet worden war. Zusammengefasst scheint die metabolisch optimierte Seitenkette gegenüber **FM-381** für das Erreichen therapeutischer Konzentrationen auch in Ratten von Vorteil zu sein.

Das Makrolid **13** zeigte auch in Wistar-Ratten die für die Substanzklasse typischen PK-Eigenschaften (**Abbildung 4.41**):

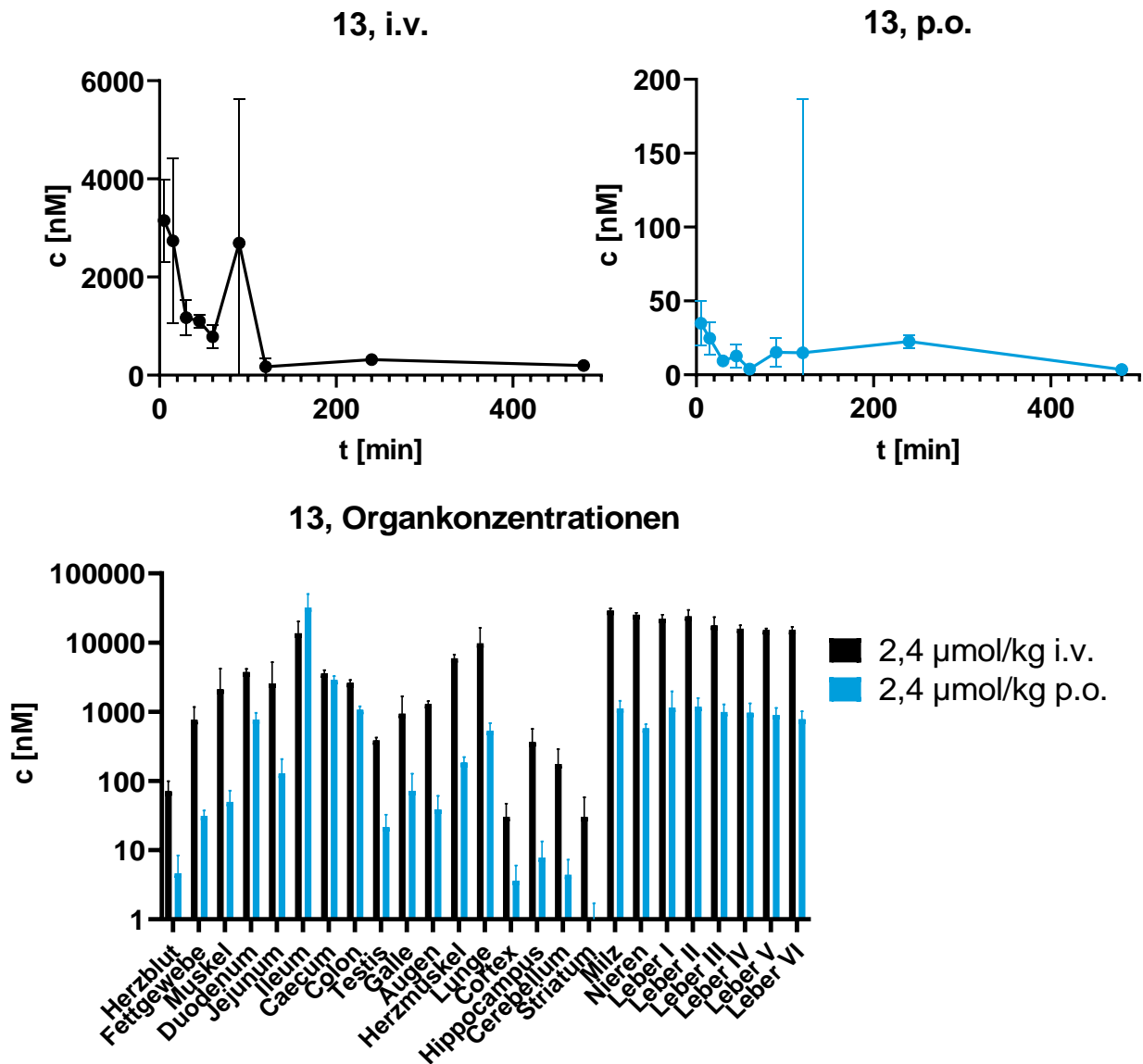


Abbildung 4.41: Konzentration (Mittelwert \pm SD) von **13** im Blut von Wistar-Ratten nach i.v. Injektion von 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ (oben links), p.o. Gabe von 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ (oben rechts) bzw. in Organproben, die 8 h nach der Behandlung mit 2,4 $\mu\text{mol/kg}$ i.v. (schwarz) bzw. p.o. (blau) entnommen wurden (unten). $n = 3$.

Nach i.v. Injektion kam es – vermutlich durch Umverteilungsprozesse – zu einer schnellen Elimination des Stoffes aus dem Blut, wobei zwischen den Tieren erhebliche Unterschiede festgestellt wurden. Nach dem initialen Abfall waren die Spiegel niedrig, aber stabil, was auf die für Makrolide bekannte langsame Rückverteilung aus dem Gewebe ins Blut zurückzuführen ist. 8 h nach der Injektion waren noch immer 196 ± 47 nM im Blut vorhanden, was in etwa der JAK3 IC_{50} von **13** entspricht. Die Halbwertszeit des Stoffes in Ratten lag deutlich über jenen der nichtkonjugierten Testsubstanzen **FM-381** und **29** und betrug ca. 154 min. Nach oraler Gabe wurden nur geringe Wirkstoffspiegel im Blut erreicht ($c_{\text{max}} = 25 \pm 11$ nM, $t_{\text{max}} = 15$ min). Die scheinbare orale BV betrug 2,5 %. In den meisten der entnommenen Organe wurden hohe Wirkstoffkonzentrationen erreicht, insbesondere im GI-Trakt (Ileum: $13,6 \pm 6,6$ μM nach i.v., $32,0 \pm 18,2$ μM nach p.o. Behandlung), Milz ($29,0 \pm 2,1$ μM bzw. $1,1 \pm 0,3$ μM), den Nieren (i.v. Gruppe $25,2 \pm 1,8$ μM , p.o. Gruppe $0,6 \pm 0,1$ μM) und in der

Leber (bis zu $23,9 \pm 5,8 \mu\text{M}$ nach i.v. bzw. $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ nach p.o. Behandlung). Der Stoff überwand zudem in gewissen Mengen die Blut-Hirn-Schranke, in der i.v. Gruppe waren zum Terminationszeitpunkt noch $365 \pm 200 \text{ nM}$ im Hippocampus und $175 \pm 114 \text{ nM}$ im Cerebellum detektierbar. Eine Passage ins ZNS erscheint für Moleküle dieser Größe zunächst unwahrscheinlich, lässt sich aber evtl. durch aktiven Transport bzw. die vorige Aufnahme in periphere Blutzellen, die dann die Blut-Hirn-Schranke passieren, erklären.

38 wurde nur oral verabreicht. Ähnlich wie bei **13** wurden dabei nur geringe Spitzenspiegel im Blut erreicht (**Abbildung 4.42**). Die in den Organproben gemessenen Konzentrationen lagen im Allgemeinen in ähnlichen Bereichen wie beim anderen Makrolid **13**, mit Ausnahme der Leber (bis zu $134 \pm 91 \text{ nM}$), Milz ($329 \pm 331 \text{ nM}$), Niere (131 ± 92) und Lunge ($66 \pm 74 \text{ nM}$), die jeweils ca. eine Zehnerpotenz niedriger lagen. Plausibel erscheint eine geringere Stabilität von **38** gegenüber **13** durch Spaltung des Amid-Linkers durch unspezifische Amidasen. Höher lagen dagegen die im ZNS detektierten Konzentrationen ($136 \pm 44 \text{ nM}$, ca. Faktor 30 höher als bei **13** p.o.). Die höchsten Werte von **38** lagen erneut im Ileum ($15,9 \pm 15,8 \mu\text{M}$) und Caecum ($2,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$) vor, was es auch in Ratten zu einem interessanten Kandidaten für Modelle chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen macht.

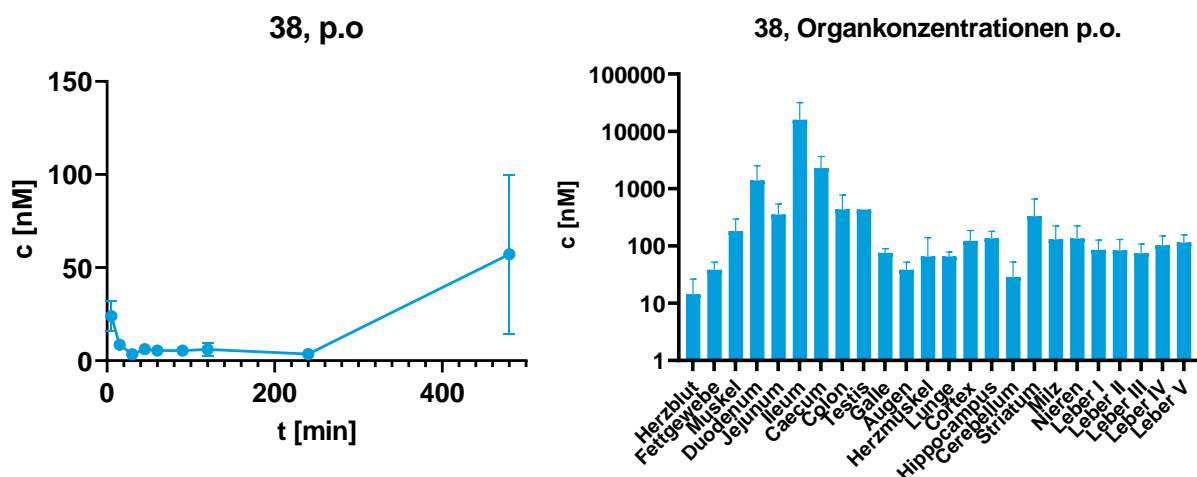


Abbildung 4.42: Konzentration (Mittelwert \pm SD) von **38** im Blut von Wistar-Ratten nach p.o. Behandlung mit $2,4 \mu\text{mol/kg}$ (links) bzw. in Organproben, die 8 h nach der Behandlung entnommen wurden (rechts). $n = 3$.

Zusammengefasst lassen sich die in Mäusen demonstrierten Vorteile der Makrolidcarrier auf Stabilität und die Anreicherung in bestimmten Geweben auch auf Ratten übertragen. Es konnten insbesondere für **13** durch eine relativ geringe Dosis bereits hohe, therapeutisch relevante Konzentrationen in vielen Organen erreicht werden.

4.3.1.7 Fluoreszenzmikroskopie des Gewebes von mit **76** behandelten Tieren:

Das Konjugat aus Azithromycin-basiertem Carrier und dem Fluorophor Cumarin 343, **76**, wurde nach den erfolgreichen *in vitro* Experimenten (Kapitel 4.2.5) auch *in vivo* untersucht. Ziel war es, die Verteilung der Makrolide nicht nur in Blutzellen, sondern auch innerhalb von Organgeweben durch Fluoreszenzmikroskopie zu veranschaulichen. **76** wurde ausgewählt, da es sowohl ein hervorragendes Fluorophor darstellt, als auch sehr ähnliche PK-Eigenschaften aufweist wie die JAK-Inhibitor-Konjugate. Parallel zur Entnahme der Proben für die Histologie wurden weitere Teile der Organe zur Quantifizierung des Wirkstoffes per MS entnommen. Behandelt wurde wie in der vorausgegangenen PK-Studie (Kapitel 4.3.1.3) mit 24 $\mu\text{mol/kg}$ des Stoffes p.o. in 0,5 % Zitronensäure-Lösung.

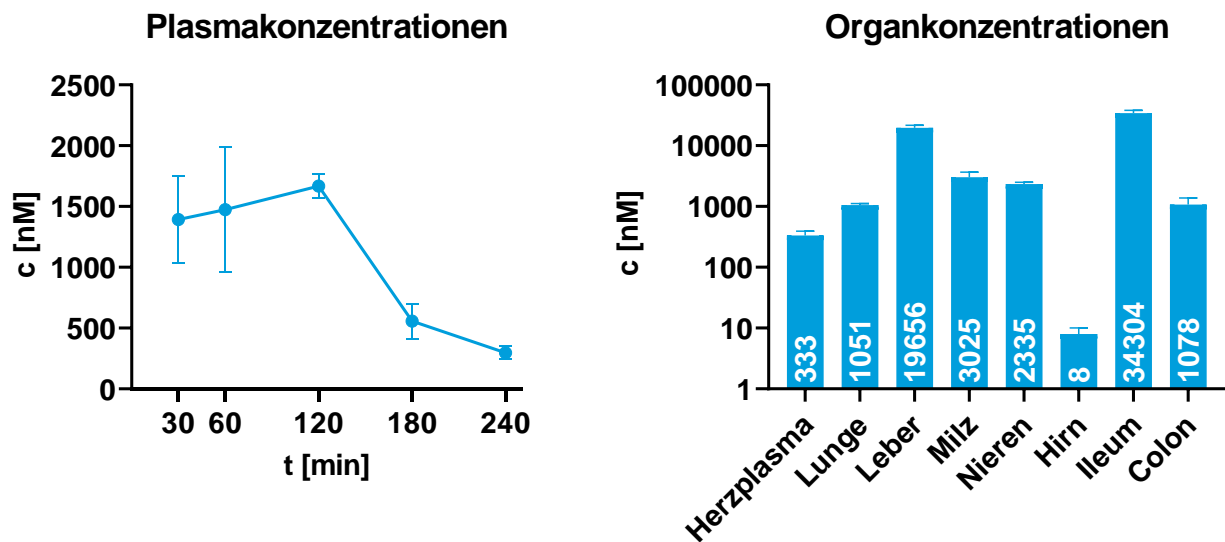


Abbildung 4.43: Konzentration (Mittelwert \pm SD) von **76** im Blut von C57BL/6 Mäusen nach p.o. Behandlung mit 24 $\mu\text{mol/kg}$ (links) bzw. in Organproben, die 4 h nach der Behandlung entnommen wurden (rechts). Wie die anderen vorgestellten Makrolidkonjugate reicherte sich die Substanz stark in peripheren Organen an, insbesondere in Leber und Ileum. $n = 3$.

Die PK-Eigenschaften von **76** entsprachen im Allgemeinen jenen der anderen Makrolidkonjugate (**Abbildung 4.43**). Der Stoff lag nach oraler Verabreichung über lange Zeit in hohen Konzentrationen im Plasma vor und erreichte nach 2 h einen Spitzenspiegel von $1,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$. In allen peripheren Organen war er zum Terminationszeitpunkt (4 h nach Behandlung) nachweisbar, vor allem in der Leber ($19,7 \pm 1,9 \mu\text{M}$) und im Ileum ($34,3 \pm 3,9 \mu\text{M}$). Interessanterweise lagen die im Colon gemessenen Konzentrationen deutlich niedriger ($1,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$); der Großteil der Absorption des Stoffes bzw. dessen Redistribution finden demnach im Dünndarm statt. Im ZNS wurden nur vernachlässigbar geringe Mengen an **76** gemessen, was sich ebenfalls mit den Daten der anderen Makrolide deckt.

Die in dieser Studie erhaltenen Organproben der Verumgruppe zeigten deutliche Anreicherung des Fluorophors, insbesondere in Lunge, Ileum, Niere und Leber (**Abbildung 4.44**). Wie schon bei den *in vitro* Experimenten konnte die Fluoreszenz von **76** deutlich im GFP-Messbereich beobachtet werden. Für die jeweiligen Organe waren klare Verteilungsmuster vorhanden: Z. B. reichte sich die Testverbindung im Ileum vorzugsweise an der Oberfläche der Mikrovilli an (**Abbildung 4.45**, rechts). In der Lunge war die Fluoreszenz an den Oberflächen der Epithelien am intensivsten (**Abbildung 4.45**, links). Überträgt man die Befunde auf gängige Makrolid-Antibiotika mit ähnlicher Pharmakokinetik, erklärt sich die gute Wirksamkeit bei Krankheitsbildern, die vor allem die oberen Zellschichten eines Gewebes betreffen (z.B. bei chronischen Atemwegs- oder Darmerkrankungen).

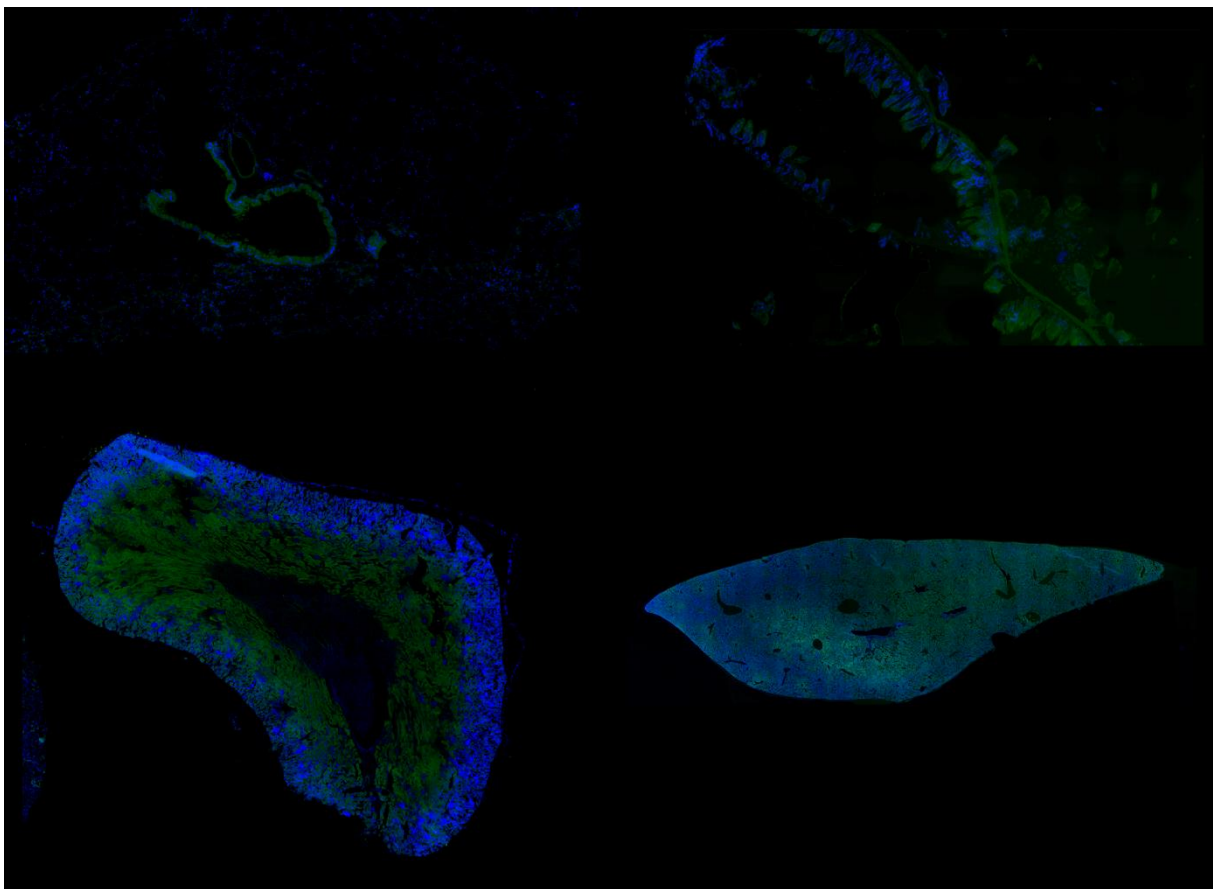


Abbildung 4.44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Organproben von mit **76** behandelten Tieren. Von oben links im Uhrzeigersinn: Lunge, Ileum, Leber, Niere. Die Testverbindung **76** fluoresziert grün, die Zellkerne wurden mit Hoechst blau eingefärbt. Die Aufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengesetzt, die mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden waren.

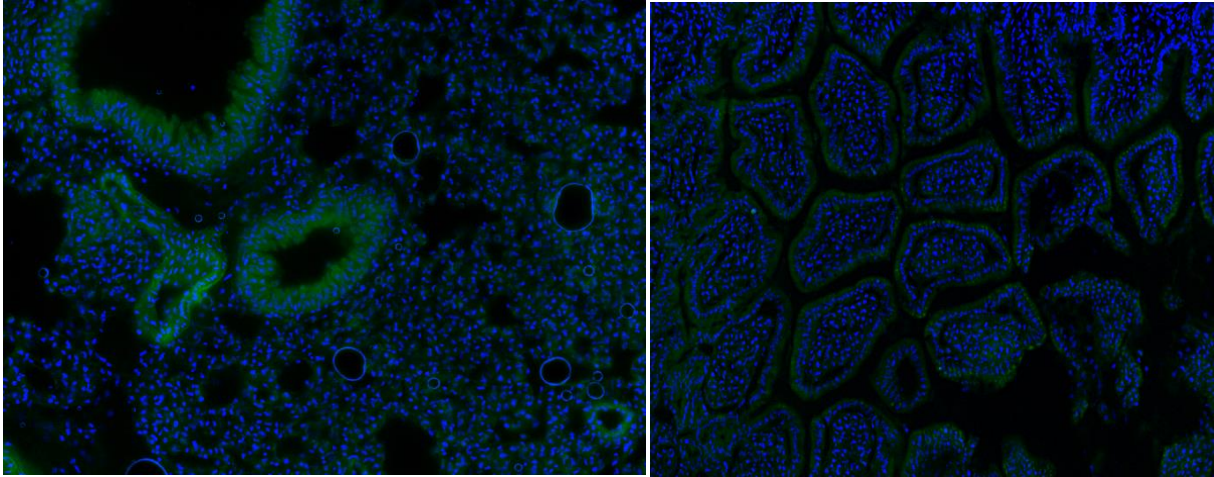


Abbildung 4.45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Lunge (links) bzw. Ileum (rechts) einer Maus, die mit **76** behandelt wurde. Die Testverbindung fluoresziert grün, Zellkerne wurden mit Hoechst blau gefärbt. Die Aufnahmen wurden bei zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen. Anreicherung in der Lunge ist besonders zur Epithelschicht hin zu beobachten. Im Ileum reicherte sich der Stoff vor allem auf der Oberfläche von Darmzotten an.

4.3.1.8 Fluoreszenzmikroskopie des Gewebes von mit JAK3-Hemmern behandelten Tieren

Nach dem Erfolg der mit **76** durchgeführten Studie wurde ein ähnliches Experiment mit den Testsubstanzen **13**, **18** sowie **38** ausgeführt. Die gleiche Dosis ($24 \mu\text{mol/kg}$) wurde verwendet, allerdings wurden die Tiere basierend auf den PK-Eigenschaften der Stoffe bereits nach 2 h statt nach 4 h terminiert.

Die Plasmakonzentrationen (**Abbildung 4.46**) der beiden Makrolide waren über den Verlauf der Studie hinweg stabil und passten zu den bisherigen Studien. **38** erreichte ca. zehnfach höhere Konzentrationen als das kürzer verlinkte **13**. Das nicht plasmastabile **18** war in den meisten Plasmaproben nur knapp ober- bzw. unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze, im Gegensatz zu den Organen.

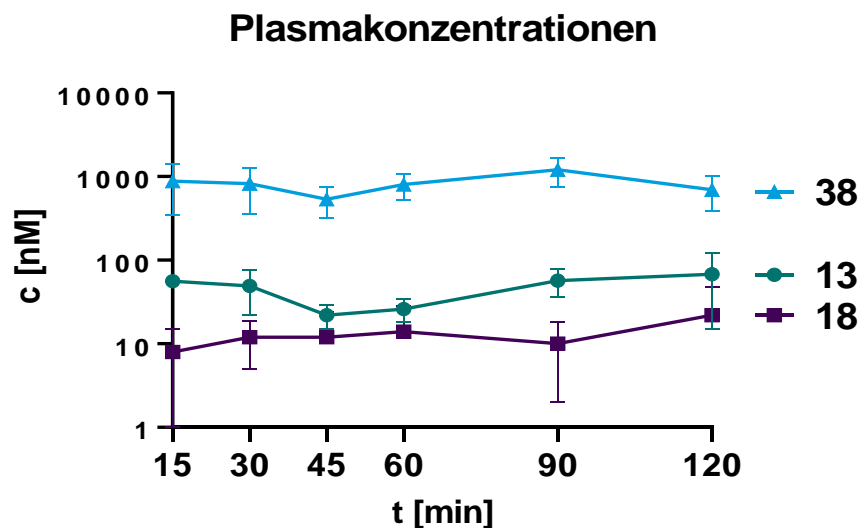


Abbildung 4.46: Konzentrationen von **13**, **18** und **38** im Plasma von C57BL/6 Mäusen nach Gabe von $24 \mu\text{mol/kg}$ p.o. ($n = 3$).

Die Testsubstanzen reichert sich in den typischen Mustern in hoher Konzentration in der Mehrheit der peripheren Organe an (**Abbildung 4.47**). Insbesondere **38** erreichte dabei ein- bis zweistellige mikromolare Werte in Herz, Lunge, Leber, Ileum und vor allem in der Milz und den Nieren. Das die BHS penetrierende **18** wurde zusätzlich in hoher Konzentration ($> 1 \mu\text{M}$) im Hirngewebe detektiert. **38** wurde ebenfalls im Hirngewebe vorgefunden, was für ein Molekül dieser Größe zunächst unwahrscheinlich erscheint. Die bereits an anderer Stelle aufgeführten Anmerkungen dazu sind auch hier zu bedenken.

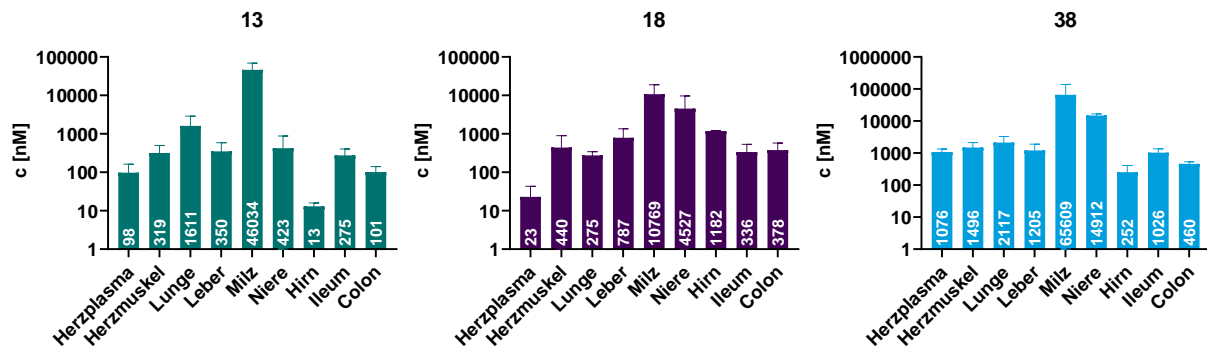


Abbildung 4.47: Konzentrationen von **13** (links), **18** (mittig) und **38** (rechts) in Organen von C57BL/6 Mäusen, 2 h nach Gabe von $24 \mu\text{mol/kg}$ p.o. ($n = 3$).

Für alle drei Substanzen fiel die Anreicherung im Ileum geringer aus als in früheren Studien (zum Vergleich: **13** lag in einer PK-Studie mit halber oraler Dosis selbst nach 8 h noch in einer Konzentration von ca. $19 \mu\text{M}$ vor). Grund hierfür könnten unterschiedlich vorangeschrittene Darmpassagen sein, die u.a. durch die verschiedenen Terminationszeitpunkte bedingt sind.

13 war vor allem in Herzmuskel, Lunge, Leber und Niere gut sichtbar, sowie in geringerer Intensität in Ileum und Milz (**Abbildung 4.48** und **4.49**). Die beobachteten Verteilungsmuster decken sich dabei überwiegend mit den quantitativen Daten aus der MS-Analyse. In der Lunge war vor allem um die Gefäße starke Fluoreszenz detektierbar. Das schwache Signal in der Milz (trotz hoher gemessener Stoffkonzentrationen) lässt sich ggf. durch die Aufnahmemethode erklären: Das Gewebe ist reich an Erythrozyten, die im gleichen Kanal deutliche Autofluoreszenz zeigen. Für die Aufnahmen der Verumgruppen wurde zunächst die Belichtungsintensität so angepasst, dass in den jeweiligen Organen der Vehikelgruppe keine Autofluoreszenz im GFP-Kanal mehr sichtbar war und dann bei gleicher Belichtung die Verumprobe mikroskopiert. Das Resultat ist ein relativ schwaches Signal in Organen mit von Natur aus starker Autofluoreszenz.

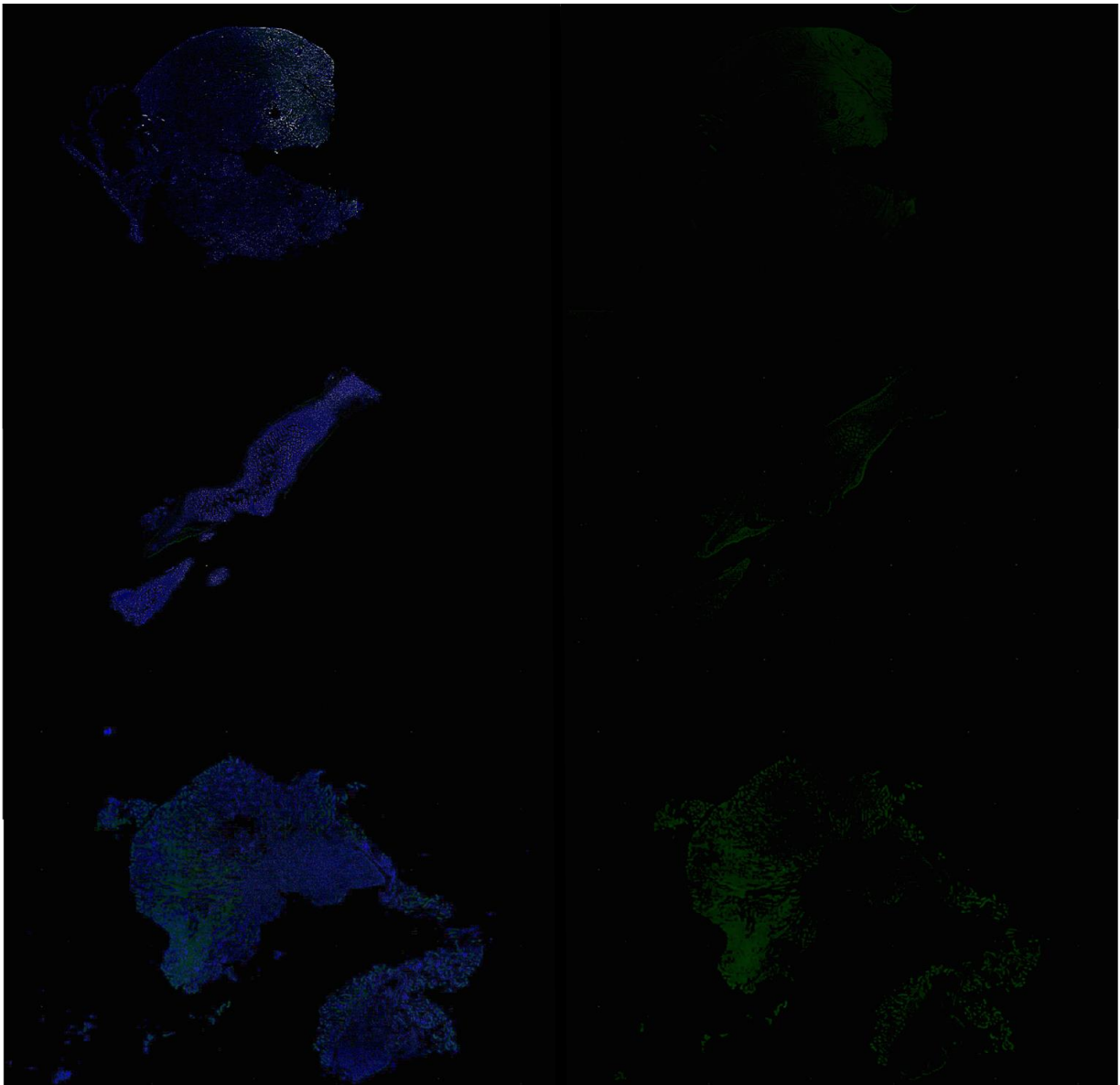


Abbildung 4.48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Herz (oben), Ileum (mittig) und Niere (unten) von mit **13** behandelten Tieren. Die linke Hälfte zeigt die überlagerten Signale des DAPI- (blau, Zellkerne) und GFP-Kanals (grün, **13**), die rechte nur den GFP-Kanal. Die Aufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengefügt, die mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden waren.



Abbildung 4.49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Leber (oben), Lunge (mittig) und Milz (unten) von mit **13** behandelten Tieren. Die linke Hälfte zeigt die überlagerten Signale des DAPI- (blau, Zellkerne) und GFP-Kanals (grün, **13**), die rechte nur den GFP-Kanal. Die Aufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengefügt, die mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden waren.

Auch **18** war in der Mehrheit der Organproben sichtbar fluoreszent (**Abbildung 4.50** und **4.51**), auch im Hirn. Wie schon bei **76** wurde in Proben des Ileums starke Anreicherung auf der Oberfläche der Darmzotten beobachtet. Im Gegensatz zu den Makroliden war die Verteilung im Lungengewebe eher diffus und weniger auf die Epithelien fokussiert.

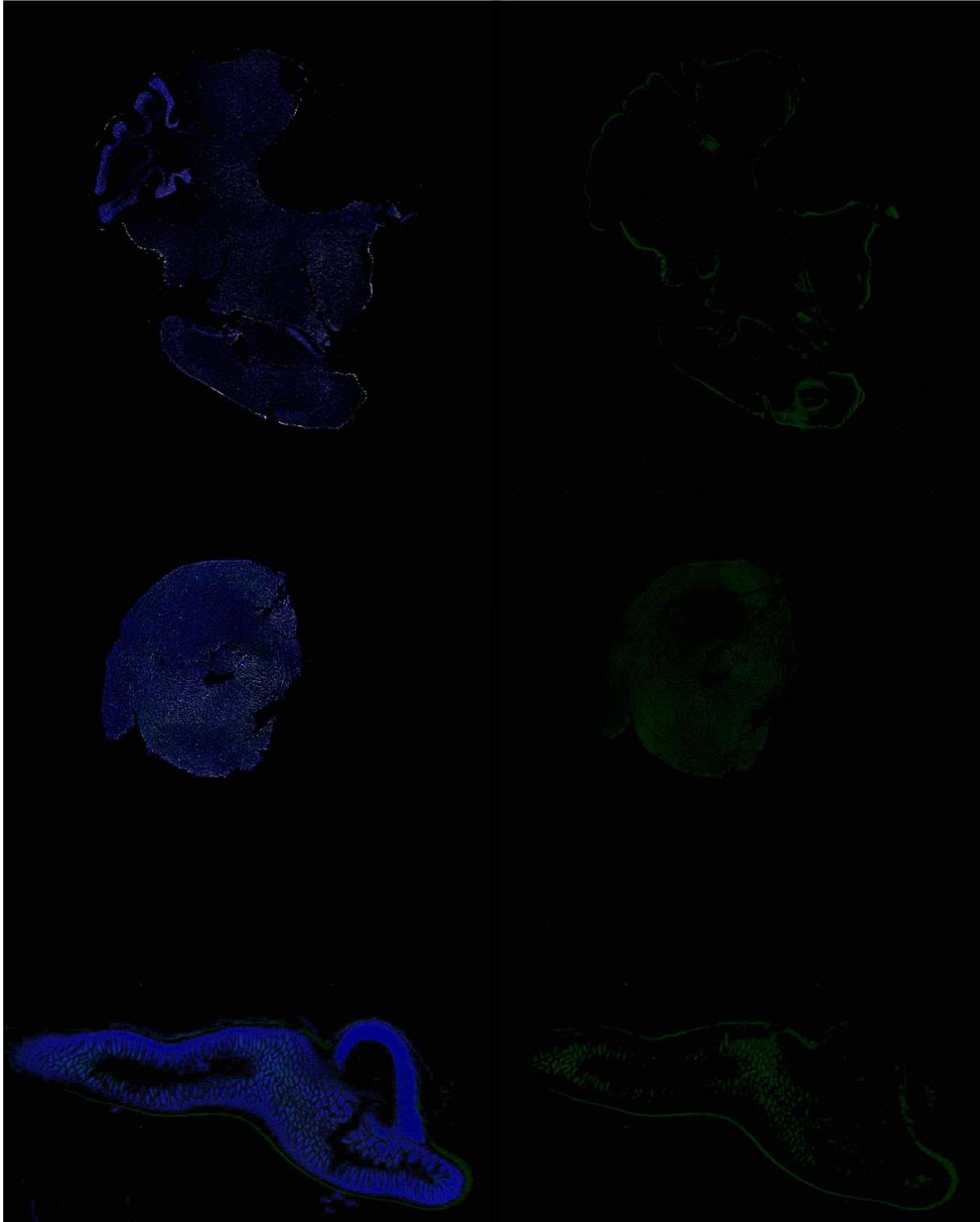


Abbildung 4.50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hirn (oben), Herz (mittig) und Ileum (unten) von mit **18** behandelten Tieren. Die linke Hälfte zeigt die überlagerten Signale des DAPI- (blau, Zellkerne) und GFP-Kanals (grün, **18**), die rechte nur den GFP-Kanal. Die Aufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengefügt, die mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden waren.

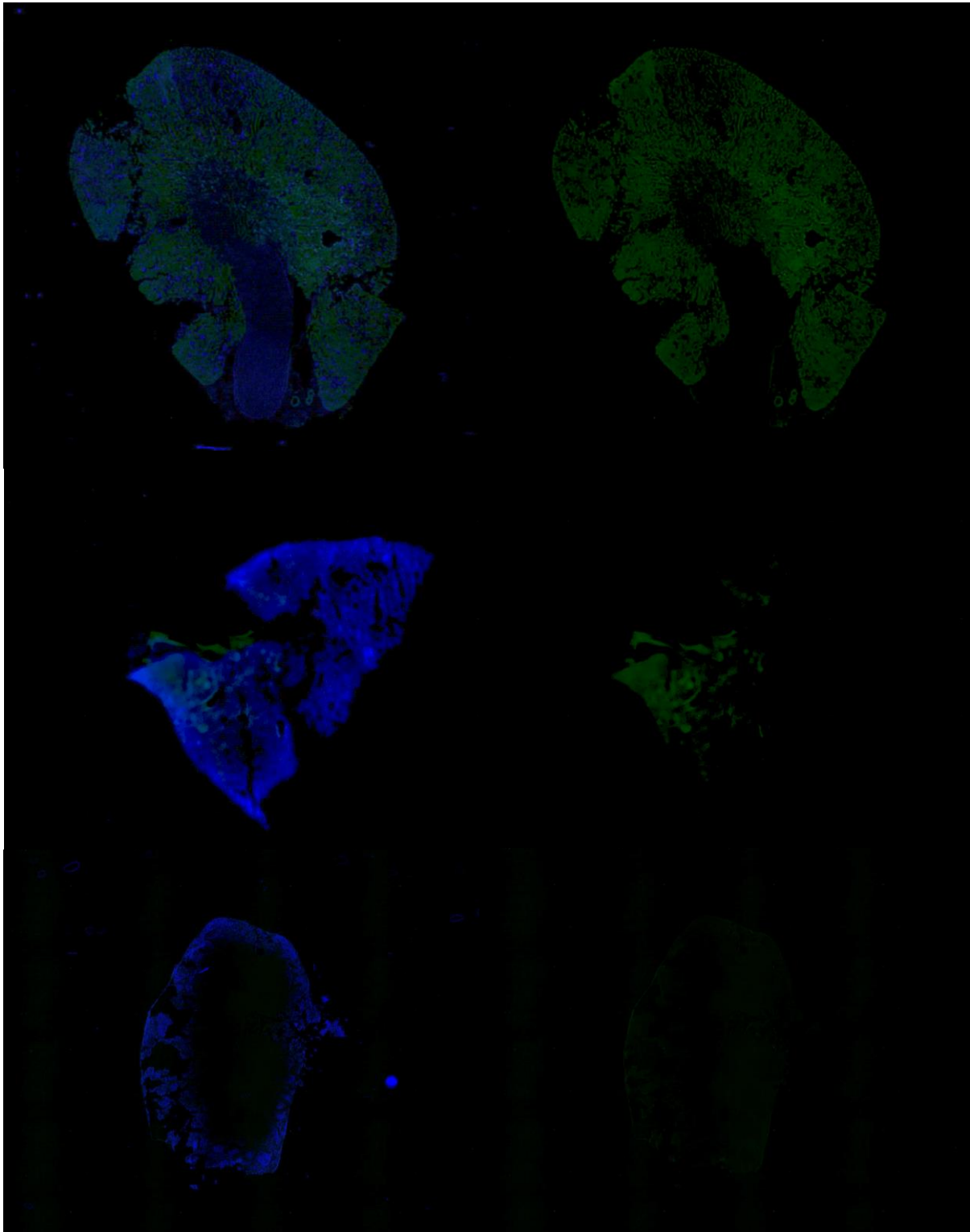


Abbildung 4.51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Niere (oben), Lunge (mittig) und Milz (unten) von mit **18** behandelten Tieren. Die linke Hälfte zeigt die überlagerten Signale des DAPI- (blau, Zellkerne) und GFP-Kanals (grün, **18**), die rechte nur den GFP-Kanal. Die Aufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengefügt, die mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden waren.

Das zweite getestete Makrolid, **38**, ähnelte im Verteilungsmuster dem verwandten **13** (**Abbildung 4.52** und **4.53**). Wie bereits erwähnt war die Anreicherung im Ileum unerwartet schwach verglichen mit früheren PK-Studien. Das Signal war dagegen besonders in der Niere intensiv. Interessanterweise wurden wie auch bei **13** nur die äußeren Bereiche der Leber eingefärbt, die weiter distal der Pfortader liegen.

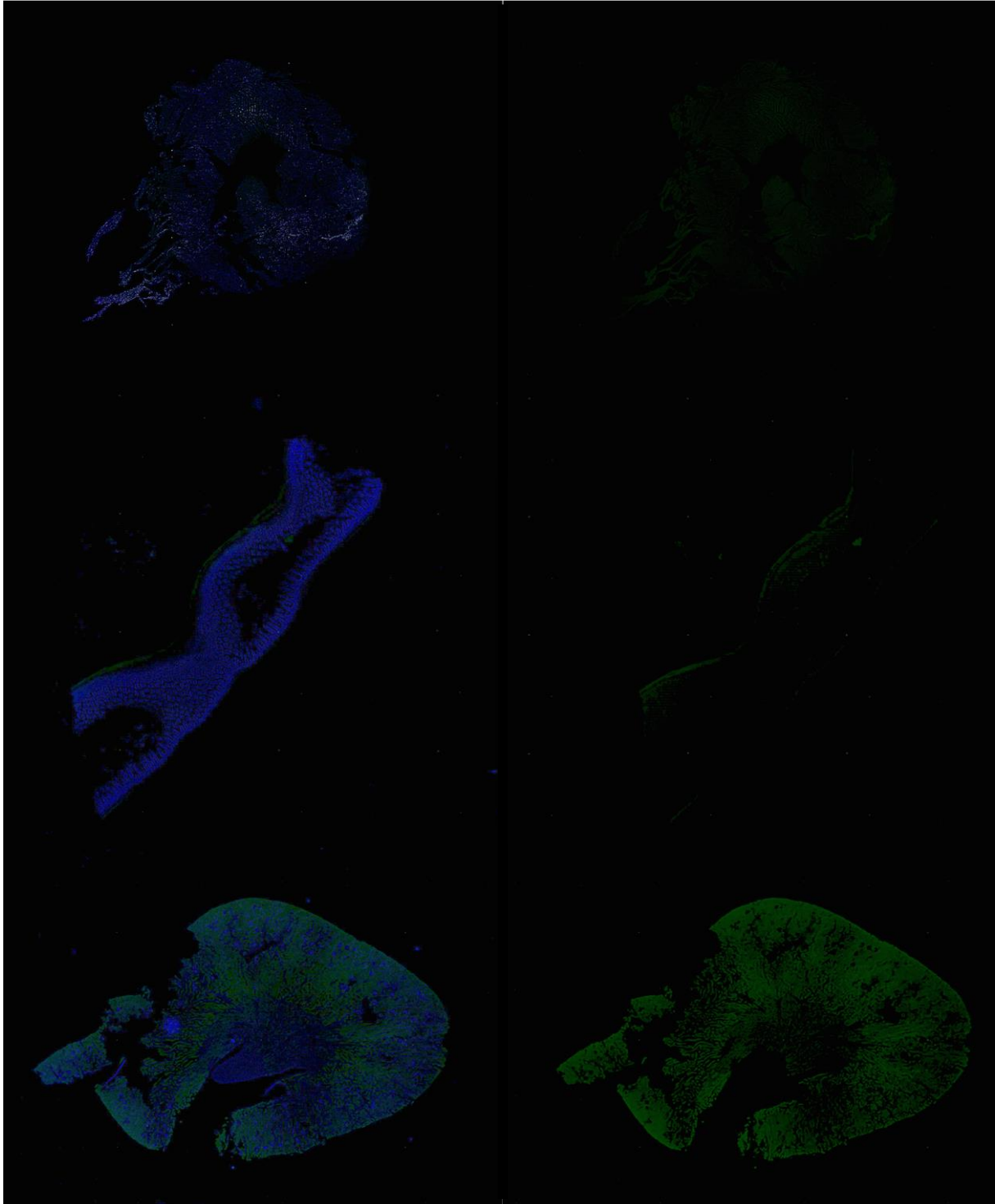


Abbildung 4.52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Herz (oben), Ileum (mittig) und Niere (unten) von mit **38** behandelten Tieren. Die linke Hälfte zeigt die überlagerten Signale des DAPI- (blau, Zellkerne) und GFP-Kanals (grün, **38**), die rechte nur den GFP-Kanal. Die Aufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengefügt, die mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden waren.

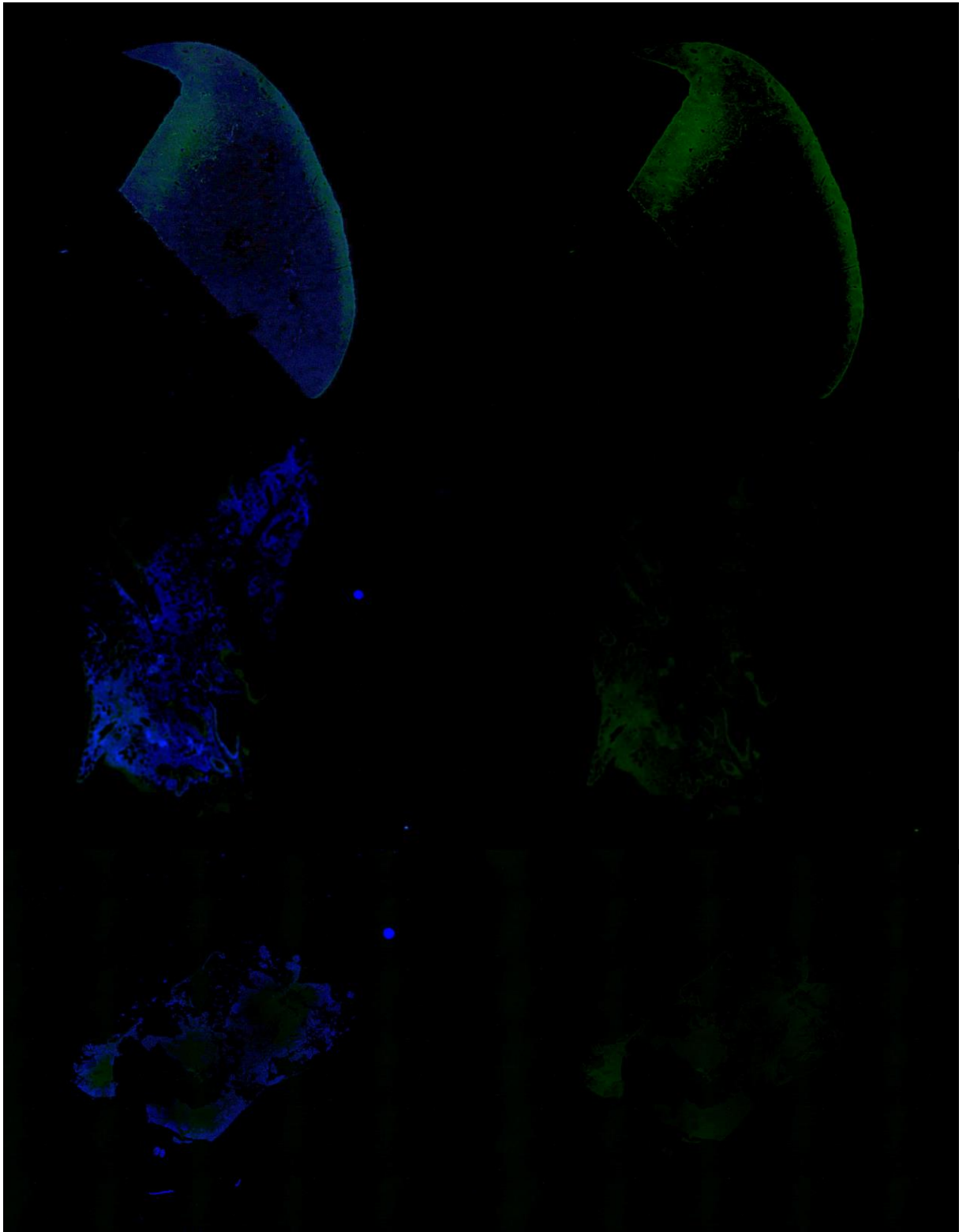


Abbildung 4.53: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Leber (oben), Lunge (mittig) und Milz (unten) von mit **38** behandelten Tieren. Die linke Hälfte zeigt die überlagerten Signale des DAPI- (blau, Zellkerne) und GFP-Kanals (grün, **38**), die rechte nur den GFP-Kanal. Die Aufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengefügt, die mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden waren.

4.3.2 LPS challenge Modell

Die Zellwand gramnegativer Bakterien enthält große Mengen an Lipopolysacchariden (LPS). Diese werden von für die Erkennung von Pathogenen verantwortlichen Pattern Recognition Receptors (PRR) detektiert, genauer gesagt dem TLR4. Stimulation des TLR4 löst eine Immunreaktion aus, die überwiegend auf Zellen der angeborenen Immunität beruht. Der TLR4-Signalweg kann so genutzt werden, um durch Einsatz von LPS eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, beispielsweise in Modellen zur Charakterisierung neuer antiinflammatorischer Substanzen.¹⁴⁶ Diese Modelle sind insofern relevant, dass sowohl der TLR-Signalweg als auch die Zellen der angeborenen Immunantwort eine bedeutende Rolle bei der Entstehung bzw. dem Fortschreiten verschiedener Autoimmunerkrankungen spielen.^{147–149}

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Testverbindungen wurden alle, wie bereits erwähnt, zunächst *in vitro* auf ihre antiinflammatorische Potenz untersucht (Kapitel 4.2.3). Eine Auswahl von ihnen wurde weiterführend *in vivo* im sogenannten *LPS Challenge* Modell getestet: BALB/c Mäusen wurde intraperitoneal LPS injiziert, um eine Entzündungsreaktion hervorzurufen und zu festgelegten Zeiträumen Blut bzw. Plasma entnommen, um die Konzentration an $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-10 zu bestimmen. Alternativ zur Gabe einer (höheren) Dosis LPS alleine kann dieses auch in niedrigerer Dosis (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ statt 10 mg/kg) zusammen mit Galactosamin verabreicht werden. Letzteres verstärkt den proinflammatorischen Stimulus deutlich. Beide Induktionsmethoden wurden bei den durchgeführten Studien erprobt und führten zu vergleichbaren Ergebnissen, wie anhand der Zytokinspiegel der Vehikelgruppen festgestellt wurde.

Die Behandlung mit den Testsubstanzen erfolgte präventiv schon vor der LPS-Injektion entweder i.v. oder p.o. in Abhängigkeit der geplanten Studie.

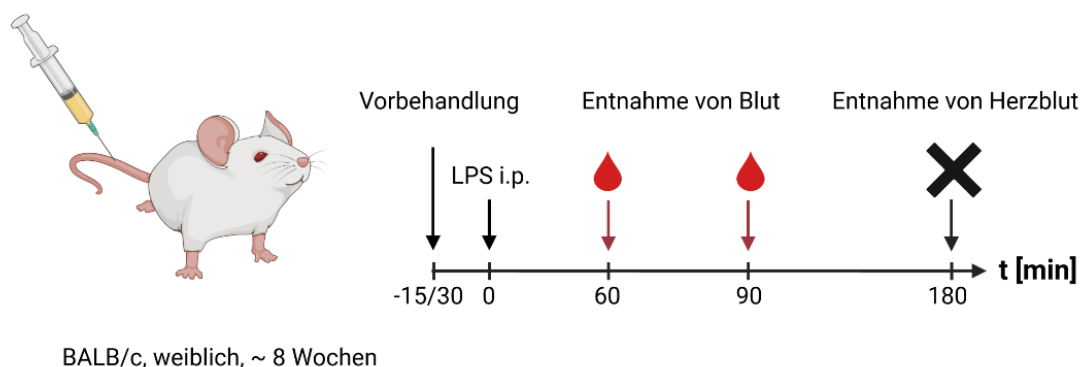


Abbildung 4.54: Schematischer Ablauf des „LPS Challenge“ Modells: Weibliche BALB/c Mäuse wurden entweder i.v. oder p.o. mit den Testsubstanzen oder Vehikel vorbehandelt. Nach 15 bzw. 30 min wurde LPS bzw. LPS/Galactosamin ins Peritoneum injiziert, um den Entzündungsreiz auszulösen. 60, 90 und 180 min nach der LPS-Injektion wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen, zentrifugiert und der Zytokingehalt im Plasma bestimmt. Nach dem 180 min Zeitpunkt wurden die Tiere euthanasiert und Herzblut entnommen.

Auch wenn das Modell eine relativ unaufwändige Möglichkeit bietet, die entzündungshemmende Wirksamkeit neuer Wirkstoffe zu vergleichen, sind die Ergebnisse nur bedingt auf chronische Erkrankungen beim Menschen übertragbar. Die durch LPS ausgelöste Immunreaktion umfasst vor allem die angeborene (v.a.

myeloische) Immunantwort, während bei chronischen Autoimmunerkrankungen auch lymphatische Zellen eine bedeutende Rolle spielen können. Zudem wird nur die Effektivität bei der Bekämpfung eines einzelnen proinflammatorischen Stimulus untersucht anstelle eines längerfristigen Entzündungsgeschehens.

4.3.2.1 Etablierungsstudie:

Zunächst wurde eine Etablierungsstudie zur Optimierung des Verfahrens, inklusive der Zeitpunkte zur Blutentnahme, mit dem Makrolid-Konjugat **13** durchgeführt. Dieses wies sowohl die erwünschten pharmakokinetischen Eigenschaften als auch ausreichende *in vitro* Aktivität auf. Behandelt wurde mit 8,5 $\mu\text{mol/kg}$ (entspricht 10 mg/kg) p.o., 15 min vor Injektion der LPS-Lösung.

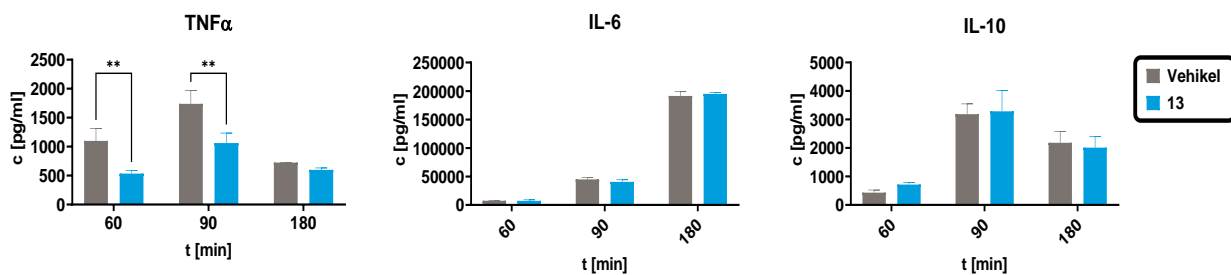


Abbildung 4.55: Plasmaspiegel \pm SD von TNF α (links), IL-6 (mittig) und IL-10 (rechts) von BALB/c Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg LPS. Die Vorbehandlung der Tiere mit 8,5 $\mu\text{mol/kg}$ **13** p.o. führte zu signifikant verringerter Freisetzung von TNF α während der ersten 90 min. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Die gewählten Blutungszeitpunkte von 60, 90 und 180 min nach LPS-Injektion erwiesen sich als geeignet zur Erstellung eines „Zytokinprofils“ der zu testenden Substanzen. TNF α wurde schon eine Stunde nach dem LPS-Stimulus in hohen Konzentrationen freigesetzt und erreichte seinen Höhepunkt nach ca. 90 min. Zum 180 min Zeitpunkt waren die Konzentrationen in beiden Gruppen schon wieder deutlich gesunken. In den meisten späteren Studien waren die TNF α -Werte zu diesem Zeitpunkt wieder mit denen unbehandelter Tiere vergleichbar und es bestanden keine relevanten Unterschiede mehr zwischen den Gruppen; für die Diskussion der TNF α -Konzentrationen sind demnach nur die ersten beiden Zeitpunkte von Bedeutung. Das ebenfalls proinflammatorische Zytokin IL-6 wurde verzögert und in kontinuierlich steigenden Konzentrationen freigesetzt, die höchsten Konzentrationen wurden zum dritten und letzten Blutungszeitpunkt (180 min) gemessen. IL-10 wurde im Vergleich zu TNF α verzögert freigesetzt, erreichte aber ebenfalls 90 min nach LPS-Gabe seine Höchstwerte. Die Konzentrationen waren zu $t = 180$ min jedoch immer noch hoch.

Mit **13** vorbehandelte Tiere wiesen während der ersten beiden Blutungszeitpunkte signifikant verringerte Konzentrationen an TNF α in ihrem Plasma auf ($p < 0,01$). Auch *in vitro* war die Substanz ein potenter Hemmer der TNF α -Freisetzung nach LPS-Stimulus (Kapitel **4.2.3**).

13 hatte bei keinem der erfassten Zeitpunkte einen Effekt auf die Freisetzung von IL-6 und IL-10, die gemessenen Konzentrationen entsprachen in etwa denen der Vehikelgruppe. Dieser Befund deckte sich mit den zurzeit vorliegenden Ergebnissen aus den *in vitro* Experimenten mit LPS, wo **13** ebenfalls nicht die Spiegel der beiden Zytokine beeinflusste. Wie sich in späteren Studien noch zeigen sollte (s.u.), kann die Behandlung mit höheren Dosen der JAK3-Hemmer (bzw. anderen Applikationsrouten) aber durchaus einen Einfluss auf die Freisetzung dieser Zytokine haben.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Vorbehandlung von Tieren mit Tofacitinib vor LPS-Injektion ebenfalls die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ (und IL-6) potent senkt, während die IL-10 Spiegel im Plasma gesteigert werden.¹⁵⁰ Wie bereits erwähnt konnten die Senkung der IL-6 Konzentrationen und die Steigerung der IL-10-Freisetzung auch bei den in späteren Studien getesteten Substanzen (s.u.) beobachtet werden. Der durch LPS aktivierte TLR4-Rezeptor signalisiert nicht direkt über die JAKs; der Einfluss der JAK-Hemmer auf das resultierende Zytokinprofil legt aber nahe, dass auch JAK-abhängige Zytokinrezeptoren in die von LPS hervorgerufene Signalkaskade involviert sind. Durch nachgeschaltete parakrine Signalwege der betroffenen Immunzellen ist das Gesamtgeschehen von hoher Komplexität. Beispielweise kommt es über $\text{Nf}\kappa\text{B}$ und andere Transkriptionsfaktoren u.a. zur Bildung und Freisetzung von Interferon α und β , welche ihr Signal über JAK1/TYK2-abhängige Rezeptoren weitertragen. Über $\text{Nf}\kappa\text{B}$ wird ebenfalls die Ausschüttung von IL-2 und IL-21, an deren Rezeptoren JAK1/JAK3-Dimere assoziieren, angeregt, sowie die Transkription zahlreicher weiterer proinflammatorischer Gene.^{23,151,152}

Das Verhältnis an freigesetztem IL-10 zu $\text{TNF}\alpha$ (**Abbildung 4.56**) stellt einen weiteren Parameter dar, um die antiinflammatorische Potenz eines Wirkstoffes im LPS-Modell einzuschätzen. Zu allen Zeitpunkten lag der Quotient für die Verumgruppe höher als für die Vehikelgruppe, bei $t = 60$ und $t = 90$ min waren die Unterschiede statistisch signifikant ($1,3 \pm 0,2$ vs. $0,4 \pm 0,1$, $p < 0,05$ bzw. $3,3 \pm 1,3$ vs. $1,3 \pm 0,2$, $p < 0,0001$). Die Annäherung der Verhältnisse zu $t = 180$ min entspricht dem Umstand, dass die $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel zu diesem Zeitpunkt wieder weitestgehend gesunken waren und nur noch geringfügige Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden, wie es auch in den nachfolgenden Studien beobachtet wurde.

Verhältnis IL10/ $\text{TNF}\alpha$

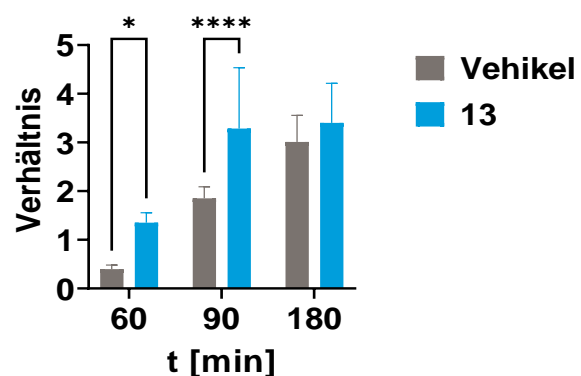


Abbildung 4.56: Verhältnis der gemessenen Plasmakonzentrationen von IL-10 und $\text{TNF}\alpha$ in mit Vehikel oder **13** sowie LPS behandelten BALB/c Mäusen. Für $t = 60$ bzw. 90 min waren die Zytokinverhältnisse signifikant unterschiedlich zur Vehikelgruppe. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Zusammengefasst führte die Behandlung mit **13** vor allem innerhalb der ersten 90 min nach LPS-Injektion zu einer deutlichen Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung und verschob das Verhältnis von IL-10 zu $\text{TNF}\alpha$ stärker in Richtung des antiinflammatorischen Zytokins.

4.3.2.2 P.o. Studie I:

In einer Folgestudie wurden weitere Testsubstanzen oral verabreicht. Die Dosis wurde auf 15 $\mu\text{mol/kg}$ festgelegt und das Behandlungsintervall auf 30 min vor der LPS-Gabe erhöht. Getestet wurden neben **FM-381** zwei pharmakokinetisch verbesserte Analoga, das Cyclopropyl-substituierte **29** und das Makrolid-Konjugat **38**. Beide zeigten zwar geringere Aktivität gegen die JAK3 *in vitro*, aber eine verbesserte Stabilität *in vivo*. **18** wurde wegen seines Status als Kandidat für ZNS-Erkrankungen ausgewählt, da es in PK-Studien gute Hirngängigkeit aufwies. Zusätzlich wurden Tofacitinib und Ruxolitinib als Vergleichssubstanzen eingesetzt, um die Auswirkungen der unterschiedlichen Selektivitäten auf das Zytokinprofil zu erforschen.

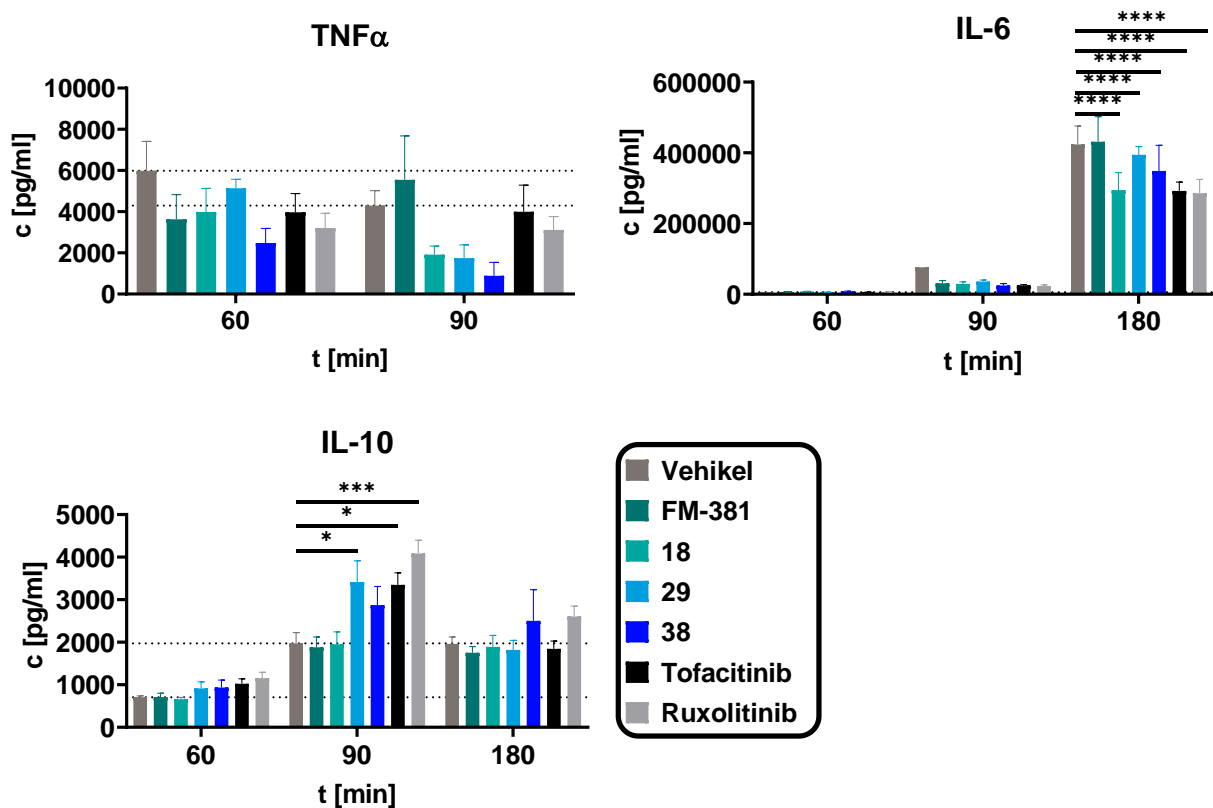


Abbildung 4.57: Plasmaspiegel \pm SEM von TNF α (oben links), IL-6 (oben rechts) und IL-10 (unten links) zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg LPS. Die gepunkteten Linien entsprechen den durchschnittlichen Konzentrationen der Vehikelgruppen. Die Vorbehandlung von Mäusen mit 15 $\mu\text{mol/kg}$ der JAK-Hemmer p.o. führte in den meisten Gruppen zu reduzierter Ausschüttung von TNF α und IL-6, während die IL-10 Konzentrationen im Plasma gleichblieben oder anstiegen. $n = 4$ (Vehikel) bzw. $n = 8$ (Verumgruppen). Nicht gezeigt ist $t = 180$ min für TNF α , da die Konzentrationen in allen Gruppen an bzw. unter der Nachweisgrenze waren. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Die Vorbehandlung der Tiere mit JAK-Inhibitoren führte sowohl mit den JAK3-Hemmern als auch mit den Vergleichssubstanzen Tofacitinib und Ruxolitinib zu einer Senkung der TNF α -Konzentrationen im Plasma. Zu $t = 90$ min war der Effekt stärker ausgeprägt, besonders für **18**, **29** und **38**. So konnte durch Gabe des Makrolids **38** die TNF α -Konzentration von $4,3 \pm 1,3$ ng/ml auf $0,9 \pm 1,8$ ng/ml gesenkt werden. Leider waren die Ergebnisse in keiner der Gruppen statistisch signifikant, was

wahrscheinlich auf die reduzierte Zahl der Vehikeltiere und die große Streuung in dieser Gruppe zurückzuführen ist. Auch die für **FM-381** gemessenen Werte waren bei beiden Zeitpunkten sehr heterogen, lagen im Schnitt aber im Bereich der anderen Gruppen (60 min) bzw. darüber (90 min). Sowohl mit Tofacitinib als auch Ruxolitinib wurde eine moderate Senkung der TNF α -Freisetzung erreicht, im Schnitt war diese aber für t = 90 min geringer ausgeprägt als bei den JAK3-Hemmern **18**, **29** und **38**.

Aufgrund technisch bedingter Umstände war für die t = 60 bzw. t = 90 min Zeitpunkte nur jeweils eine Plasmaprobe zur Bestimmung von IL-6 auswertbar, weswegen eine sinnvolle statistische Auswertung dieses Parameters leider nicht möglich war. Die durchschnittlichen Konzentrationen im Plasma der behandelten Tiere lagen alle niedriger als der Vehikelwert. Der niedrigste IL-6 Spiegel zu t = 90 min wurde durch Behandlung mit Ruxolitinib erzielt ($23,4 \pm 9,7$ ng/ml). Für den letzten Zeitpunkt (180 min nach LPS i.p.) war die IL-6 Senkung durch **18**, **29**, **38** sowie durch Tofacitinib und Ruxolitinib gegenüber dem Vehikel statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Auch zu diesem Zeitpunkt erwies sich Ruxolitinib als am effektivsten zur Senkung von IL-6 (von $423,5 \pm 104,7$ ng/ml auf $287,4 \pm 118,9$ ng/ml). Für **FM-381** konnte dagegen keine verringerte IL-6 Freisetzung mehr beobachtet werden.

Bezüglich der Ausschüttung von IL-10 bestanden zwischen den Gruppen innerhalb der ersten 60 min nur geringfügige Unterschiede. Die mit **29**, **38** und Tofacitinib oder Ruxolitinib behandelten Tiere wiesen zwar leicht erhöhte IL-10 Spiegel im Plasma auf, die Anstiege waren aber im Vergleich zur Vehikelgruppe nicht statistisch signifikant. Zum zweiten Blutungszeitpunkt (90 min nach LPS-Stimulus) wurden die Auswirkungen dieser vier Substanzen deutlicher, während **FM-381** und **18** keinen Effekt auf die IL-10 Konzentrationen hatten. Der stärkste Anstieg wurde durch Ruxolitinib verzeichnet (von $2,0 \pm 0,4$ ng/ml auf $4,1 \pm 0,9$ ng/ml) und war statistisch signifikant ($p < 0,001$), gefolgt von **29** und Tofacitinib. Zum dritten Blutungszeitpunkt wurden, möglicherweise durch bereits sinkende Wirkstoffkonzentrationen, vergleichsweise geringere IL-10 Steigerungen gemessen; nur noch bei den mit **38** oder Ruxolitinib behandelten Mäusen unterschieden sich die Werte von der Referenz.

Zusammengefasst erwiesen sich in dieser Studie vor allem die pharmakokinetisch optimierten JAK3-Hemmer **29** und **38** (sowie die Kontrollsubstanzen) als antiinflammatorisch wirksam. Die erhöhte Wirksamkeit gegenüber **FM-381** trotz geringerer *in vitro* Aktivität legt nahe, dass hier vor allem die verbesserte *in vivo* Stabilität und Aufnahme bzw. Verteilung eine dominante Rolle spielen.

4.3.2.3 P.o. Studie II

Eine weitere p.o. Studie wurde mit den Bicyclo[3.1.0]-substituierten Testverbindungen **40-43** durchgeführt, bei der diese mit zwei ihrer Cyclohexyl-Analoga, **FM-381** und **21** sowie dem Makrolidkonjugat **39** verglichen wurden. Dosis, Behandlungszeitpunkt und -Art wurden von der vorigen Studie übernommen. Ferner wurden zwei Gruppen mit unterschiedlichen Dosen an Tofacitinib eingeschlossen, um die Effekte einer niedrigen Dosis ($1,5 \mu\text{mol/kg}$) des Stoffes zu erforschen.

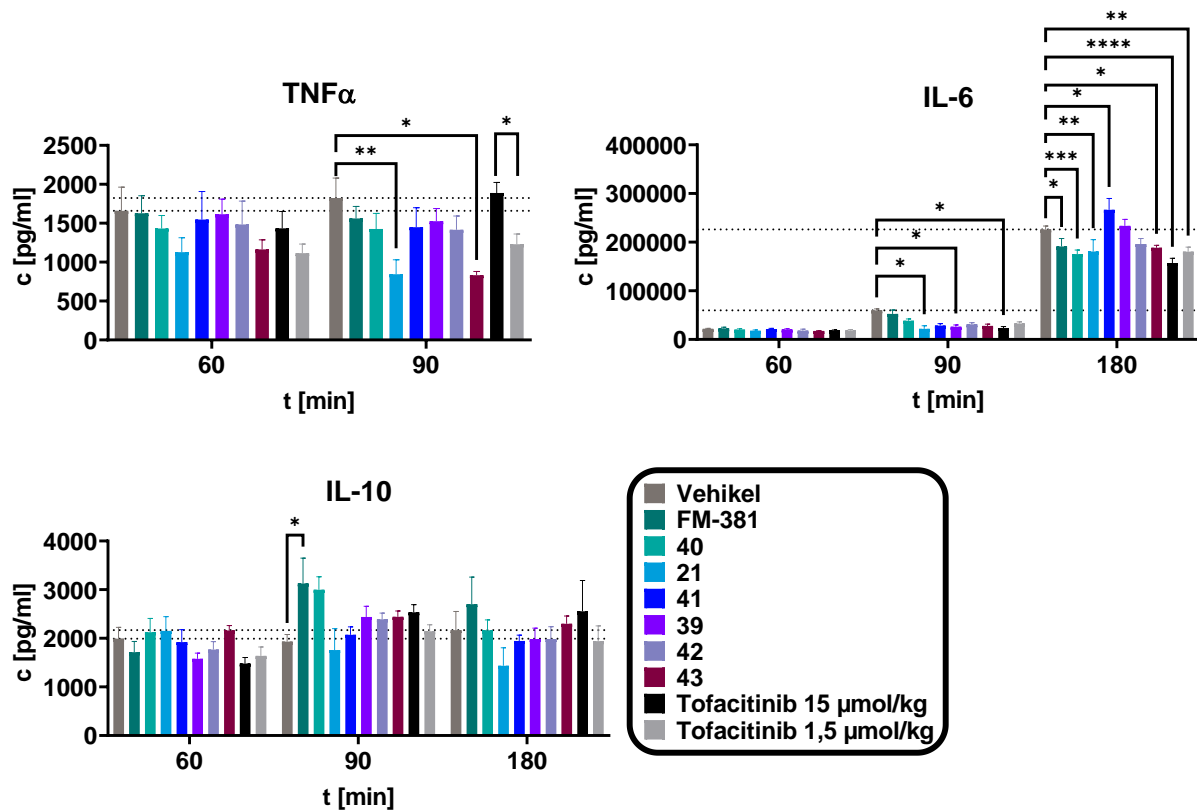


Abbildung 4.58: Plasmaspiegel \pm SEM von $TNF\alpha$ (oben links), $IL-6$ (oben rechts) und $IL-10$ (unten links) zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg LPS. Die gepunkteten Linien entsprechen den durchschnittlichen Konzentrationen der Vehikelgruppen. Die Vorbehandlung von Mäusen mit 15 μ mol/kg der JAK-Hemmer p.o. führte in den meisten Gruppen zu reduzierter Ausschüttung von $TNF\alpha$ und $IL-6$, während die $IL-10$ Konzentrationen im Plasma gleichblieben oder anstiegen. $n = 8$. Nicht gezeigt ist $t = 180$ min für $TNF\alpha$, da die Konzentrationen in allen Gruppen vernachlässigbar gering waren. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Wie schon in vorigen Studien führte die Verabreichung von JAK-Hemmern vor dem LPS-Stimulus zu geringeren resultierenden Plasmakonzentrationen an $TNF\alpha$. Als dafür effektivste JAK3-Inhibitoren erwiesen sich zu den ersten beiden Blutungszeitpunkten das Morpholinamid **21** ($1,1 \pm 0,5$ ng/ml nach 60 min, $0,8 \pm 0,5$ ng/ml nach 90 min, $p < 0,01$), und das Bicyclo[3.1.0]hexyl-substituierte Makrolid **43** ($1,2 \pm 0,3$ ng/ml nach 60 min, $0,8 \pm 0,1$ ng/ml nach 90 min, $p < 0,05$). **21** zeigte sich dabei auch wesentlich effektiver als sein stabileres, aber *in vitro* weniger potentes Analogon **41**. Der umgekehrte Effekt, wenn auch schwächer ausgeprägt, wurde für das Paar **FM-381/40** beobachtet: Mit **40** behandelte Tiere hatten niedrigere $TNF\alpha$ -Spiegel im Plasma als jene, die **FM-381** verabreicht bekamen.

Generell war die Wirksamkeit der JAK3-Hemmer im Verhältnis zur letzten Studie scheinbar geringer. Zu beachten ist allerdings auch, dass die Tiere insgesamt auch weniger stark auf den LPS-Stimulus reagierten, wie an der absoluten Konzentration an $TNF\alpha$ der Vehikelgruppe ersichtlich ist (< 2 ng/ml zu beiden Blutungszeitpunkten, ca. 5-6 ng/ml in der vorigen Studie). Die Gründe dafür können sowohl bei der verwendeten LPS-Batch, deren Formulierung als auch bei den Tieren selbst liegen und sind nur schwer nachverfolgbar. Interessanterweise war die niedrigere Dosis Tofacitinib (die einem Zehntel der anderen Dosen entsprach) zur $TNF\alpha$ -Senkung effektiver als die Standarddosis ($p < 0,05$ nach 90 min). Sie entspricht, bezogen auf das jeweilige

Körpergewicht, auch eher der beim Menschen angewandten Dosis. Beim Einsatz der 15 µmol/kg Dosis treten möglicherweise bereits off-target Effekte auf, die der TNF α -Senkung entgegenstehen. Auch die stärkere Blockade des (antiinflammatorischen) IL-10 Signalwegs, der von JAK1/TYK2 abhängt, ist als Erklärung in Betracht zu ziehen.

Die IL-6 Freisetzung konnte durch die Mehrheit der Testsubstanzen beeinflusst werden, was sich vor allem in den bei t = 180 min gemessenen Konzentrationen äußerte: Bis auf **41**, das ungewöhnlicherweise zum Anstieg von IL-6 führte, führte die Behandlung mit den JAK-Hemmern in allen Gruppen zu einer Senkung. Die Unterschiede zum Vehikel waren von verschiedengradiger statistischer Signifikanz ($p < 0,05$ für **FM-381** und **43**; $p < 0,005$ für **21** und 1,5 µmol/kg Tofacitinib; $p < 0,001$ für **40**; $p < 0,0001$ für 15 µmol/kg Tofacitinib). Auch bei der vorigen Studie waren die Unterschiede zur Vehikelgruppe beim letzten Blutungszeitpunkt ausgeprägter als schon nach 90 min, da die IL-6 Produktion bzw. Freisetzung in Vergleich zu den anderen gemessenen Zytokinen verzögert stattfinden. Insgesamt erwiesen sich **21** und Tofacitinib (15 µmol/kg) in Bezug auf IL-6 als am effektivsten.

Die gemessenen IL-10 Spiegel waren, anders als bei der vorigen Studie, nur für bestimmte Substanzen und Zeitpunkte erhöht: Zu t = 60 min kam es sogar in einigen behandelten Gruppen zu einer relativen Senkung der Konzentrationen. Am 90 min Zeitpunkt wurde in allen mit JAK-Hemmern behandelten Gruppen, mit Ausnahme der **21**-Gruppe, eine gesteigerte Freisetzung von IL-10 gemessen, vor allem für **FM-381** und sein Bicyclo[3.1.0]hexyl-substituiertes Analogon **40**. Der Anstieg war aber nur für die mit **FM-381** behandelten Tiere statistisch signifikant (von $1,9 \pm 0,4$ ng/ml auf $3,1 \pm 1,5$ ng/ml, $p < 0,05$). Zum letzten Blutungszeitpunkt normalisierten sich die Werte in den meisten Gruppen wieder.

Zusammengefasst konnten die Bicyclo[3.1.0]hexan-Derivate trotz erhöhter *in vivo* Halbwertszeit keine eindeutig überlegene Wirksamkeit gegenüber den Vorgängersubstanzen demonstrieren. Zudem erwies sich die niedrigdosierte Vorbehandlung mit Tofacitinib als effektiver als die Standarddosis. Generell sind die Ergebnisse aber aufgrund des schwächeren Ansprechens der Mäuse auf den LPS-Reiz, verglichen mit der vorigen Studie, kritisch zu betrachten

4.3.2.4 I.v. Studie

Um die Wirksamkeit der Testsubstanzen innerhalb des Modells unabhängig von ihrer oralen Bioverfügbarkeit zu vergleichen, wurde eine Studie mit intravenöser Applikation der Testsubstanzen durchgeführt. Behandelt wurde erneut 30 min vor der Injektion einer LPS/GaIN Lösung, die Dosis der JAK-Inhibitoren betrug 9,6 µmol/kg. Als Behandlung wurde **FM-381** mit den Analoga **13**, **18**, **22**, **26**, **29**, **30** und **50** sowie Tofacitinib und Ruxolitinib verglichen. Wie bereits unter Kapitel **4.1.** angeführt handelt es sich bei **29** und **30** um weniger potente, aber *in vivo* deutlich stabilere **FM-381**-Abkömmlinge, während **18** vor allem durch seine hohe Aufnahme in periphere Organe und das ZNS auffiel. **13** stellt das Makrolid-Analogon zu **FM-381** dar und besitzt im Vergleich eine verbesserte Pharmakokinetik. **22** und **26** sind weitere Vertreter mit von **FM-381** abweichenden Seitenketten in der Selektivitätstasche (Difluorocyclohexan bzw. Methylcyclopropan. Zu guter Letzt handelt es sich bei **50** um ein Derivat von **FM-381**, bei dem die Doppelbindung des Michael-Akzeptors reduziert wurde. Es ist

demnach nicht mehr elektrophil und besitzt stark reduzierte *in vitro* Aktivität gegen die JAK3. Zur Reduktion der durch die Analyse anfallenden Kosten wurden nur TNF α und IL-10 und auch nur 90 bzw. 180 min nach LPS-Gabe erfasst.

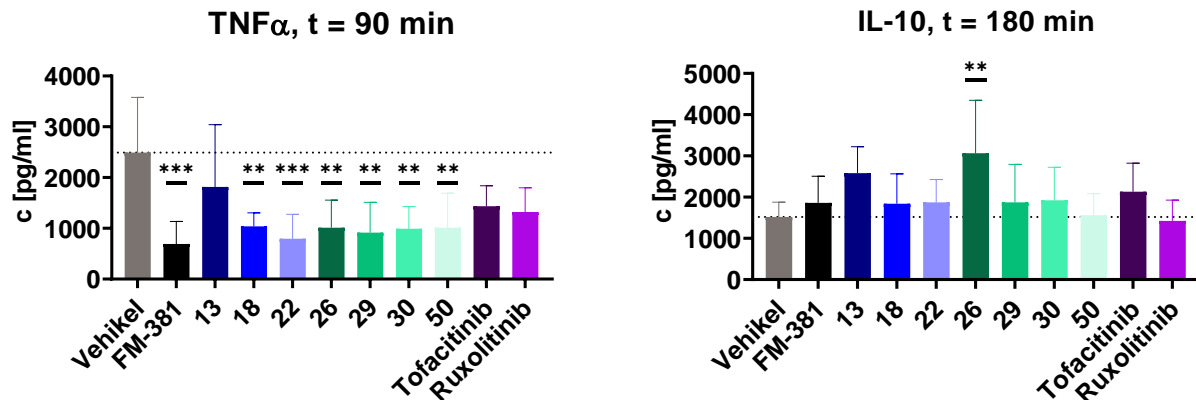


Abbildung 4.59: Plasmaspiegel \pm SD von TNF α (links) und IL-10 (rechts) zu 90 bzw. 180 min nach intraperitonealer Injektion von 10 μ g/kg LPS und 500 mg/kg Galactosamin. Die gepunkteten Linien entsprechen den durchschnittlichen Konzentrationen der Vehikelgruppen. Die Vorbehandlung von Mäusen mit 9,6 μ mol/kg der JAK-Hemmer i.v. führte zu reduzierter Ausschüttung von TNF α bei gleichbleibenden oder erhöhten IL-10 Konzentrationen im Plasma. $n = 6$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Die Mehrheit der eingesetzten JAK3-Hemmer konnte eindrucksvoll und signifikant die Freisetzung von TNF α reduzieren ($p < 0,005$ für **18**, **26**, **29**, **30** und **50**; $p < 0,001$ für **22**; und **FM-381**). Die Effekte waren generell deutlich ausgeprägter als in den vorigen Studien, in denen p.o. behandelt worden war. In Anbetracht der parenteralen Gabe der Inhibitoren und der vglw. hohen Dosis (9,6 μ mol/kg, bei den p.o. Studien waren 15 μ mol/kg verabreicht worden) ist davon auszugehen, dass relativ hohe Konzentrationen der Stoffe im Blut vorlagen. Die niedrigsten TNF α -Spiegel wurden im Blut von mit **FM-381** behandelten Tieren gemessen ($0,7 \pm 0,4$ ng/ml; $c_{\text{Vehikel}} = 2,5 \pm 1,1$ ng/ml); es handelte sich dabei auch um den Kandidaten mit der stärksten Potenz gegen die JAK3. Interessanterweise zeigte auch **50**, dessen elektrophiler Michael-Warhead reduziert wurde, noch immer einen deutlichen Effekt auf die TNF α -Spiegel. Die Substanz war im JAK3 ELISA deutlich weniger aktiv gegen die JAK3 als die Vorstufe **FM-381** (Kapitel 4.1), war aber bereits im *in vitro* LPS Modell überraschend wirksam (Kapitel 4.2.3). Die Hemmung anderer JAK-Isoformen durch die Substanz wurde nicht getestet. Es ist davon auszugehen, dass es ohne die Möglichkeit zur kovalent-reversiblen an C909 zu einem gewissen Selektivitätsverlust kommt; das den anderen Substanzen ähnelnde Zytokinprofil legt aber nahe, dass es sich noch immer um primär JAK3-abhängige Effekte handelt.

Die IL-10 Plasmakonzentrationen wurden nur 180 min nach LPS-Gabe analysiert. Für viele der Gruppen wurden dabei erhöhte Spiegel gemessen, die Anstiege waren aber überwiegend gering gegenüber der Vehikelgruppe. Betrachtet man die IL-10 Verläufe voriger Studien ist anzunehmen, dass die Unterschiede zu einem früheren Zeitpunkt (idealerweise 90 min) größer gewesen wären. Nur für die mit **26** behandelte Gruppe

wurde auch zu $t = 180$ min eine signifikante Erhöhung der IL-10 Ausschüttung observiert ($p < 0,01$).

Zusammengefasst konnte durch die intravenöse Behandlung mit JAK-Hemmern deren Wirksamkeit entkoppelt von Faktoren wie der oralen Bioverfügbarkeit demonstriert werden. Testsubstanzen mit weniger günstigen PK-Eigenschaften, aber hoher Aktivität gegen die JAK3, waren hier ausgesprochen effektiv. In Anbetracht der in den p.o.-Studien geringeren Effekte mancher Inhibitoren - z.B. auch **FM-381** - auf die $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel sollte auch hinterfragt werden, ob diese Stoffe dort noch eher unterdosiert eingesetzt worden waren. Eine Erhöhung der Dosis könnte Verluste durch den First-Pass Effekt ausreichend kompensieren, um wirksame systemische Spiegel zu erreichen.

4.3.2.5 Dosisfindungs-Studie

Aufgrund der allgemeinen Effektivität der JAK3-Hemmer in der i.v. Studie und der guten Wirksamkeit des Konjugats **38** (s. *P.o. Studie 1*) sollte zuletzt die optimale Dosis dieses Stoffes im LPS-Modell ermittelt werden. Behandelt wurde intravenös in einer Spanne von 10-0,03 $\mu\text{mol/kg}$. Tofacitinib diente als unselektive Vergleichssubstanz; hier bestand zudem besonderes Interesse an den niedrigeren Dosen, da diese eher den beim Menschen verwendeten glichen. Bei einem 70 kg schweren Menschen würde die typische Einmaldosis von 10 mg in etwa 0,14 mg/kg bzw. 0,46 $\mu\text{mol/kg}$ entsprechen.

Erneut wurde der Entzündungsreiz 30 min nach Behandlung mit den JAK-Hemmern durch die Kombination aus LPS und Galactosamin ausgelöst. Die jeweilige Dosis entsprach den vorigen Studien.

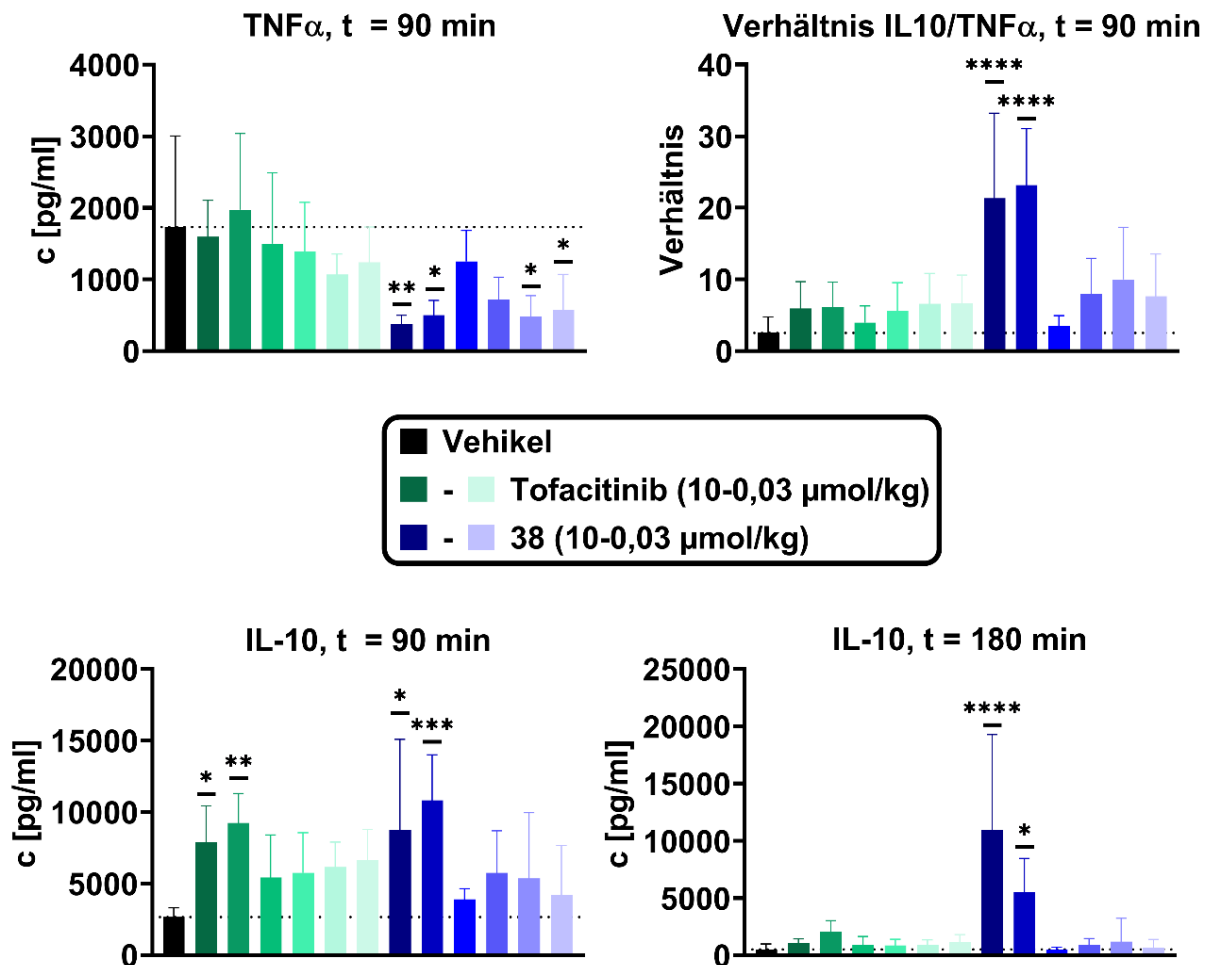


Abbildung 4.60: Plasmaspiegel \pm SD von TNF α (oben links) und IL-10 (unten) sowie deren Verhältnis (oben rechts) nach Vorbehandlung von BALB/c Mäusen mit variablen Dosen (10 / 3 / 1 / 0,3 / 0,1 / 0,03 μ mol/kg) an Tofacitinib oder **38** p.o. 30 min vor intraperitonealer Injektion von 10 μ g/kg LPS und 500 mg/kg Galactosamin. Die gepunkteten Linien entsprechen den durchschnittlichen Werten der Vehikelgruppe. Insbesondere für **38** ergab sich eine komplexe, nicht-lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung, $n = 6$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Wie aus **Abbildung 4.60** ersichtlich führte die Behandlung mit **38** zu einer glockenförmigen Dosis-Wirkungs-Beziehung. Sowohl die beiden höchsten als auch die beiden niedrigsten Dosen führten zu signifikant verringerten TNF α -Spiegeln im Plasma ($p < 0,05$ bzw. $< 0,01$). Die TNF α -Senkung durch Tofacitinib war in der mit 0,1 μ mol/kg behandelten Gruppe am stärksten ausgeprägt, aber nicht von statistischer Signifikanz. Generell war **38** – bei jeweils gleicher Dosis – potenter darin, die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins zu hemmen.

Beide Wirkstoffe waren effektiv darin, die IL-10 Spiegel im Plasma zu steigern, insbesondere zu $t = 90$ min. Sowohl bei Tofacitinib als auch **38** waren die Effekte der beiden höchsten Dosen statistisch signifikant ($p < 0,05$ bis $< 0,001$). Im Gegensatz zu TNF α hatte niedrigdosiertes **38** nur einen geringen Effekt auf die Zytokinfreisetzung. Dies legt nahe, dass die TNF α -Senkung bei hohen Dosen des Stoffes vermutlich v.a. über IL-10-abhängige Signalwege beeinflusst wird, während bei niedrigen Dosen andere Mechanismen zugrunde liegen.

180 min nach LPS-Gabe lagen in einigen Gruppen noch immer erhöhte IL-10-Spiegel vor, insbesondere in mit 10 µmol/kg oder 3 µmol/kg **38** behandelten Tieren ($p < 0,0001$ bzw. $< 0,05$). Die Werte lagen für diese beiden Gruppen in etwa im Bereich des vorigen Zeitpunktes und lassen sich gegebenenfalls durch pharmakokinetische Gründe erläutern: Durch Rückverteilungsprozesse aus peripheren Geweben in den Kreislauf ist besonders bei hohen Dosen ein lang anhaltender Effekt zu erwarten. Eine Bestätigung dieser Vermutung durch Quantifizierung der Wirkstoffkonzentration war allerdings leider nicht möglich.

Betrachtet man die Verhältnisse beider Zytokine zum kritischen 90 min Zeitpunkt, ist vor allem für die mit 10 µmol/kg und 3 µmol/kg **38** behandelten Gruppen eine starke, signifikante Verschiebung hin zu IL-10 (jeweils über das ca. 20-fache von $\text{TNF}\alpha$, $p < 0,0001$) ersichtlich. Bei anderen Dosen bzw. bei Tofacitinib kam es ebenfalls zu einer gewissen Steigerung der Verhältnisse, allerdings in deutlich geringerem Ausmaße.

Zusammengefasst zeigte sich **38** gegenüber Tofacitinib als überlegen zur Abmilderung einer Immunreaktion. Die optimale i.v. Dosis des Konjugats liegt im Bereich von 3-10 µmol/kg. Der Stoff wurde in allen Gruppen gut vertragen, bei noch höheren Dosen als 10 µmol/kg dürfte aber die Löslichkeit im i.v.-Vehikel einen limitierenden Faktor darstellen.

4.3.3 Psoriasis Modell

Die Psoriasis, oder Schuppenflechte, ist eine chronische entzündliche Hauterkrankung, die ca. 1-2 % der westlichen Bevölkerung betrifft. Sie äußert sich primär durch Schuppung und Rötung der Haut und damit einhergehende Schmerzen. Hinzu kommen weitere Komorbiditäten und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen und kardiovaskulären Erkrankungen. Gerade durch die Sichtbarkeit der Erkrankung ist der Leidensdruck für viele Patienten hoch. Risikofaktoren an Psoriasis zu erkranken sind unter anderem Umwelteinflüsse, genetische Prädisposition und früher aufgetretene virale Infekte. Im Gegensatz zu vielen anderen Autoimmunerkrankungen ist die Prävalenz vom Geschlecht unabhängig.^{153,154}

Die konkrete Pathogenese ist noch nicht vollständig aufgeklärt, man vermutet aber dass T-Zellen (insbesondere $\text{T}_{\text{H}17}$) und der IL-17/IL-23 Signalweg eine zentrale Rolle bei der Entstehung spielen. Wie durch den Behandlungserfolg mit $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitoren bereits gezeigt wurde, trägt auch $\text{TNF}\alpha$ zur Erkrankung bei. Durch Interaktion zwischen Immunzellen (v.a. Dendritische Zellen und $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen) und Keratinozyten kommt es lokal zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine sowie diverser Wachstumsfaktoren. In Folge proliferieren die Keratinozyten stark, was zur für die Krankheit typischen Bildung von Hautschuppen und insgesamt zur Verdickung der Epidermis führt. Gleichzeitig verdünnt sich das Stratum Granulosum, das in gesunder Haut wesentlich zu deren Barrierefunktion beiträgt. Durch die Weitung von Blutgefäßen kommt es zudem zur auffälligen Rötung der Haut.^{153,155}

Die Therapie der Schuppenflechte richtet sich nach der Ausbreitung bzw. dem Schweregrad der Symptome. Bei leichten Verläufen wird – zur Vermeidung systemischer Nebenwirkungen – topisch behandelt, z.B. mit Glukokortikoiden,

Dithranol, Retinsäure-Derivaten sowie unterstützend zur Hautpflege mit harnstoffhaltigen Topika. Auch die Bestrahlung der betroffenen Stellen mit UV-A Licht nach vorheriger Sensibilisierung mit Psoralenen ist eine Option, hat aber eine untergeordnete Rolle. Systemische Therapeutika umfassen u.a. Immunsuppressiva wie Glukokortikoide, Methotrexat, Retinoide, Dimethylfumarat und die anti-TNF α Biologicals (z.B. Etanercept, Infliximab, Adalimumab) und der IL-12/23 Antikörper Ustekinumab. Problematisch am Einsatz der Biologicals sind zum einen die hohen Herstellungskosten, zum anderen die breite immunsuppressive Wirkung, durch die längerfristig das Risiko von Infekten oder sogar von Tumoren ansteigt. Zudem kann es durch Bildung von Antikörpern gegen die Wirkstoffe zum Wirkverlust kommen.

Ausschließlich der Mensch ist von der Krankheit betroffen, weswegen die momentan existierenden Tiermodelle alle nur in verschiedenen Aspekten bzw. Ausmaßen übertragbar sind. Unterschiede können z.B. in der Auswahl der auftretenden Symptome oder in den Pathogenese-treibenden Faktoren (bestimmte Zytokine, Zelltypen, ...) liegen. So konnte z.B. durch transgene, konstitutiv STAT3 exprimierende Mäuse ein deutlicher psoriatischer Phänotyp erzeugt werden. Die Inhibition der STAT3-Aktivität führte dabei zu einer wesentlichen Besserung der Symptomatik. Sollte STAT3 bei der menschlichen Schuppenflechte ebenfalls stark zum Krankheitsgeschehen beitragen, würde dies ein attraktives therapeutisches Target darstellen.¹⁵⁶ Sowohl Tofacitinib als auch Ruxolitinib wurden bzw. werden zurzeit für den Einsatz bei der Schuppenflechte geprüft, eine Zulassung wurde aber noch nicht erteilt.

Ein bekanntes, auch für interne Psoriasis-Studien der Firma Synovo durchgeführtes Modell basiert auf dem Einsatz von Aldara® (**Abbildung 4.61**). Dabei handelt es sich um ein Fertigarzneimittel, welches topisch zur Behandlung von Feigwarzen, aktinischer Keratose und oberflächlichen Formen des Hautkrebs verwendet wird. Als Wirkstoff beinhaltet Aldara® 5 % Imiquimod (IMQ), einen TLR7-Agonisten. Stimulation des TLR7 führt, ähnlich wie bei TLR4-Stimulus, zu einer Entzündungsreaktion und kann bei psoriatischen Patienten zu einer Verschlimmerung der Erkrankung führen. Dies wird in Mäusen zur Herbeiführung eines Krankheitsmodells genutzt, das der menschlichen Psoriasis in vielen Aspekten gleicht. Nach Auftragen von IMQ auf die Haut kommt es zur Hyperproliferation von Hautzellen, Einwanderung von Immunzellen und der Produktion proinflammatorischer Zytokine. Makroskopisch äußert sich das Entzündungsgeschehen durch eine Verdickung der Haut, starke Rötung und die Bildung von Hautschuppen, ähnlich wie bei der echten Schuppenflechte. Das Aldara®-Modell bietet die Vorteile eines schnellen Auftretens der Symptome (wenige Tage), hoher Ansprechraten der Tiere und eines gut definierten, günstigen Fertigarzneimittels zur Induktion.¹⁵⁷

Neben IMQ enthält die Formulierung von Aldara® einen weiteren wichtigen Inhaltsstoff, Isostearinsäure (ISS). Abgesehen von ihrem Nutzen als Hilfsmittel für die Formulierung steht ISS auch im Verdacht, einen beträchtlichen Anteil zur Entstehung der lokalen Immunreaktion beizutragen. Dies konnte durch interne Synovo-Studien durch Vergleich verschiedener Formulierungen gegen Aldara bestätigt werden. Die Ergebnisse legten nahe, dass IMQ in großem Maße systemisch wirkt, während die ISS ihre Wirkung v.a. topisch ausübt. (*Aktuell zur Publikation eingereicht*)

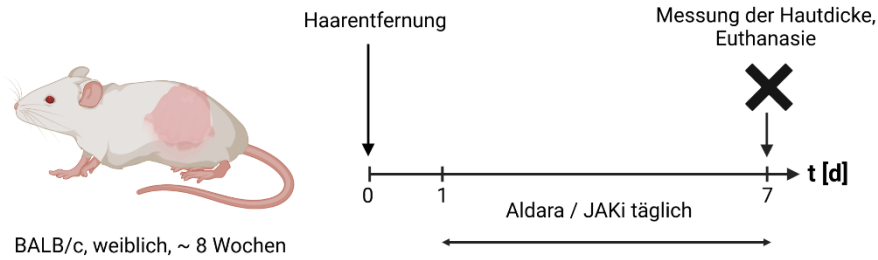


Abbildung 4.61: Ablauf des Aldara®-basierten Psoriasis-Modells. An Tag 0 wurden die Tiere am Rücken rasiert und Haarentfernungscreme aufgetragen. Von Tag 1-7 wurden zur Hervorrufung der Entzündungsreaktion täglich 50 mg Aldara auf die freie Stelle aufgetragen; 2 h später wurde dann topisch mit den Testsubstanzen oder Vehikel behandelt. Die Tiere wurden täglich gewogen und gescored. Am letzten Studientag wurde zudem noch die Dicke der Haut bestimmt.

Relativ früh im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere der dargestellten JAK3-Inhibitoren in eine solche Aldara®-basierte Studie aufgenommen. Sie wurden einmal täglich topisch, als 2 %ige Formulierung in Basiscreme DAC, angewendet.

Körpergewicht: Die Mäuse wurden täglich gewogen, da das Körpergewicht in vielen Krankheitsmodellen gut das allgemeine Wohlbefinden der Tiere widerspiegelt. Zum Verlust von Gewicht kann es dabei sowohl durch Appetitmangel, als auch durch vorliegende Pathomechanismen kommen.

Initial kam es in allen Gruppen zu einem Verlust des Körpergewichts (**Abbildung 4.62**). Dies ist typisch für das Imiquimod-Modell und gut in der Literatur dokumentiert.^{158,159} Etwa ab der Hälfte der Studiendauer erholten sich die Tiere wieder langsam; das durchschnittliche Körpergewicht der Vehikeltiere lag dabei aber deutlich unter jenen der behandelten Tiere und der gesunden Kontrollgruppe. **11** war am effektivsten zum Erhalt des Körpergewichts, die Gewichte waren sowohl über den gesamten Studienverlauf hinweg als auch am letzten Tag statistisch signifikant erhöht (jeweils $p < 0,01$). Letzteres traf auch auf die Behandlung mit **FM-381** zu ($p < 0,01$).

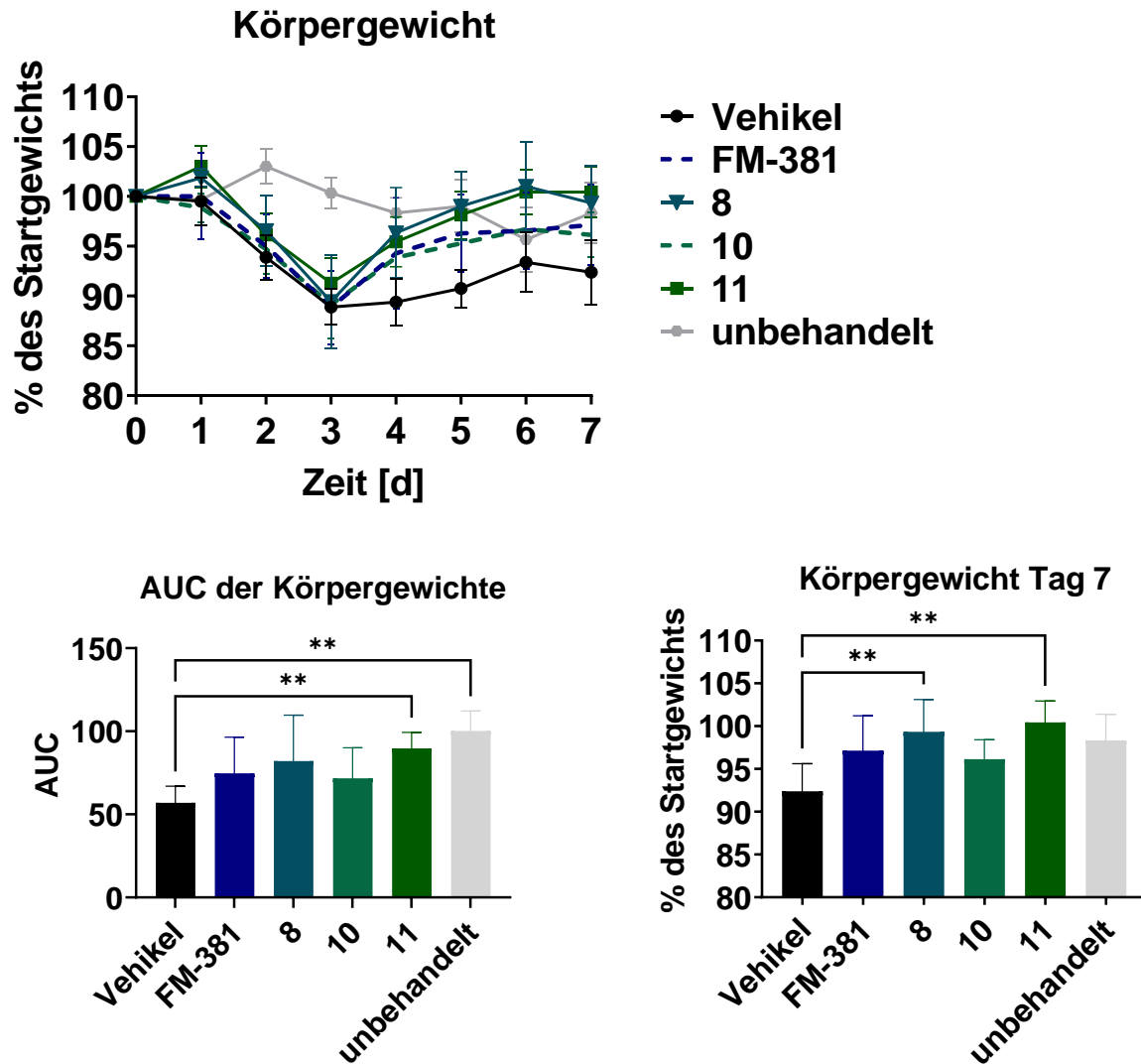


Abbildung 4.62: Verlauf der relativen durchschnittlichen Körpergewichte über die Studie (oben links), AUC der jeweiligen Kurven (unten links) sowie durchschnittliche Körpergewichte am letzten Tag der Studie (unten rechts). Die Behandlung mit **11** schützte über den Studienverlauf hinweg signifikant vor Verlust des Körpergewichts ($p < 0,01$). Am letzten Studientag waren die Körpergewichte der **FM-381**- und der **11**-Gruppen signifikant erhöht gegenüber der Vehikelgruppe ($p < 0,01$). Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, $n = 8$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Score: Die Schwere der spezifischeren Hautsymptome wurde durch einen kombinierten Score erfasst, der sich aus der Bewertung von Hautverdickung, -Schwere und Schuppenbildung zusammensetzt (**Abbildung 4.63**). Völlig unbehandelte, gesunde Tiere dienten als Referenz.

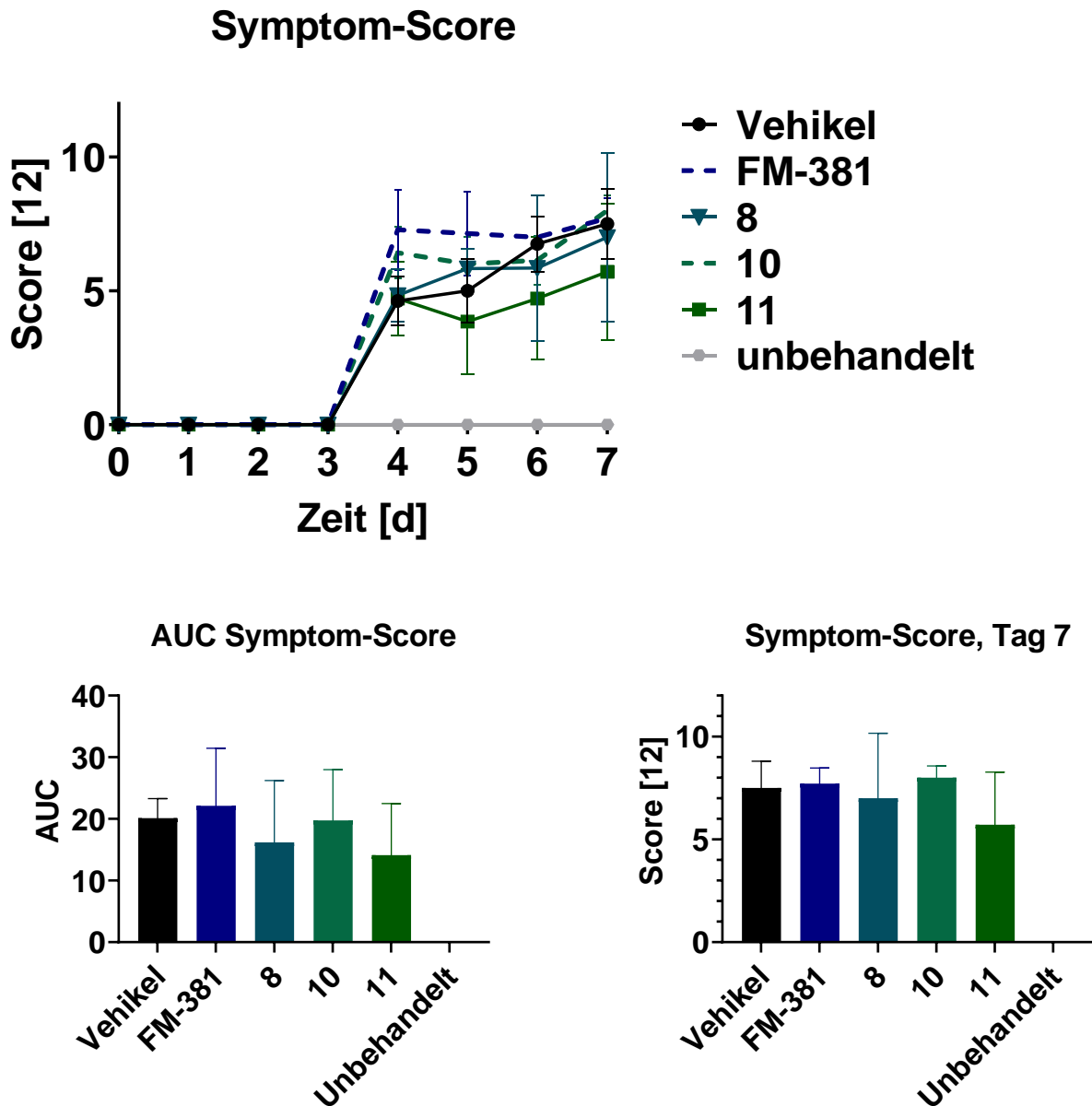


Abbildung 4.63: Verlauf der durchschnittlichen Symptom-Scores über die Studie (oben links), AUC der jeweiligen Kurven (unten links) sowie durchschnittliche Scores am letzten Tag der Studie (unten rechts). Die Behandlung mit den JAK3-Hemmern **8** und **11** führte zu einer (statistisch nicht signifikanten) Verbesserung der Symptomatik gegenüber Vehikel. Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, $n = 8$.

Die Effekte der Aldara®-Behandlung traten wie erwartet innerhalb weniger Tage auf, die Tiere entwickelten alle zum gleichen Zeitpunkt (Tag 4) die typische Symptomtrias. Die topisch eingesetzten JAK-Hemmer hatten leider nur einen geringen bzw. keinen Einfluss auf die Scores. Für **8** und **11** wurde zwar eine numerische Verbesserung gegenüber der Vehikelgruppe festgestellt, die Unterschiede waren aber aufgrund der

hohen Streuung nicht statistisch signifikant. Den niedrigsten Symptom-Score am letzten Studientag hatte die mit **11** behandelte Gruppe.

Hautdicke: Am letzten Studientag wurde, vor der Euthanasie der Tiere, die Dicke der betroffenen Hautabschnitte gemessen (Abbildung 4.64). Das Krankheitsmodell führte – durch starke Proliferation der Keratinozyten - zu einer deutlichen Verdickung der Haut bis fast auf das Doppelte. Die JAK-Hemmer **8** und **FM-381** konnten dem in signifikantem Maße entgegenwirken ($p < 0,05$). **11**, die Substanz mit der besten Wirksamkeit bzgl. Körpergewicht und Score, hatte nur einen geringen Effekt.

Die topische Behandlung mit den JAK3-Hemmern zeigte zwar in manchen Aspekten Wirksamkeit im Modell, gerade der Einfluss auf die Scores fiel aber enttäuschend gering aus. Die Studie hatte aber auch potentielle Schwächen, die zu einem verminderten Behandlungserfolg beigetragen haben könnten: Zum ersten ist die topische Behandlung bei Mäusen mitunter problematisch, da diese ggf. dazu neigen, aufgetragene Topika abzulecken. Dies würde einerseits die lokal vorhandene Wirkstoffmenge verringern, andererseits unter Umständen zu systemischen Effekten (sowohl durch den Wirkstoff als auch das Vehikel selbst) führen. Die wirkstoffhaltigen Formulierungen waren durch die intensiv gelbe bis gelborange Farbe der JAK-Inhibitoren ebenfalls eingefärbt. Ob die Färbung für ein verstärktes Abtragen der Creme durch die Mäuse sorgte, wurde nicht quantifiziert, Rückstände im Gesichtsbereich der Tiere waren aber häufig noch erkennbar. Eine mehrfache Applikation pro Tag könnte sowohl unter diesem Aspekt sinnvoll sein, als auch um aufzuklären ob die Wirksamkeit durch ein kürzeres Therapieintervall bzw. höhere Tagesdosen erhöht wird. Zum zweiten sollte auch eine Optimierung bzw. strengere Kontrolle der angefertigten Formulierung sollte erwogen werden. Die Stoffe wurden zunächst vollständig in DMSO gelöst und anschließend in die Basiscreme eingearbeitet. Die Kontrolle auf Homogenität erfolgte aber ausschließlich visuell; das spätere Ausfallen von Wirkstoffpartikeln, z.B. während der Lagerung, könnte unter Umständen nicht bemerkt werden und zu suboptimaler Verfügbarkeit am Wirkort führen.

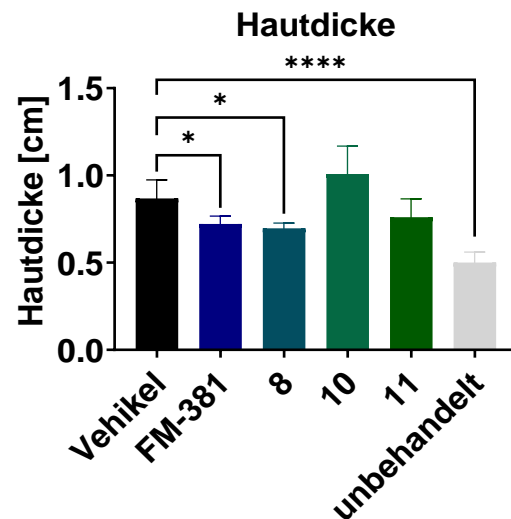


Abbildung 4.64: Durchschnittliche Dicke der Haut von Mäusen zum Ende der Studie. Das Krankheitsbild führt unter anderem zur Proliferation von Keratinozyten und einer Verdickung der Haut. Der topische Einsatz von **8** und **FM-381** führte zu signifikanter Reduktion gegenüber der Vehikelgruppe ($p < 0,05$). Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Interessant für eine Folgestudie wäre die Entnahme von Herzplasma und peripheren Organen zum Ende der Studie, um auf evtl. über die Haut aufgenommene Mengen an Wirkstoffen zu prüfen. Gerade für die Langzeitbehandlung am Menschen ist dies auch aus sicherheitstechnischen Gründen relevant, um das Risiko systemischer Nebenwirkungen überwachen zu können. Zuletzt erscheint ein Vergleich von topischer zu oraler Applikation der Wirkstoffe sinnvoll. Wie bereits erwähnt übt IMQ deutliche systemische Wirkungen aus, weswegen im Aldara®-Modell eine rein lokale Behandlung

möglicherweise nicht ausreicht, um in die zugrundeliegenden Pathomechanismen einzugreifen.

Zusammengefasst konnten zwar bestimmte Studienparameter und auch die Art der Therapie noch optimiert werden; es lagen aber bereits vielversprechende Hinweise auf eine Therapiemöglichkeit durch JAK3-Hemmer vor. Insbesondere **11** stellt den Ergebnissen nach einen potentiellen Kandidaten für Folgestudien dar. Wie in einem Synovo-Paper kürzlich dargelegt wurde bietet sich auch der Einsatz von Makrolidkonjugaten an, da sich diese in hohem Maße in lokalen Immunzellen anreichern und so gezielt in das Entzündungsgeschehen eingreifen (*Aktuell zur Publikation eingereicht*).

4.3.4 MOG/PTX-induzierte EAE

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine neurodegenerative Autoimmunerkrankung, die vor allem das ZNS betrifft. Die Symptomatik ist vielschichtig und rührt hauptsächlich vom Verlust der axonalen Myelinschicht her.¹⁶⁰ Diese Demyelinisierung wird durch autoreaktive Lymphozyten aus der Peripherie verursacht, die die Blut-Hirn-Schranke überschreiten. Im ZNS angekommen schädigen sie Nervenfasern und führen zum Abbau der Myelinscheiden.^{161,162} Die resultierende Störung der Nervenfunktion äußert sich unter anderem durch Taubheitserscheinungen, Sehstörungen, Gelenkspastik und Ataxie. Die Erkrankung kann auf unterschiedliche Art fortschreiten. Man unterscheidet zwischen progredienten oder schubweisen Verläufen sowie Mischformen.^{160,163,164}

Die Ursache für das Entstehen der MS ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wurden bereits Risikofaktoren identifiziert, darunter Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus, eine „westliche“ Lebensweise bzw. Ernährung sowie weibliches Geschlecht.^{165–167} Bezüglich der Ernährung wurde eine erhöhte Inzidenz in übergewichtigen Patienten festgestellt.¹⁶⁸ Ferner vermutet man einen protektiven Effekt durch über die Nahrung aufgenommene Antioxidantien und Ballaststoffe, u.a. durch Neutralisation reaktiver Sauerstoffspezies bzw. durch einen positiven Einfluss auf das Mikrobiom.^{169,170} Weitere Details können der Fachliteratur entnommen werden. Der Ernährungsaspekt war für die intern durchgeführten MS-Studien von Synovo von besonderem Interesse und wurde für eine anstehende Publikation näher untersucht (*Aktuell zur Publikation vorbereitet*). Wenngleich der Fokus der Studien vor allem auf dem Einfluss der Diät und der Art der Modellinduktion auf den Krankheitsverlauf lag, wurden im Rahmen einer dieser Studien auch verschiedene Testsubstanzen auf ihre Wirksamkeit im Tiermodell untersucht.

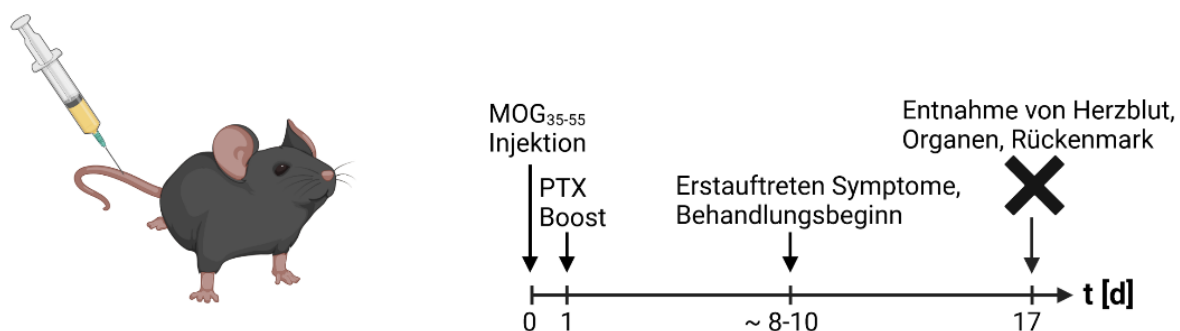
Verwendet wurde das sogenannte Experimentale Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)-Modell, das zu den am häufigsten verbreiteten Tiermodellen zur Erforschung der MS gehört (**Abbildung 4.65**). Hier wird eine Autoimmunreaktion gegen im ZNS befindliche Antigene, z.B. gegen das MOG₃₅₋₅₅-Peptid hervorgerufen. Der Verlauf ist vom eingesetzten Antigen abhängig: So führt die Injektion des MOG₃₅₋₅₅ Peptids zu einem chronisch-progredienten Verlauf, während die Erkrankung nach Gabe von PLP₁₃₉₋₁₅₁ schubweise verläuft.¹⁷¹ Im Gegensatz zur MS treten die Symptome bei der EAE deutlich früher hervor (nach Tagen, statt i. d. R. Jahren). Auch die Behandlung

erfolgt vergleichsweise früher, da die MS aufgrund schwacher oder unspezifischer Symptomatik in der Anfangsphase oft erst spät diagnostiziert wird.¹⁶⁸

Andere Modelle induzieren die Symptomatik z.B. durch Einsatz bestimmter (Autoimmunität hervorrufender) Viren, autoreaktiver T-Zellen oder Myelin-schädigenden Toxinen wie Cuprizin oder Lysolecithin. Gegenüber der EAE wird die Übertragbarkeit dieser Modelle auf den Menschen als geringer eingeschätzt.¹⁷²⁻¹⁷⁴

Das für die Sensibilisierung der Immunzellen erforderliche MOG₃₅₋₅₅ Peptid wird als Emulsion in Freund-Adjuvans subkutan injiziert (üblicherweise in die Hinterbeine). Dabei handelt es sich um eine W/O Emulsion (Öl-Phase: 15 % (V/V) Arlacel A in Paraffinöl), die abgetötete *M. tuberculosis* zur Verstärkung der Wirkung enthält.

Um die initiale Immunreaktion auf das verabreichte MOG₃₅₋₅₅ Peptid (und damit das „self-Priming“) zu verstärken, wird direkt nach der Peptid-Injektion sowie einen Tag später zusätzlich noch Pertussistoxin i.p. gegeben. Dessen „Booster-Effekt“ basiert u.a. darauf, dass Pertussistoxin das Einwandern von Immunzellen ins ZNS durch die Blut-Hirn-Schranke erleichtert, sowie generell die vorliegende Entzündungsreaktion steigert.¹⁷⁵



C57BL/6, weiblich, ~ 8 Wochen

Abbildung 4.65: Schematischer Ablauf des EAE Modells: Weibliche C57BL/6 Mäuse wurde subkutan eine Emulsion aus Complete Freund's Adjuvant und MOG₃₅₋₅₅ Peptid injiziert, um eine Autoimmunität gegenüber des körpereigenen Myelins zu erzeugen. Zur Verstärkung der Immunreaktion wurde direkt im Anschluss sowie einen Tag später noch Pertussistoxin i.p. verabreicht. Ungefähr acht bis zehn Tage nach Studienbeginn entwickelten die Tiere die ersten Symptome; die Behandlung mit JAK-Inhibitor **18** oder Vehikel begann ab Auftreten der Symptomatik. Die Studie wurde an Tag 17 beendet, die Tiere euthanasiert und Herzblut sowie Proben von Organen und Rückenmark entnommen.

Die Bewertung des Krankheitsverlaufs erfolgt anhand des Scores nach Herkel, der sich vor allem auf die motorische Symptomatik der Tiere bezieht.¹⁷⁶ Zudem wird üblicherweise das Körpergewicht erfasst und der Schaden im ZNS histologisch untersucht. Über qPCR und ähnliche Verfahren können die exprimierten (proinflammatorischen) Zytokine quantifiziert werden. Erste sichtbare Symptome können bei der MOG₃₅₋₅₅-EAE ungefähr zehn Tage nach Einleitung erwartet werden.

Als Kandidat für das EAE-Modell wurde **18** eingesetzt, da dieses sowohl gute Hirngängigkeit als auch eine akzeptable Aktivität gegen JAK3 aufweist. Zum Zeitpunkt

der aufgeführten Studie war für **18** noch keine PK-Studie mit p.o.-Behandlung durchgeführt worden, weswegen stattdessen parenteral behandelt wurde. Aufgrund der Länge der Studie war keine intravenöse Applikation zulässig, die Behandlung erfolgte deswegen intraperitoneal (10 ml/kg) mit einer Dosis von 6 $\mu\text{mol/kg}$, was in etwa 3 mg/kg entspricht. Die Behandlung erfolgte therapeutisch, also erst nachdem das Auftreten von Symptomen beobachtet wurde. Dies entspricht eher den realen Bedingungen bei der menschlichen MS, die oft lange Zeit unbemerkt (und damit unbehandelt) fortschreitet, bis sich eindeutige Symptome manifestieren und eine korrekte Diagnose gestellt wird.

Ergebnisse: Die Induktion des Krankheitsmodells verlief erfolgreich, die Inzidenzen betragen sowohl in der Vehikel- als auch in der Verumgruppe 100 %, d.h. dass über den Verlauf des Modells sämtliche Tiere erkrankten. Behandelt wurde ab Tag 10, die Studie wurde an Tag 17 beendet.

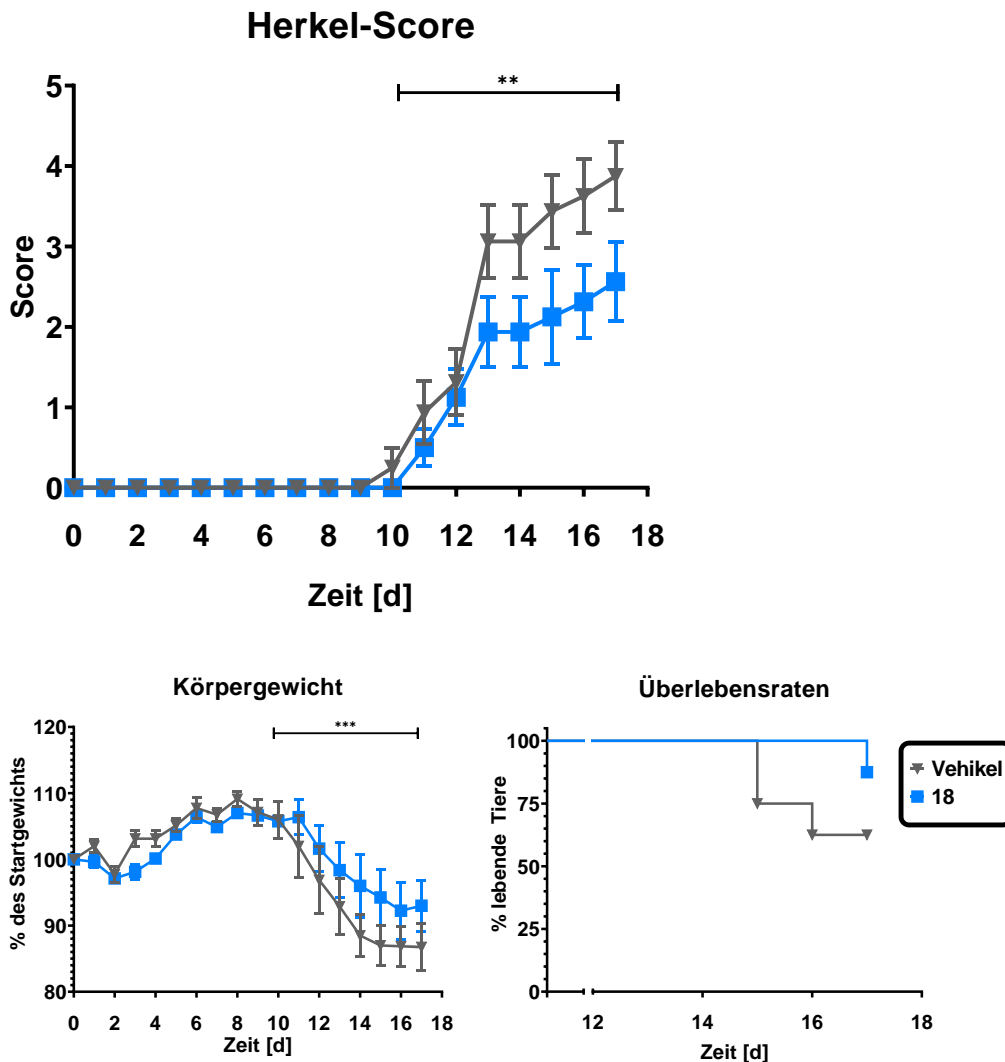


Abbildung 4.66: Ergebnisse der EAE-Studie. Die Behandlung der Tiere mit **18** wirkte sich günstig auf Schwere der Erkrankung (oben) Erhalt des Körpergewichts (unten links), und auf das Gesamtüberleben (unten rechts) aus. Die Unterschiede zur Vehikelgruppe bzgl. Gewichtsverlust und Symptom-Score waren statistisch signifikant ($p < 0,001$ bzw. $< 0,01$) für den Behandlungszeitraum (Tage 10-17). $n = 8$. Werte dargestellt als Mittelwert \pm SD. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Typisch für den Verlauf des EAE-Modells ist ein initialer Anstieg des Körpergewichts in der symptomfreien Phase (durch das normale Wachstum der jungen Tiere) gefolgt von einem starken, raschen Verlust durch die manifestierte Entzündung und verminderte Nahrungsaufnahme. Ein Gewichtsverlust auf weniger als 80 % des Startgewichtes gilt als striktes Abbruchkriterium, das zum Ausscheiden des Tieres aus der Studie führt. Im späteren Verlauf kommt es bei den überlebenden Tieren üblicherweise zu einer Stabilisierung des Gewichtes oder ggf. einem leichten Wiederanstieg. Die Therapie mit **18** konnte die Schwere der Erkrankung deutlich mildern: Der Verlust an Körpergewicht, ein gutes Indiz für den allgemeinen Zustand der Tiere, war gegenüber der Vehikelgruppe statistisch signifikant verringert ($p < 0,001$). Am letzten Tag der Studie betrug der Unterschied zwischen den Gruppen ca. 6 % (87 bzw. 93 % des Startgewichtes).

Auch bei den Symptom-Scores wurden für den Behandlungszeitraum statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet ($p < 0,01$). Unter Behandlung mit **18** stieg der Score wesentlich weniger an als bei den Vehikeltieren, bis zu einem maximalen Wert von $2,6 \pm 1,3$ (statt $3,9 \pm 1,1$). Während dies schon eine deutliche Linderung der Symptome darstellt, sollten für Folgestudien unbedingt höhere Dosen erprobt werden um die maximale Wirksamkeit zu erzielen.

Während des Studienzeitraums starben drei Tiere in der Vehikelgruppe bzw. wurden aufgrund Erreichen eines oder mehrerer Abbruchkriterien euthanasiert. Bei der Verumgruppe war es dagegen nur ein Tier.

qPCR-Analyse: Am Ende der Studie wurden Gewebeproben des Hirns entnommen, um diverse Markerproteine per qPCR zu analysieren. Die in den Proben detektierten Mengen an für diese Proteine codierende RNA wurden dabei gegen jene von unbehandelten, gesunden Tieren verglichen. RNA-Kopien für die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 waren gegenüber gesunden Tieren um ein Vielfaches erhöht (**Abbildung 4.67**). Die $\text{TNF}\alpha$ -Kopien waren in der mit **18** behandelten Gruppe zwar niedriger (ca. 14-fach über unbehandelt vs. 21-fach), die Unterschiede waren aber nicht statistisch signifikant. Ähnlich verhielt es sich mit IL-6. IL-17 RNA wurde nur geringfügig stärker exprimiert als bei den ganz unbehandelten Tieren.

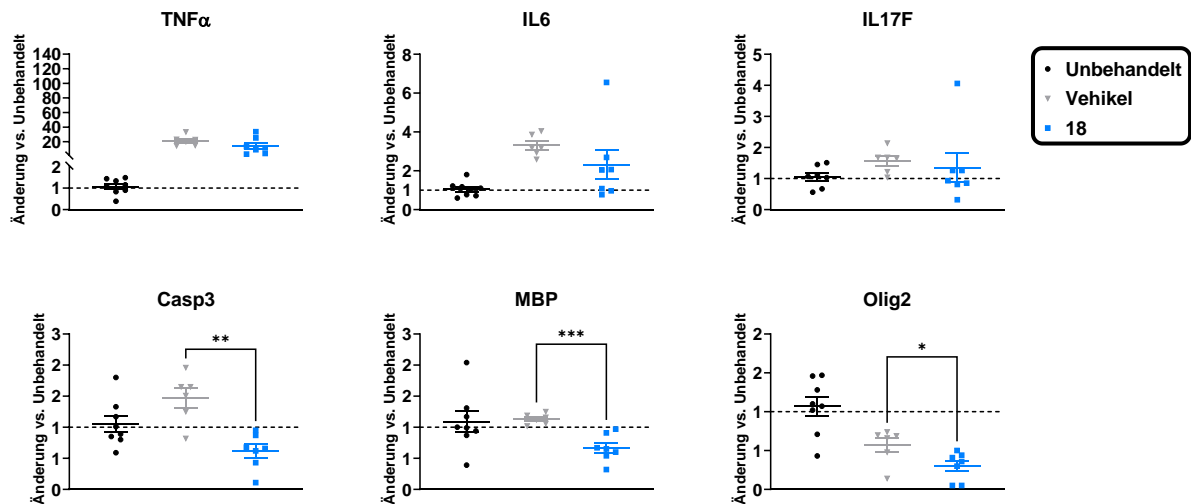


Abbildung 4.67: Verschiedene Inflammationsmarker im Hirngewebe der Tiere wurden per qPCR analysiert. Während für die Zytokine TNF α , IL-6 und IL-17 (oben links, oben mittig, oben rechts) keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Vehikel- und Verumgruppe festgestellt werden konnten, war dies für Casp3, MBP und Olig2 (unten links, unten mittig, unten rechts) der Fall ($p < 0,01$, $< 0,001$ und $< 0,05$). Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Caspase 3 (Casp3) RNA wurde in der Vehikelgruppe signifikant stärker exprimiert als in der Verumgruppe ($p < 0,01$), bei letzterer waren die Spiegel sogar unter jenen der Referenz. Bei Casp3 handelt es sich um eine Protease, die in der für die Apoptose essentiellen Caspasen-Kaskade involviert ist. Sie stellt damit einen Marker für apoptotische Zellen dar und wird in geschädigten Geweben stärker exprimiert.

Basisches Myelinprotein (MBP) wurde in den Vehikeltieren geringfügig stärker exprimiert wie in unbehandelten Tieren (Faktor 1,1), während die Werte für die **18**-Gruppe signifikant niedriger lagen ($p < 0,001$). MBP ist ein wesentlicher Bestandteil der Myelinscheiden. Erhöhte Werte deuten auf eine Schädigung des Myelins hin, das Protein wird dann infolge von Reparaturmechanismen verstärkt gebildet. Es steht zudem im Verdacht, eines der von Immunzellen erkannten Autoantigene bei der MS zu sein, da bei Patienten u.a. anti-MBP Antikörper nachgewiesen wurden.¹⁷⁷

Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor (Olig2) RNA war in beiden Gruppen gegenüber der Referenz vermindert vorzufinden, insbesondere aber in der Verumgruppe ($p < 0,05$ gegenüber Vehikel). Die Unterschiede zwischen den Vehikeltieren und der gesunden Kontrolle waren dabei nicht signifikant. Olig2 stellt einen Wachstumsfaktor für bestimmte Nervenzellen dar und beeinflusst deren Ausdifferenzierung in Oligodendrozyten bzw. Motorneuronen. Nach Schädigung von Hirngewebe bzw. Nerven ist Olig2 in Reparaturprozesse, unter Umständen aber auch in die Bildung von Narbengewebe involviert. Diskutiert wird, ob es durch Olig2-positive Vorläuferzellen in diesem Fall auch zur vermehrten Bildung von Astrozyten anstelle von (Myelin bildenden) Oligodendrozyten kommt, was zum längerfristigen Verlust der Myelinscheiden und der damit assoziierten Symptomatik führt.¹⁷⁸

Die Gehirne der Tiere wurden ebenfalls histologisch untersucht. Hirnhälften wurden in Paraffin eingebettet, Schnitte angefertigt und diese, nach Anfärben des Myelin mit Luxol fast blue Staining, mikroskopiert:

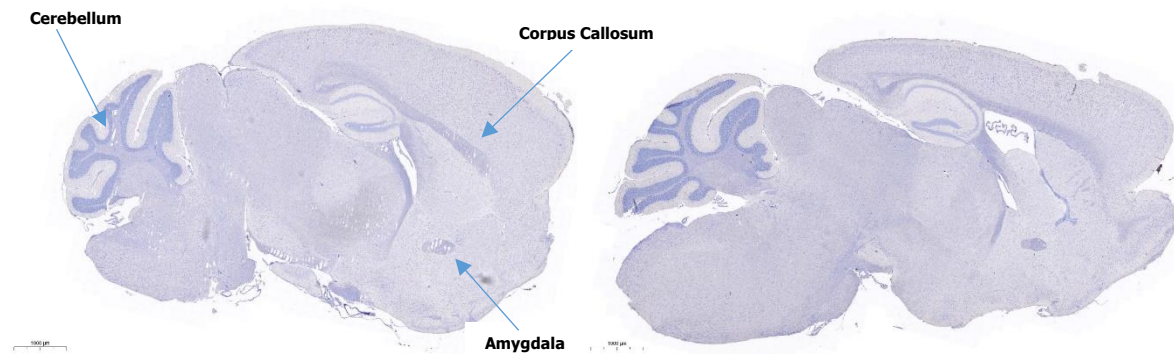


Abbildung 4.68: Histologie-Schnitte von Hirnen eines mit Vehikel (links) bzw. **18** (rechts) behandelten Tieres. Myelin wurde mit Luxol fast blue gefärbt und erscheint bläulich. Die durch das Krankheitsmodell hervorgerufene Demyelinisierung ist vor allem beim Vehikeltier durch hellere Einschlüsse im Cerebellum, Corpus Callosum und der Amygdala (s. Pfeile) gut erkennbar.

Sowohl bei den mit **18** behandelten Tieren als auch jenen der Kontrollgruppe war der Verlust der Myelinscheiden erkennbar; er war bei den Kontrolltieren aber wesentlich stärker ausgeprägt, insbesondere in der Amygdala, dem Corpus Callosum und dem Cerebellum (**Abbildung 4.68**, links). Der ZNS-gängige JAK3 Inhibitor zeigte dagegen einen protektiven Effekt und trug zum Erhalt des Myelins bei. Es sind deutlich weniger helle, geschädigte Bereiche in den Myelinschichten zu sehen.

Ergänzend zu den Hirnproben wurde auch noch Lebergewebe entnommen, um die Schädigung peripherer Organe durch das Entzündungsgeschehen zu untersuchen. Es ist vom EAE-Modell, aber auch von der menschlichen MS bekannt, dass periphere Entzündungen sich negativ auf den Krankheitsverlauf auswirken können.¹⁷⁹ Zudem wurde im Rahmen der Synovo-Studien über den Effekt der Diät dargelegt, dass die verwendete faserarme Diät einen entzündungsfördernden Einfluss auf ZNS und Peripherie ausübt. (Aktuell zur Publikation vorbereitet). **Abbildung 4.69** zeigt je einen Beispielschnitt der Vehikel- und der Verumgruppe. Anfärbt wurden sie mit Hämatoxylin und Eosin, die jeweils Zellkerne blau bzw. Mitochondrien und Plasmaproteine rot färben:

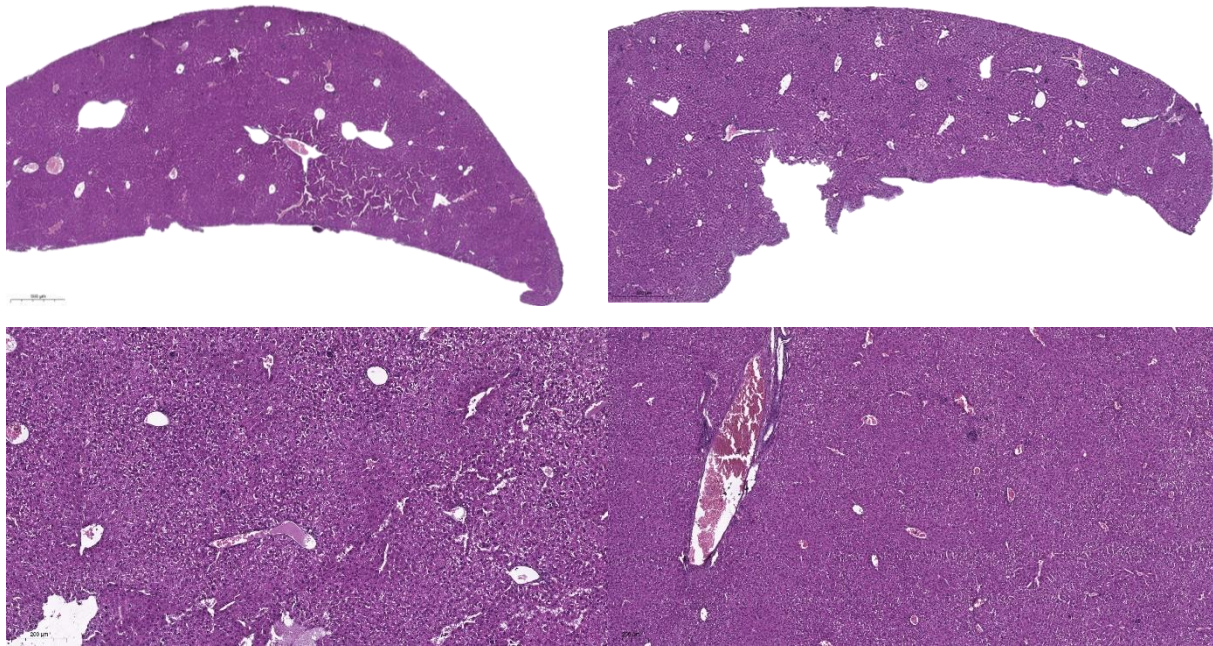


Abbildung 4.69: Histologie-Schnitte von Lebergewebe in Übersicht (oben) bzw. vergrößerter Detailansicht (unten). Das Lebergewebe der Tiere aus der Vehikelgruppe (links) war wesentlich stärker geschädigt und von Läsionen durchzogen als das von mit **18** behandelten Tieren (rechts). Die Befunde waren auch bei anderen Tieren der jeweiligen Gruppe ersichtlich. Dies verdeutlicht, dass das EAE-Modell auch bei peripheren Organen, nicht nur im ZNS, zur Entzündung und Gewebeschädigung führt. Die Proben wurden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Die mikroskopische Untersuchung der Lebern der Vehikeltiere fand eine Vielzahl kleinerer und größerer Läsionen und fortgeschrittene Schädigung des Gewebes. **18** zeigte dagegen einen protektiven Effekt, die Leberschäden waren weniger stark ausgeprägt. Aus diversen PK-Studien war bereits bekannt, dass der Stoff auch in der Leber in relevanten Mengen akkumuliert. Eine Erfassung von klinischen Markern wie Transaminasen zur Quantifizierung der Schädigung war leider im Rahmen der Studie nicht möglich, sollte aber für zukünftige Experimente berücksichtigt werden.

Zusammengefasst hatte die Behandlung mit **18** einen protektiven Effekt auf Körpergewicht und Überlebensrate bei Verbesserung der Symptomatik und teilweiser Senkung relevanter Inflammationsmarker. Der Einsatz von JAK3-Inhibitoren stellt demnach einen vielversprechenden Therapieansatz für die Multiple Sklerose dar. Weiterführende Studien sind vorgesehen, um die ideale Dosis und alternative Applikationsrouten von **18** zu ermitteln sowie um die Wirksamkeit mit einem nicht hirngängigen JAK3-Inhibitor, z.B. **FM-381**, zu vergleichen.

4.3.5 DSS-Colitis Modell

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, die durch überschießende (autoimmune) Entzündungsreaktionen der Darmwand charakterisiert sind. Durch Dysregulation der lokalen Immunantwort kommt es zur pathologischen Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6) und erhöhter Expression von Zelladhäsionsmarkern (z.B. ICAM, Selektine). Durch letztere, wie auch durch freigesetzte Chemokine, können

Immunzellen die Darmwand infiltrieren und die Immunreaktion verstärken. Beteiligt sind vor allem T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen, aber auch eine Ausschüttung von Autoantikörpern durch B-Zellen wurde dargelegt. Das Resultat ist eine schwere Schädigung des Darmgewebes und daraus abgeleitete Symptome, auf die noch eingegangen wird.^{180,181}

Die bekanntesten und häufigsten Vertreter der CED sind Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn. Die diagnostische Unterscheidung zwischen beiden Krankheitsbildern erfolgt anhand des Auftretens jeweils charakteristischer Symptome, vor allem der Lokalisation der Beschwerden: Die Colitis Ulcerosa betrifft vor allem den Dickdarm, während Morbus Crohn eher segmenthaft auftritt und die Entzündung über den gesamten GI-Trakt hinweg verbreitet sein kann. Beide Krankheiten können schubweise aufflammen, wobei es danach entweder wieder zu einer symptomfreien Phase (Remission) oder zu einer Chronifizierung kommt. Typische Symptome sind Diarrhöe, krampfartige Beschwerden und blutiger Stuhlgang (letzteres v.a. Colitis). Beim Morbus Crohn kann es durch die alle Darmwandschichten betreffende Entzündung auch zur Fistelbildung kommen, die eine schwerwiegende, behandlungspflichtige Komplikation darstellt. Auch extraintestinale Symptome sind möglich und betreffen z.B. den Gelenkbereich oder die Haut. Längerfristig kommt es durch die verminderte Nährstoffaufnahme und den Blutverlust mitunter zu Mangelerscheinungen und Anämie. Das Risiko zur Entwicklung von Darmkrebs ist deutlich erhöht, was auf das permanent inflammatorische Milieu zurückzuführen ist.^{180,181}

Die genauen Ursachen für die Entstehung einer CED sind noch unklar. Risikofaktoren sind, ähnlich wie bei anderen Autoimmunerkrankungen, genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse und der allgemeine Lebensstil. Eine große Rolle wird auch dem persönlichen Mikrobiom im Darm zugesprochen, dessen Zusammensetzung wesentlich vom Ernährungsstil beeinflusst wird.

Die aktuell verfügbaren Therapien erfolgen symptomatisch, nicht kausal. Die Colitis Ulcerosa kann bei mildereren Verläufen noch gut topisch behandelt werden (aufgrund der Beschränkung auf die unteren Darmabschnitte). Angewandt werden z.B. Aminosalicylate und glukokortikoidhaltige Schäume. Distale Manifestationen oder schwerere Verläufe werden mit systemischen Glukokortikoiden, Calcineurin-Hemmern (Cyclosporin, Tacrolimus), Antimetaboliten (Methotrexat, Thiopurine) oder anti-TNF α Biologicals behandelt. Ultima Ratio ist die chirurgische Entfernung des betroffenen Abschnitts. Für den Morbus Crohn wird überwiegend auf eine ähnliche Auswahl an Medikamenten zurückgegriffen, aufgrund der segmentartigen Ausbreitung über den weiteren GI-Trakt ist eine lokale Therapie aber oft nicht möglich. Bei schweren Schüben (v.a. Colitis) ist zudem die kurzzeitige intravenöse Gabe von Methylprednisolon indiziert.¹⁸²

Mehrere der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Testverbindungen wurden als Kandidaten zum Einsatz bei CED ausgewählt. Der bereits diskutierte pan-JAK Inhibitor Tofacitinib ist zur Behandlung einer dieser Krankheiten, der Colitis Ulcerosa, zugelassen. Noch unklar ist, ob auch alleinige Hemmung der JAK3 für den Therapieerfolg ausreicht. Zur präklinischen Evaluierung der Wirksamkeit der Kandidaten wurden mehrere Studien in den Räumlichkeiten der Synovo GmbH durchgeführt.

Man unterscheidet bei den etablierten CED-Modellen grob zwischen (chemisch) induzierten, spontanen (genetisch bedingt vulnerablen) und adoptiven Zelltransfer-Modellen. Für die mit den Testsubstanzen durchgeführten Studien wurde auf das weitverbreitete DSS-Colitis Modell zurückgegriffen, dessen Krankheitsbild in etwa der menschlichen Colitis Ulcerosa entspricht. Es lässt sich ferner - in Abhängigkeit von Dauer und Intensität der DSS-Behandlung - in akute, chronische oder rezidivierende Modelle aufteilen. Von Vorteil sind u.a. die vergleichsweise geringen Kosten, die einfache Durchführung und die ausreichende Übertragbarkeit auf den Menschen. Letztere ermöglicht auch den Einsatz bereits am Menschen zugelassener Vergleichsstoffe als Positivkontrollen. Von Nachteil ist die starke Beeinflussbarkeit des Modells durch zahlreiche Variablen wie Tierstamm, Geschlecht, DSS-Konzentration und -Charge (s.u.), individuellem Mikrobiom sowie der Nahrung.¹⁸³

Prinzip: Das Krankheitsbild wird im DSS-Colitis Modell durch die Behandlung der Tiere mit Dextransulfat hervorgerufen, einem verzweigten und stark sulfatierten Polysaccharid. Durch die negativ geladenen Moleküle kommt es zur Schädigung des Colonepithels und zum Verlust von dessen Barrierefunktion. Die erhöhte Permeabilität ermöglicht die Passage von kommensalen Bakterien bzw. deren antigenen Produkten durch die Epithelschicht. Gleichzeitig kommt es zur Einwanderung von Immunzellen und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Eine starke, sich chronifizierende lokale Entzündung ist die Folge. Die Gewebeschädigung führt zudem zu Blutungen, welche durch die gerinnungshemmenden Eigenschaften des Dextransulfats noch verstärkt werden. Klinisch äußert sich das Entzündungsgeschehen durch weiche, im späteren Verlauf wässrige bis blutige Stühle, Anämie, Verkürzung des Colons, Gewichtsverlust und schließlich den Tod.¹⁸⁴

Der Verlauf der Erkrankung ist u.a. vom verwendeten Mäuse-Stamm abhängig: In C57Bl/6 Tieren kommt es auch nach Beendigung der DSS-Zuführung weiterhin zur fortschreitenden Zerstörung des Darmepithels und Verschlimmerung der Symptomatik bis hin zum Tod, während sich BALB/c Mäuse im akuten Modell wieder erholen.¹⁸⁴ Man führt dies u.a. auf deren unterschiedlich ausgeprägte Arten der Immunreaktion zurück: So ist beispielsweise die adaptive Immunantwort auf Pathogene bei C57/Bl6-Mäusen primär T_H1- geprägt, während beim Balb/c-Stamm die T_H2-Mechanismen überwiegen.¹⁸⁵ Die Behandlung mit DSS führt allerdings primär über die angeborene Immunantwort zum Entzündungsgeschehen, was sich auch darin äußert, dass das Modell auch in Abwesenheit von T- und B-Zellen (z.B. in SCID-Tieren) durchführbar ist.¹⁸⁴

Durchführung: Im akuten Modell wird den Tieren zur Auslösung des Krankheitsbildes über das Trinkwasser für mehrere Tage (i. d. R. 4-7) DSS zugeführt. Je länger das DSS gegeben wird, desto schwerer ist die dadurch herbeigeführte Symptomatik.¹⁸⁶ Die Konzentration sollte zwischen zwei und fünf Prozent liegen; der ideale Wert ist u.a. abhängig vom durchschnittlichen Molekulargewicht, dem Hersteller und potentiell sogar von der jeweiligen Produktcharge. Es ist dementsprechend empfehlenswert, große Mengen DSS auf Vorrat vom selben Hersteller zu beschaffen, sollte mehr als eine Studie geplant werden. Das durchschnittliche Molekulargewicht sollte im Bereich von 40-50 kDa liegen, um eine ausreichend starke Symptomatik hervorzurufen: Bei der Verwendung von längerkettigem DSS (500 kDa) kommt es nicht zur nötigen

Schädigung des Colons, während ein zu geringes Molekulargewicht (5 kDa) nur für einen gelinden Verlauf sorgt.¹⁸⁷

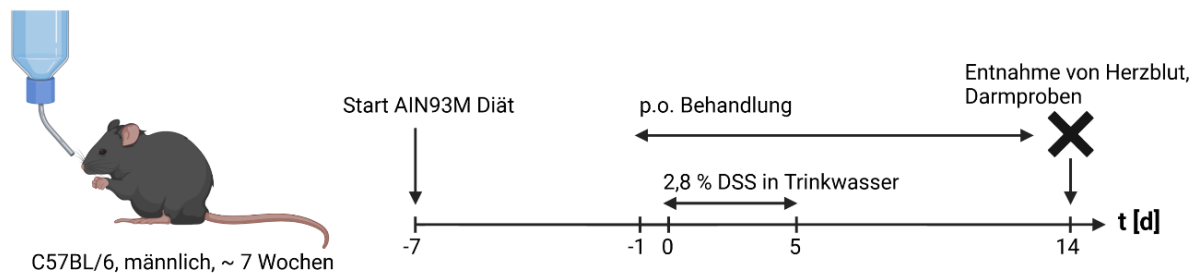


Abbildung 4.70: Beim akuten Modell wird den Tieren für 5-7 Tage DSS über das Trinkwasser verabreicht, bevor wieder zu normalem Trinkwasser gewechselt wird. Es kommt nach ca. 3 Tagen zum Auftreten erster Symptome, die sich in den Folgetagen verschlechtern. Ungefähr 10 Tage nach Beginn der Studie tritt eine Remissionsphase ein, während der sich Körpergewicht und Symptomscore wieder bessern. Beim prophylaktischen Modell wird sofort bzw. sogar einen Tag vor DSS-Gabe mit den Testsubstanzen behandelt. Bei der zweiten Studie wurde den Tieren schon ab der siebentägigen Akklimatisierungsphase vor Studienbeginn eine definierte Diät (AIN93M) verfüttert, um Schwankungen bzgl. der Zusammensetzung des Futters zu minimieren.

Zur Erfassung der Schwere des Verlaufs werden die Tiere täglich gewogen und der Symptomscore (Stuhlkonsistenz sowie Vorhandensein von Blut) bestimmt. Die Permeabilität des Darmgewebes wird bewertet, indem den Tieren vor deren Ausscheiden aus der Studie eine Lösung mit Lactulose, Mannitol und FITC-Dextran oral verabreicht und - nach der Termination - in Urin- bzw. Plasmaproben quantifiziert wird. Mannitol und Lactulose werden nicht metabolisiert und unverändert über den Urin ausgeschieden. Dabei wird Mannitol primär transzellulär über Poren der Endothelzellen aufgenommen, die Aufnahme sinkt mit zunehmender Schädigung des Endothels (aufgrund einer Abnahme der Villi und somit der Oberfläche). Es dient somit auch als Normalisierungsfaktor für die – ebenfalls von der verfügbaren Darmoberfläche abhängige – Aufnahme der Lactulose. Lactulose wird, als vglw. größeres Disaccharid, parazellulär durch die Darmschleimhäute aufgenommen. Ein typisches Vorkommen bei schlecht kontrollierter Colitis ist eine erhöhte Durchlässigkeit der Tight Junctions, was sich in höheren Lactulosespiegeln im Urin äußert. Ein oft genutzter Parameter für die Schädigung des Darmgewebes ist demnach der Quotient der Konzentrationen beider Stoffe – je höher das Verhältnis von Lactulose zu Mannitol, desto stärker ausgeprägt ist der Schaden. Die Aufnahme von FITC-Dextran (M_R ca. 6.000) ins Plasma ist ebenfalls ein Parameter für die Darmpermeabilität. Aufgrund seiner Größe passiert es idealerweise – im gesunden Darm – überhaupt nicht die Epithelbarriere, dies ist erst nach Schädigung der Tight Junctions möglich. Post mortem werden zudem noch Länge und Gewicht des Colons bestimmt, die beide tendenziell mit zunehmender Schwere des Krankheitsverlaufes abnehmen.

4.3.5.1 Erste Colitis-Studie

Die erste der mit JAK-Hemmern durchgeführten Studie wurde mit drei Kandidaten in unterschiedlichen Dosen durchgeführt: Die Tiere bekamen entweder Vehikel (0,5 % Methylcellulose), 1,6 $\mu\text{mol/kg}$ Tofacitinib, 8 $\mu\text{mol/kg}$ **FM-381** oder 0,8 $\mu\text{mol/kg}$ **38**

oral verabreicht. Nach vierzehn Tagen wurde die Studie beendet. Abbruchkriterien (für beide Studien), die zum vorzeitigen Ausscheiden eines Tieres führten waren ein Krankheitsscore von > 4 oder weniger als 80 % des ursprünglichen Körpergewichtes.

Körpergewicht: Wie zu erwarten erlitten alle Tiere während des Versuchs einen krankheitsbedingten Gewichtsverlust, der in den Tagen 8-10 am stärksten ausgeprägt war (**Abbildung 4.71**). Aufgrund des harschen Modells bzw. der hohen DSS-Konzentration im Trinkwasser wurden dabei mitunter Gewichte nahe der Abbruchgrenze erreicht. Ca. ab Tag 10 erholten sich die Tiere wieder in verschiedenen Maßen und die Körpergewichte stabilisierten sich.

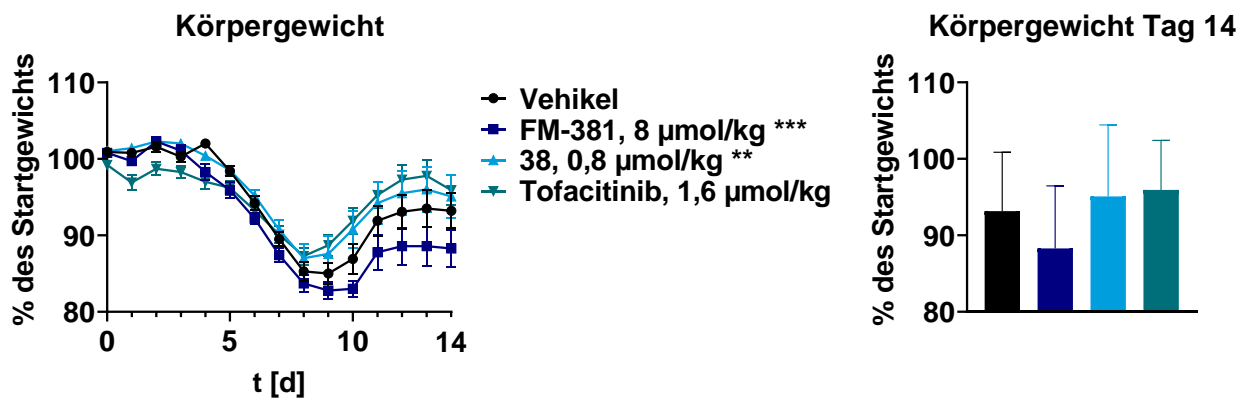


Abbildung 4.71: Durchschnittliche Körpergewichte \pm SEM der Gruppen im Verlauf der Studie (links) bzw. durchschnittliche Körpergewichte \pm SD am letzten Tag der Studie (rechts). Für die mit **38** behandelten Tiere wurde über den Zeitraum betrachtet ein signifikant höheres Körpergewicht ($p < 0,01$) gemessen als in der Vehikelgruppe. Die Behandlung mit dem höher dosierten **FM-381** führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,001$). $n = 10$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Die Behandlung mit **38** und Tofacitinib hatte einen positiven Effekt hinsichtlich des Körpergewichts, der sich aber erst im späteren Verlauf der Studie hervortat. Für **38** waren die Unterschiede statistisch signifikant ($p < 0,01$). Unter Therapie mit **FM-381** kam es dagegen zu einer signifikanten ($p < 0,001$) Reduktion des Körpergewichts, das auch in der Stabilisierungsphase weiterhin unter dem der Vehikelgruppe lag. Die höchsten Durchschnittsgewichte zum Terminationszeitpunkt wurden für die Tofacitinib- und die **38**-Gruppe festgestellt, während die mit **FM-381** behandelte Gruppe deutlich darunterlag. Aufgrund hoher Streuung der Werte bestand aber für keine der Gruppen statistische Signifikanz ggü. Vehikel.

Score und Überlebensrate: Die ersten Symptome (Stuhlerweichung, im späteren Verlauf Durchfälle und ggf. Blut) traten schon ab dem dritten Tag auf und verschlimmerten sich zunehmend bis ungefähr Tag 10, ab dem sie sich – ähnlich wie beim Körpergewicht – stabilisierten (**Abbildung 4.72**).

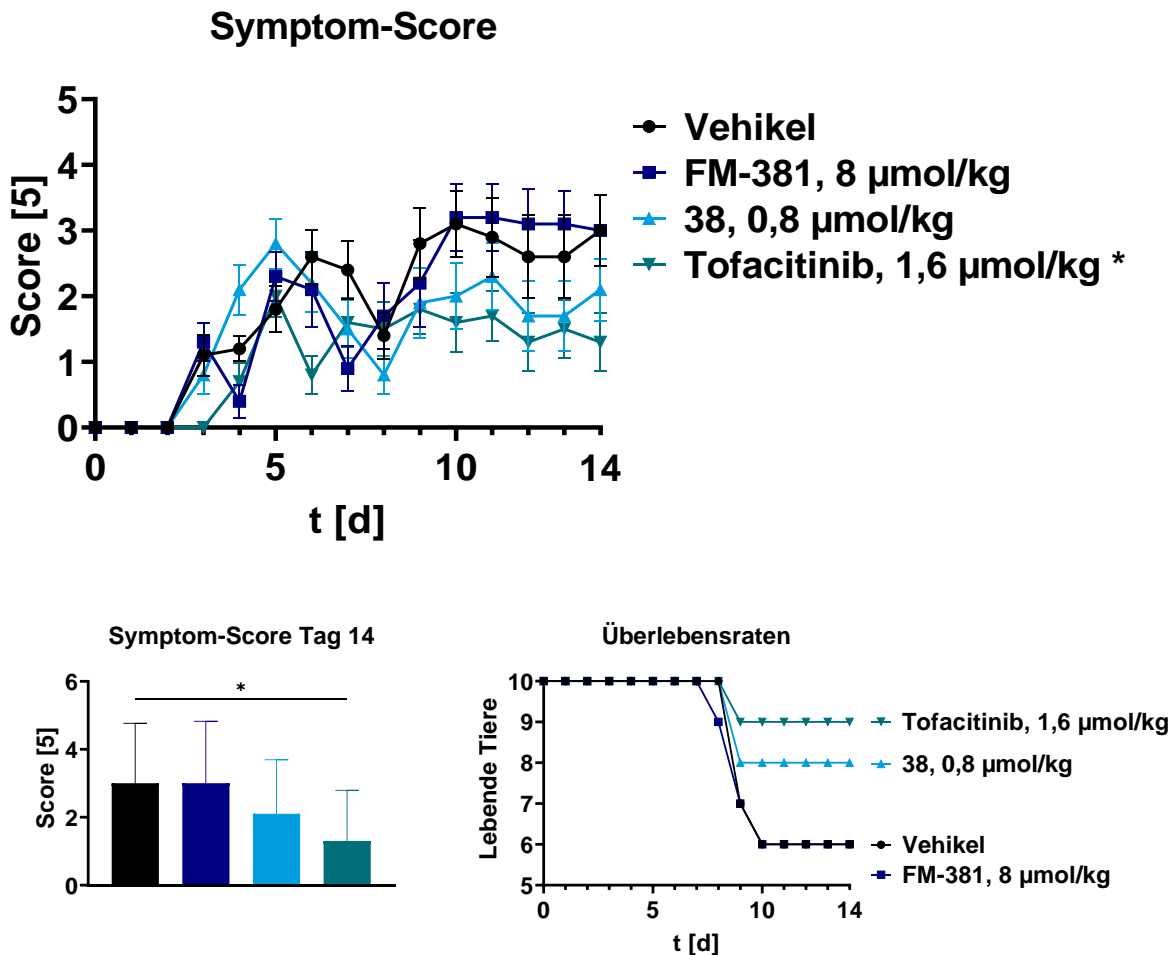


Abbildung 4.72: Durchschnittliche Symptom-Scores \pm SEM der Gruppen im Verlauf der Studie (oben), durchschnittlicher Score \pm SD am letzten Tag der Studie (unten links) sowie Gesamtüberleben (unten rechts). Für die mit Tofacitinib behandelten Tiere wurde über den Zeitraum betrachtet ein signifikant reduzierter Score ($p < 0,05$) festgestellt. $n = 10$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Sowohl über den Gesamtzeitraum betrachtet als auch spezifisch am letzten Studientag wirkten sich **38** und Tofacitinib günstig auf die Symptomatik aus. So lagen die Scores am letzten Studientag um ca. 1 bzw. ca. 2 Punkte niedriger als bei den Vehikeltieren. Für Tofacitinib waren die Unterschiede zum Vehikel statistisch signifikant ($p < 0,05$). In beiden Gruppen überlebten mehr Tiere die Erkrankung als in der Vehikelgruppe, in welcher zu Tag 10 bereits vier von zehn Mäusen verstorben waren. Unter Behandlung mit **FM-381** kam es ebenfalls zum vorzeitigen Ausscheiden von vier Tieren aus der Studie.

Colon-Länge und -Gewicht: Länge und Gewicht der *post mortem* entnommenen Colons wurden ebenfalls erfasst; bei schwereren Verläufen ist durch den Untergang von Darmzotten eine Reduktion der Darmoberfläche und, damit verbunden, Verkürzung des Colons zu erwarten.¹⁸⁶ Das Gewicht ist schwieriger einzuschätzen, da es nicht zwingend ebenfalls abnimmt. Durch Verdickung des Gewebes kann es im Falle einer Entzündung zu einer Erhöhung des Gewicht- zu Länge-Verhältnisses kommen.

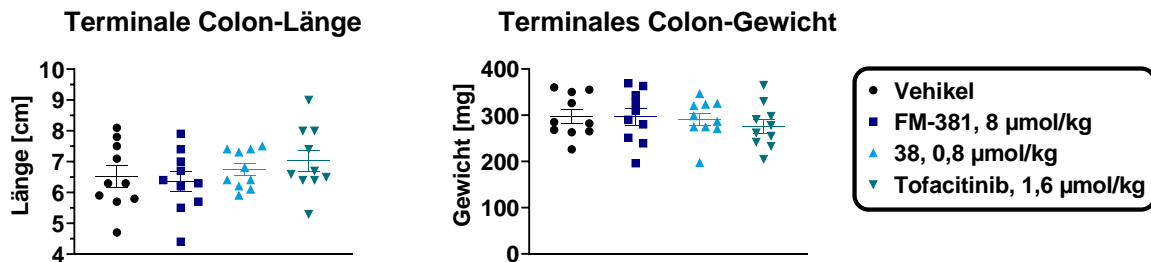


Abbildung 4.73: Colon-Länge (links) bzw. -Gewicht (rechts) der erkrankten Mäuse. Miteinbezogen sind die Werte bereits vorzeitig verstorbener Tiere, die typischerweise deutlich unter dem Durchschnitt lagen. $n = 10$.

Die durchschnittlichen Werte unterschieden sich zwischen den Gruppen nur geringfügig (**Abbildung 4.73**). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Mehrheit der Tiere bis zum letzten Studientag überlebte. Der Zustand der Mäuse hatte sich bis dahin wieder weitgehend stabilisiert, weswegen auch die makroskopischen Unterschiede der Colons wieder geringer ausfallen. Früher verstorbene Tiere hatten dagegen typischerweise deutlich verkürzte und leichtere Colons.

Darmpermeabilität:

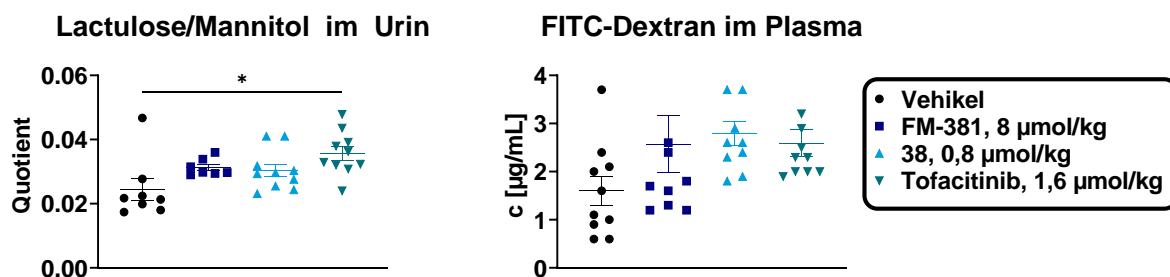


Abbildung 4.74: Zur Einschätzung der krankheitsbedingt erhöhten Permeabilität der Darmwand wurden zwei Parameter erfasst: Zum einen wurde der Quotient aus den im Urin gemessenen Konzentrationen an Lactulose und Mannitol berechnet (links), zum anderen die ins Plasma aufgenommenen Mengen des Fluoreszenzmarkers FITC-Dextran (rechts). Der Lactulose/Mannitol-Quotient war für die Tofacitinib-Gruppe signifikant erhöht. $n = 10$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

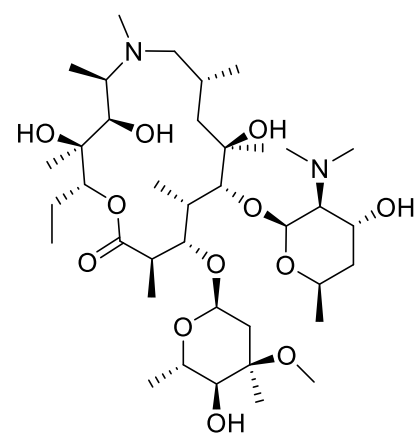
Die Darmpermeabilität schien durch die Behandlungen leicht erhöht zu werden, was bei beiden Erfassungsmethoden (Lactulose/Mannitol-Verhältnis im Urin sowie FITC-Dextran im Plasma) augenscheinlich wurde. Die Unterschiede zur Vehikelgruppe waren

aber überwiegend gering und nur für die Urinwerte der Tofacitinib-Gruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$). Hier ist anzumerken, dass die Erfassung der Darmpermeabilität am Ende des vorliegenden Modells unsicher bzw. nur bedingt sinnvoll ist, da sich die Zustände der überlebenden Tiere zu diesem Zeitpunkt weitestgehend stabilisiert hatten. Eine Erfassung während der Studie (z.B. am Krankheitshöhepunkt) ist allerdings aufgrund des nötigen Nahrungsentzuges nicht zulässig und konnte deshalb nicht durchgeführt werden.

Zusammengefasst zeigten sowohl Tofacitinib als auch **38** positive Effekte auf den Verlauf des Krankheitsmodells und wirkten sich günstig auf Körpergewicht, Schwere der Erkrankung und auf das Gesamtüberleben aus. Die trotz der niedrigen Dosis schon gute Wirksamkeit von **38** lässt sich ggf. durch dessen PK-Eigenschaften erklären: Nach oraler Gabe reicherte sich der Stoff in PK-Studien in hohen mikromolaren Konzentrationen im GI-Trakt an (Kapitel **4.1**, **4.2.1**, **7.1**). Um die Wirksamkeit im Modell zu optimieren, sollten aber sowohl weitere Konzentrationen, als auch andere Darreichungsformen überprüft werden. Die durch das höher dosierte **FM-381** hervorgerufene Verschlechterung des Körpergewichts bei kaum beeinflusstem Score wirft die Frage auf, ob eine starke, selektive JAK3-Hemmung als Therapieansatz ungeeignet ist. Der Stoff ist *in vitro* deutlich potenter als das Makrolidkonjugat **38**; nicht auszuschließen ist eine zu starke lokale Immunsuppression, die das Darmgewebe anfälliger gegenüber Pathogenen macht, die dann durch die geschädigte Darmwand infiltrieren und das Krankheitsbild verstärken. Eine bakterielle Beteiligung bei der Pathogenese von CED, ggf. auch durch kommensale Bakterien, wird schon lange angenommen.

4.3.5.2 Zweite Colitis-Studie

In der zweiten Studie wurden ebenfalls Tofacitinib und **38** verabreicht, sowie die JAK3-Inhibitoren **18**, **29**, **37** und **39**. Bei Letzteren beiden handelt es sich (ebenso wie bei **38**) um Makrolide. Ebenfalls in die Studie eingeschlossen wurde das nicht-antibiotische Azithromycin-Derivat **77** (**Abbildung 4.75**), um die immunomodulatorische Wirkung der Wirkstoffklasse zu erforschen. Zudem sollte so die Interpretation der Effekte der eingesetzten Konjugatwirkstoffe erleichtert werden; ein therapeutischer Erfolg könnte sowohl auf die JAK3-Hemmung als auch auf die unspezifischen Makrolideffekte rückführbar sein. Behandelt wurde oral mit einer recht niedrigen Dosis von 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$. Dadurch sollte getestet werden, ob eine niedrigdosierte Therapie bereits für eine (lokale) Wirksamkeit im GI-Trakt ausreicht; auf diese Art könnten unerwünscht hohe systemische Konzentrationen und damit verbundene Nebenwirkungen vermieden werden. Im Gegensatz zur vorigen Studie bekamen die Tiere außerdem anstelle des regulären, für Schwankungen anfälligen Standard-Tierfutters, Futter vom TYP AIN93M. Es handelt sich dabei um eine strenger definierte „Erhaltungsdiet“, die u.a. nahrungsbedingte



77

Abbildung 4.75: Struktur des nicht-antibiotischen Makrolids **77**. Im Vergleich zu Azithromycin wurden die 2'- und 3'-Substituenten vertauscht.

Variabilitäten in der Studie reduzieren sollte. Wie in anderen Synovo-Studien gezeigt wurde, kann das ballaststoffarme Futter zudem ein proinflammatorisches Milieu begünstigen und für eine robustere Krankheits-Entwicklung sorgen (*Aktuell zur Publikation vorbereitet*).

Körpergewicht: Ähnlich wie bei der ersten Studie (s.o.) nahmen die Körpergewichte der Tiere primär innerhalb der ersten zehn Tage deutlich ab, bevor diese sich wieder teilweise oder vollständig erholten.

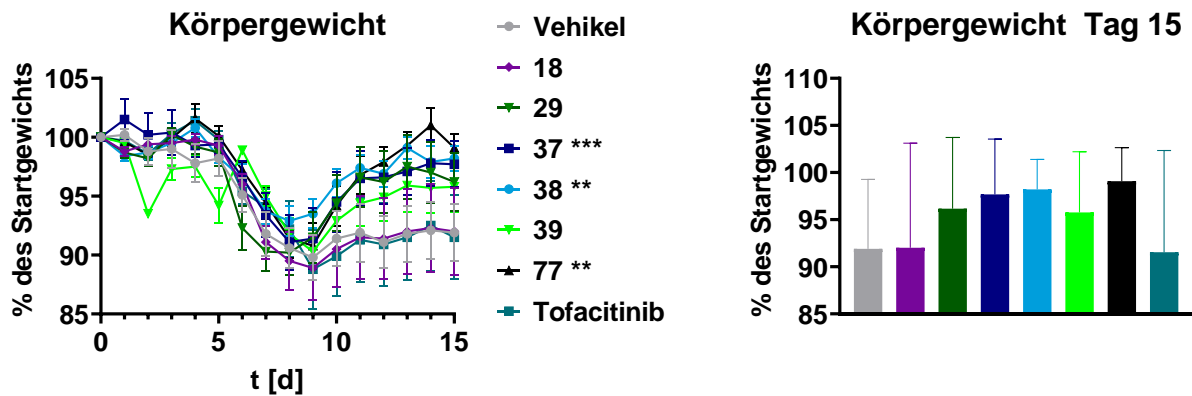


Abbildung 4.76: Durchschnittliche Körpergewichte \pm SEM der Gruppen im Verlauf der Studie (links) bzw. durchschnittliche Körpergewichte \pm SD am letzten Tag der Studie (rechts). Für die mit **37**, **38** und **77** behandelten Tiere wurde über den Zeitraum betrachtet ein signifikant höheres Körpergewicht für **37**, **38** und **77** gemessen als in der Vehikelgruppe. $n = 8$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Die eingesetzten Testsubstanzen unterschieden sich bisweilen deutlich in ihrem Einfluss auf das Körpergewicht: So schützten die Vergleichssubstanz Tofacitinib und das N-methylpiperidin **18** nicht vor Gewichtsverlust. Besser schnitten die anderen Substanzen ab: Für **37**, **38** und **77** waren die Körpergewichte vor allem in der späteren Phase signifikant erhöht ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$). Zum Terminationstag hatten die Tiere in diesen Gruppen wieder ungefähr ihr ursprüngliches Körpergewicht erreicht. Generell wurde eine relativ breite Streuung der Messwerte beobachtet, die das individuelle Ansprechen der Tiere auf das DSS-Wasser verdeutlicht (Grund sind ggf. auch unterschiedliche Mengen an getrunkenem Wasser, Daten nicht aufgeführt).

Score und Überlebensrate: Erneut entwickelte sich – nach einer ca. dreitägigen asymptomatischen Phase – relativ rasch das erwartete Krankheitsbild, in ähnlicher Schwere wie bei der ersten Studie (**Abbildung 4.77**). Am stärksten ausgeprägt war die Symptomatik in den meisten Gruppen in den Tagen 6 bis 8.

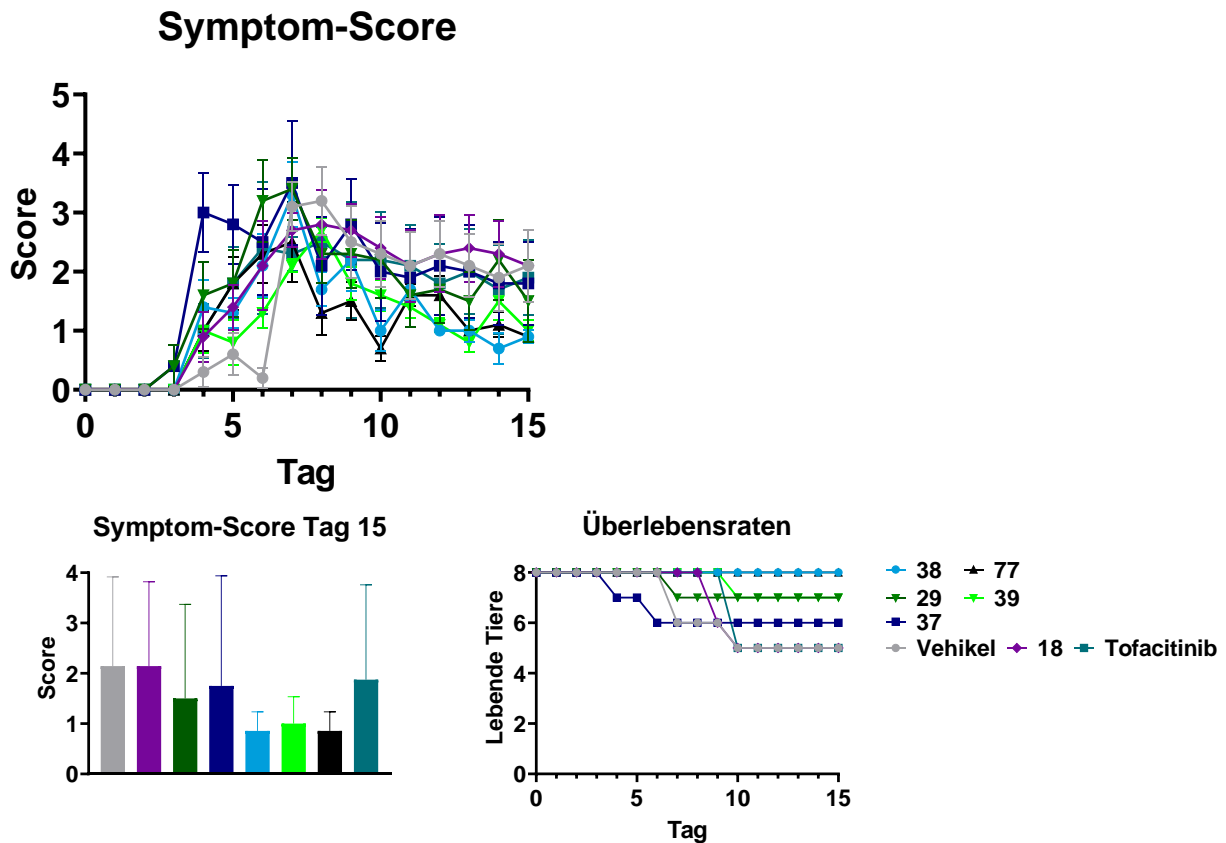


Abbildung 4.77: Durchschnittliche Symptom-Scores \pm SEM der Gruppen im Verlauf der Studie (oben), durchschnittlicher Score \pm SD am letzten Tag der Studie (unten links) sowie Gesamtüberleben (unten rechts). $n = 8$.

Generell waren der Verlauf des Körpergewichts und des Scores einer Gruppe miteinander verknüpft: Gruppen mit höheren Scores wiesen ein niedrigeres Gewicht auf und umgekehrt. Die höchsten Scores wurden für die Vehikelgruppe sowie unter Behandlung mit **18**, Tofacitinib und **37** festgestellt. Für letztere Gruppe ist dies angesichts der zuvor gezeigten positiven Wirkung auf den Gewichtserhalt überraschend. Die niedrigsten Symptom-Scores hatten Tiere, die mit **38** oder **77** behandelt worden waren. Auch am Ende der Studie waren die erwähnten Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich. Aufgrund hoher Streuung der Scores, vor allem in der Vehikelgruppe, waren diese aber statistisch nicht signifikant. Nur in den **38**- bzw. **77**-Gruppen überlebten alle Mäuse bis zum Ende der Studie. Am meisten Tiere (jeweils drei) verstarben in der Vehikelgruppe bzw. unter Therapie mit Tofacitinib oder **18**.

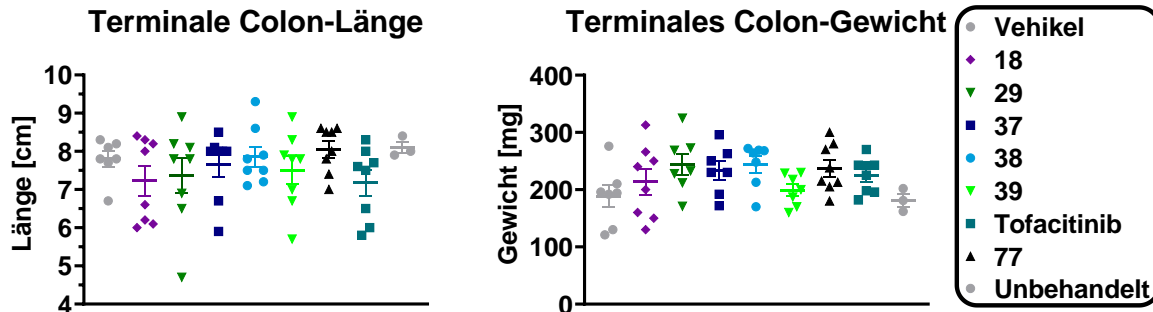
Colon-Länge und –Gewicht:

Abbildung 4.78: Colon-Länge (links) bzw. –Gewicht (rechts) der erkrankten Mäuse. Miteinbezogen sind die Werte bereits vorzeitig verstorbener Tiere, die typischerweise deutlich unter dem Durchschnitt lagen. NTC = unbehandelte (gesunde) Kontrolltiere. $n = 8$.

Wie bei der ersten Studie fielen die Längen und Gewichte der Colons zwischen den Gruppen relativ ähnlich aus, da sich die Tiere zum Terminationszeitpunkt schon wieder erholt hatten. Generell wurde für die behandelten Mäuse ein im Vergleich zur Vehikelgruppe erhöhtes Colon-Gewicht festgestellt, v.a. unter Gabe von **29**, **38** und **77**. Die Unterschiede waren aber nicht statistisch signifikant. Interessanterweise waren die Gewichte auch gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Gewichtssteigerung auch durch entzündungsbedingte Verdickung bzw. Hyperplasie des Gewebes zustande kam; dies wäre aber auch in der schwer erkrankten Vehikelgruppe zu erwarten. Wahrscheinlicher ist, dass die erhöhten Colon-Gewichte mit dem – relativ zu Vehikel – erhöhten Körpergewicht einhergingen. Setzt man die beiden Parameter in Relation zueinander (**Abbildung 4.79**), ist eine geringfügige Steigerung gegenüber der Vehikelgruppe feststellbar.

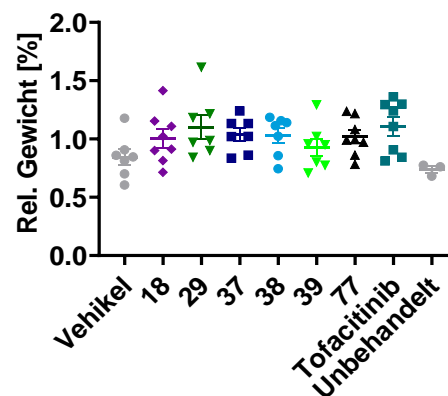
Verhältnis Colon- zu Körpergewicht

Abbildung 4.79: Prozentualer Anteil der Colonmasse am Gesamtkörpergewicht.

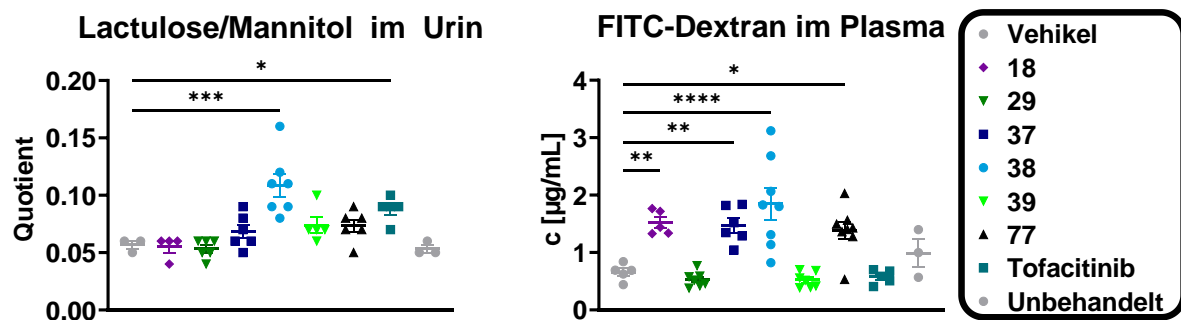
Darmpermeabilität:

Abbildung 4.80: Zur Einschätzung der krankheitsbedingt erhöhten Permeabilität der Darmwand wurden zwei Parameter erfasst: Zum einen wurde der Quotient aus den im Urin gemessenen Konzentrationen an Lactulose und Mannitol berechnet (links), zum anderen die ins Plasma aufgenommenen Mengen des Fluoreszenzmarkers FITC-Dextran (rechts). Der Lactulose/Mannitol-Quotient war für die **38**- und die Tofacitinib-Gruppe signifikant erhöht. Für **18**, **37**, **38** und **77** waren auch die im Plasma erfassten Konzentrationen an FITC-Dextran signifikant gesteigert. NTC = unbehandelte Kontrolltiere. $n = 3-8$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Sowohl der Lactulose/Mannitol-Quotient als auch die FITC-Dextran Plasmakonzentration waren in einigen Gruppen deutlich gegenüber der Vehikelgruppe erhöht. Dies ist insofern verwunderlich, weil erhöhte Werte für eine gesteigerte Permeabilität des Darmgewebes sprechen; die höchsten Werte wurden aber in Gruppen gefunden, die nach anderen Parametern (Körpergewicht, Score, Überleben) betrachtet gesünder waren als andere. Besonders die mit **38** behandelte Gruppe fällt hier auf: Beide Permeabilitäts-Marker waren signifikant ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,0001$) erhöht, obwohl es sich um eine der Gruppen mit den besten anderweitigen Readouts handelte. Dass beide Marker bei der Vehikelgruppe kaum erhöht gegenüber jenen der gesunden Kontrolltiere waren ist ebenfalls verwunderlich, bedenkt man den schweren Krankheitsverlauf (s.o.) in dieser Gruppe. Dementsprechend sollte dieser Teil der Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden.

Histologie: Zusätzlich zu den aus der ersten Studie übernommenen Parametern wurde der Zustand der Tiere *post mortem* auch histologisch untersucht. Colons wurden per Swiss Roll Technik präpariert und das Gewebe eingefärbt, um Zellen bzw. deren Kerne sichtbar zu machen. Anhand mikroskopischer Untersuchung der Proben wurde der Gewebeschaden erfasst und für jedes Tier ein Histologie-Score (**Abbildung 4.81**) vergeben, der Faktoren wie den Zustand der Krypten und Submukosa sowie Schwere und Ausbreitung der Entzündung beinhaltet.

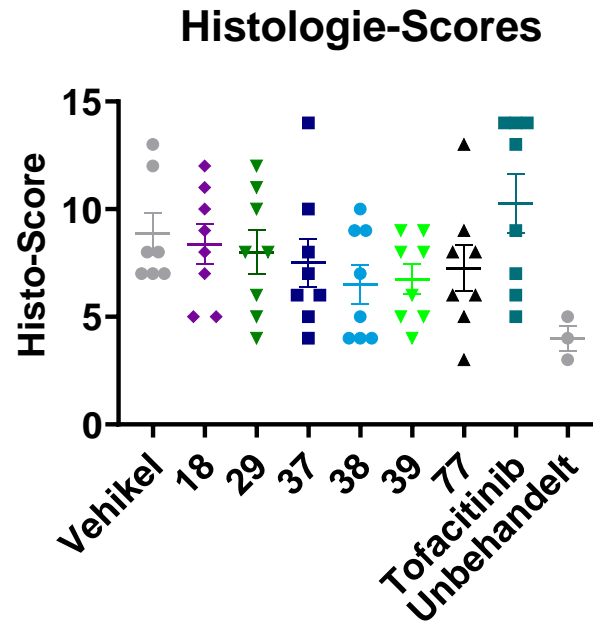


Abbildung 4.81: Histologie-Scores der Colon Swiss Rolls. Der Score berechnet sich aus der in einer Stichprobe der Gewebeprobe erfassten Schwere und Ausbreitung der Entzündung, dem an den Krypten beobachteten Schaden sowie dem Grad der Zerstörung der Submukosa. $n = 8$.

Grundsätzlich waren die Colons in schlechtem Zustand und durch das Krankheitsmodell sichtlich geschädigt. Dazu muss aber erwähnt werden, dass auch in den gesunden Kontrolltieren bereits Schäden festgestellt wurden. Zurückführen lässt sich dies auf das verwendete AIN93M-Futter, das durch seinen sehr geringen Ballaststoff-Anteil selbst schon für proinflammatorische Bedingungen im GI-Trakt sorgen kann. Dementsprechend sollten auch die Proben der anderen Gruppen, die ebenfalls dieses Futter erhielten, mit Vorsicht betrachtet werden, da von einer gewissen Grundschädigung ausgegangen werden muss.

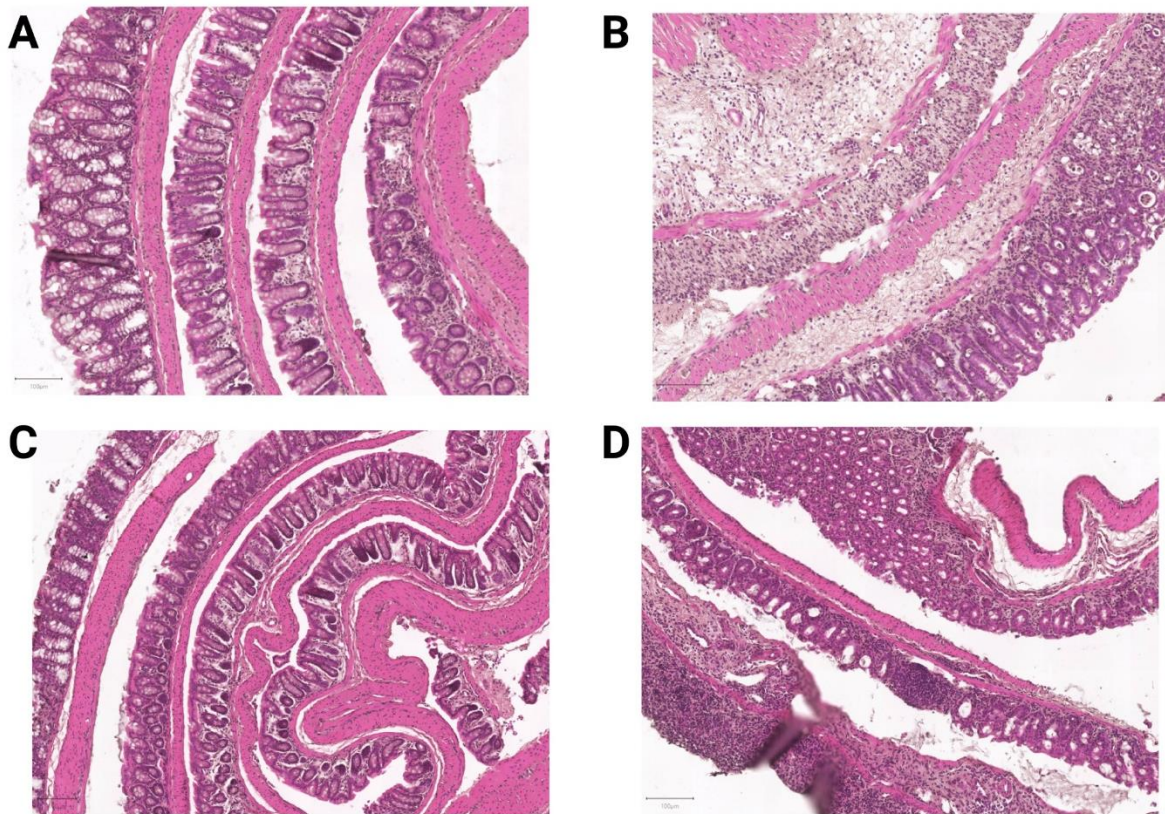


Abbildung 4.82: Beispiel-Auszüge der aus den Swiss Rolls angefertigten histologischen Aufnahmen. **A:** **38**; **B:** Tofacitinib; **C:** **77**; **D:** Vehikel. Vor allem **B** und **D** zeigen starke Schädigung, die sich durch Erosion der Zellschichten, Ablösung der Submukosa von den darunterliegenden Zellen und Strukturverlust äußert. Die Proben wurden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Abbildung 4.82. zeigt repräsentative Nahaufnahmen der Colons vier verschiedener Gruppen. Während bei den mit **38** oder **77** behandelten Colons (**A**, **C**) noch klare Strukturen erkennbar sind (Krypten vorhanden, Submukosa liegt gut auf), kam es in der Tofacitinib- und der Vehikelgruppe (**B**, **D**) zum deutlichen Verlust der Gesamtstruktur. Typisch war eine massive Infiltration von Immunzellen und wechselhaft Hyper- bzw. Atrophie der Becherzellen. Unter schwer entzündlichen Zuständen kann es auch zur Ablösung der Submukosa bzw. der Entstehung von Lücken darin kommen. In geringerem Ausmaße wurden die genannten Schäden aber für alle Gruppen, auch unter Behandlung mit **38** oder **77**, beobachtet.

Zusammengefasst konnten mehrere der eingesetzten JAK3-Hemmer, insbesondere **38**, auch bei der niedrig angesetzten Dosis Wirksamkeit im Modell zeigen und sich positiv auf Erhalt des Körpergewichts, bzw. Linderung der Symptomatik und Gewebeschädigung auswirken. Tofacitinib schnitt deutlich schlechter ab, was im Hinblick auf die gute Wirksamkeit in der ersten Studie (bei ähnlicher Dosis) verwunderlich ist. Für die weniger wirksamen der eingesetzten Kandidaten wäre zu prüfen, ob eine Dosissteigerung ebenfalls zum gewünschten Effekt führt; im Gegensatz zu den in anderen Studien eingesetzten Dosen (z.B. EAE, LPS-Challenge, s.o.) waren die Stoffe vermutlich unterdosiert.

Auch die Gabe des nicht-antibiotischen Makrolids **77**, das kein JAK-Hemmer ist, führte zu guten Ergebnissen. In Anbetracht dessen stellt sich die Frage, zu welchem Anteil

die gute Wirksamkeit der Makrolidkonjugate (**37-39**) auf die immunmodulierende Wirkung des Azithromycin-Carriers zurückzuführen ist, und wieviel rein durch Hemmung der JAK3 erreicht werden kann.

4.3.5.3 Dritte Colitis-Studie

In einer nachfolgenden dritten Colitis-Studie sollte nun der vielversprechendste Kandidat, **38**, in verschiedenen Dosen (0,3 / 1 / 3 $\mu\text{mol/kg}$ p.o. einmal täglich) verglichen werden. Der Dosisbereich war relativ schmal, da mit der mittleren Dosis ja bereits gute Ergebnisse erzielt worden waren. Das allgemeine Studiendesign entsprach den vorigen Studien, allerdings wurde wieder reguläres Futter verabreicht. Als Vergleichssubstanzen wurden **FM-381** und Tofacitinib gegeben. Ersteres wurde in zwei Dosen, 0,3 und 1 $\mu\text{mol/kg}$ p.o. verabreicht. Tofacitinib wurde dieses Mal in einer wesentlich höheren Dosis von 60 $\mu\text{mol/kg}$ p.o. gegeben. Dies entspricht (berechnet auf das Molekulargewicht des Citrat-Salzes), einer Dosis von ca. 30 mg/kg, einer in der Literatur häufig vorgefundenen Dosis für Tofacitinib in Mausmodellen.^{124,188}

Körpergewicht: Wieder wurde als primärer Parameter des Zustandes der Tiere das Körpergewicht täglich erfasst (**Abbildung 4.82**):

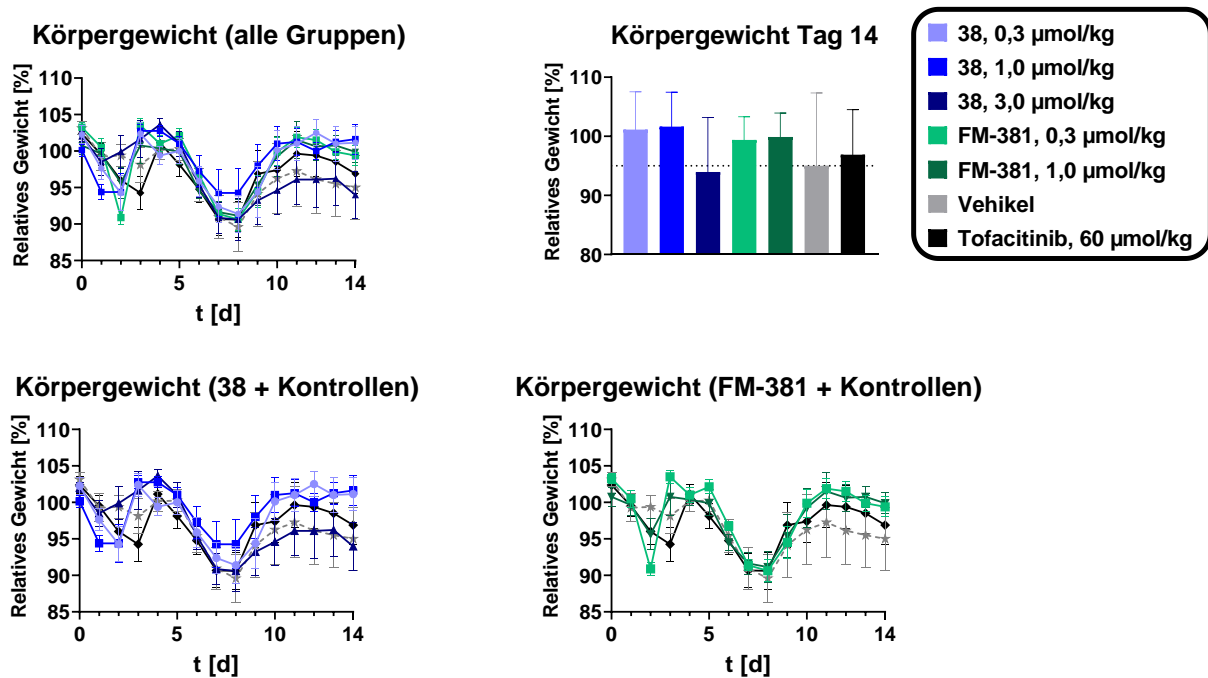


Abbildung 4.82: Durchschnittliche Körpergewichte \pm SEM aller Gruppen im Verlauf der Studie (oben links) bzw. durchschnittliche Körpergewichte \pm SD am letzten Tag der Studie (oben rechts). Zur besseren Übersicht sind die Körpergewichte für die **38**- und Kontrollgruppen erneut unten links dargestellt, die **FM-381**- und Kontrollgruppen unten rechts. Beide JAK3 Inhibitoren hatten grundsätzlich einen Vorteil gegenüber Tofacitinib beim Erhalt des Körpergewichts. Am wirksamsten erwies sich die mittlere Dosis von **38** (1 $\mu\text{mol/kg}$). Die beiden **FM-381**-Dosen führten zu ähnlichen Werten. $n = 8$.

Sowohl mit **FM-381** als auf **38** konnte eine Steigerung des durchschnittlichen Körpergewichts der Tiere erreicht werden. Am wirksamsten war dabei die mittlere Dosis **38** (1 $\mu\text{mol/kg}$), gefolgt von der niedrigen Dosis (0,3 $\mu\text{mol/kg}$). Die beiden Dosen

von **FM-381** waren in Bezug auf das Körpergewicht mit 0,3 µmol/kg **38** vergleichbar. Die Ergebnisse waren aber aufgrund der hohen Streuung in der Vehikelgruppe nicht signifikant. Bis auf das hochdosierte **38** (3 µmol/kg) waren alle Behandlungen Tofacitinib gegenüber überlegen. Die mit Tofacitinib oder 3 µmol/kg behandelten Mäuse unterschieden sich in ihrem Gewicht kaum von den Vehikeltieren.

Score und Überlebensrate: Die Symptom-Scores wurden durch alle Behandlungen gesenkt, es bestanden jedoch wesentliche Unterschiede zwischen den Stoffen und Dosen (**Abbildung 4.83**). Insgesamt verlief die Studie milder als die vorige und es verstarben weniger Tiere vor Studienende. Dies ist am wahrscheinlichsten auf den Austausch der ballaststoffarmen AIN93M Diät auf Standardfutter zurückzuführen, da alle anderen Parameter der zweiten Studie beibehalten worden waren.

Die höchste Wirksamkeit zeigte Tofacitinib, durch dessen Gabe die durchschnittliche Score-AUC signifikant verringert wurde (Vehikel-AUC 19,5 vs. Tofacitinib-AUC 11,7). Die mittlere Dosis von **38** (1 µmol/kg) erwies sich als fast genauso effektiv (AUC 12,8 und $p < 0,01$). Die beiden mit **FM-381** behandelten Gruppen hatten im Vergleich dazu höhere Scores, unterschieden sich aber nur geringfügig untereinander (0,3 µmol/kg AUC 15,4, 1 µmol/kg AUC 15,1). Die niedrig und hoch dosierten **38** Gruppen hatten unter den behandelten Tieren im Schnitt die höchsten Scores (0,3 µmol/kg AUC 16, 3 µmol/kg AUC 18,1), diese lagen aber immer noch unter den Vehikelwerten. Auffällig war bei allen behandelten Gruppen eine deutliche Verbesserung der Symptome in den letzten 3-4 Tagen der Studie, besonders für die JAK3 Inhibitoren. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Verschiebung der Zellpopulationen hin zu einem höheren Anteil regulatorischer T-Zellen (s.u., *Durchflusszytometrie*), die überwiegend anti-inflammatorische Funktionen ausüben und sich günstig auf den Krankheitsverlauf auswirken dürften.

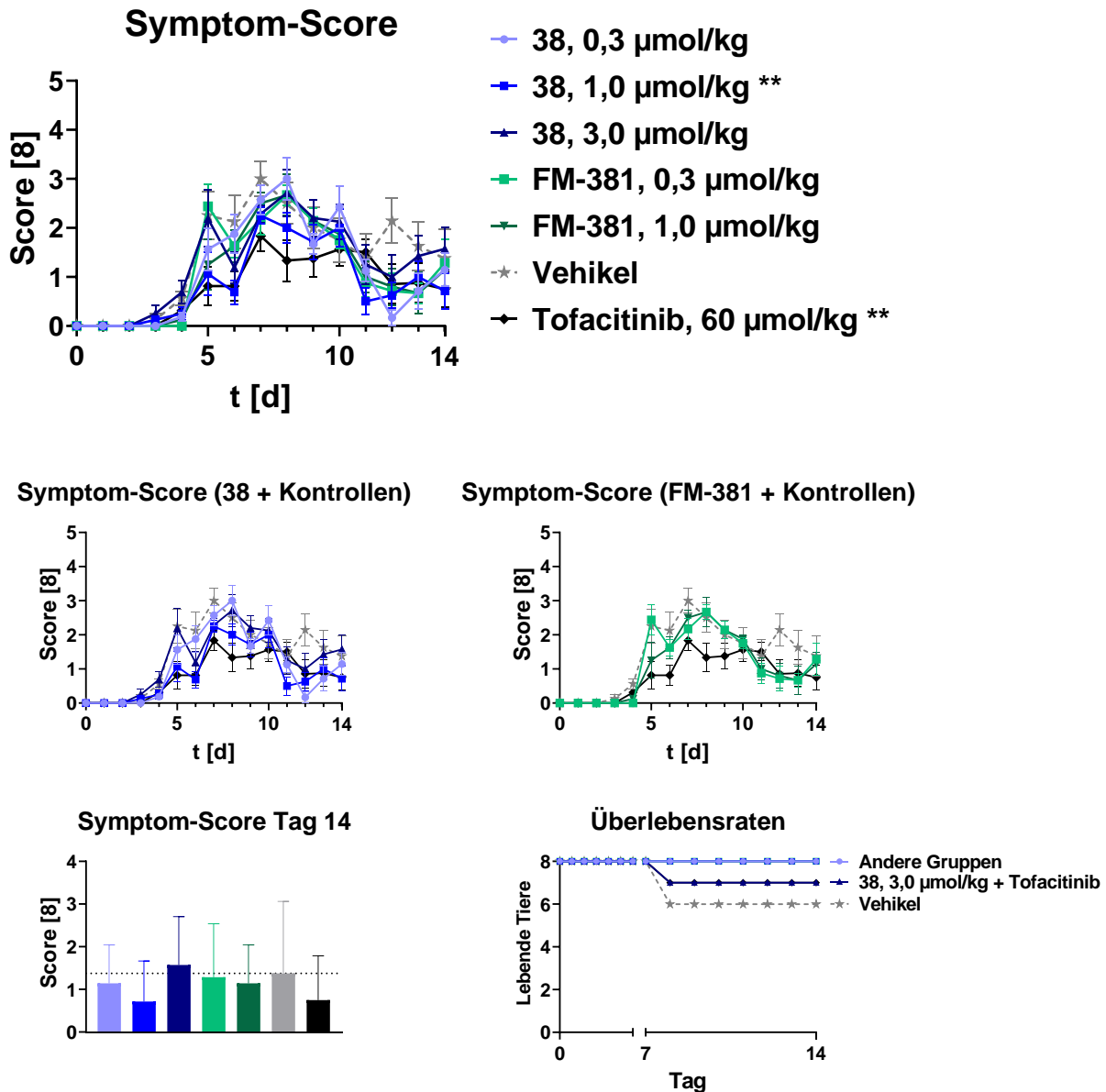


Abbildung 4.83: Durchschnittliche Symptom-Scores \pm SEM aller Gruppen im Verlauf der Studie (oben links), durchschnittlicher Score \pm SD am letzten Tag der Studie (unten links) sowie Gesamtüberleben (unten rechts). Zur besseren Übersicht sind die Körpergewichte für die **38**- und Kontrollgruppen erneut mittig links dargestellt, die **FM-381**- und Kontrollgruppen mittig rechts. Die mit Tofacitinib behandelten Tiere hatten im Schnitt die niedrigsten Symptom-Scores. Von den JAK3 Inhibitoren hatte **38** mit 1 µmol/kg den besten Effekt. $n = 8$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Insgesamt schieden vier Tiere vorzeitig aus der Studie aus, darunter eine in der mit 3 µmol/kg **38** behandelten Gruppe, eine in der Tofacitinib-Gruppe und zwei in der Vehikelgruppe. Aufgrund des Erreichens eines Abbruchkriteriums (in allen Fällen ein Gewicht < 80 % des Startgewichts für über einen Tag) wurden diese Tiere euthanasiert.

Colonlänge und –gewicht: Durch die induzierte Colitis kam es erneut zu einer Verkürzung der Colons bei gleichzeitig erhöhtem Gewicht, ein Indiz für die vorliegende Entzündung und Colonhyperplasie (**Abbildung 4.84**).

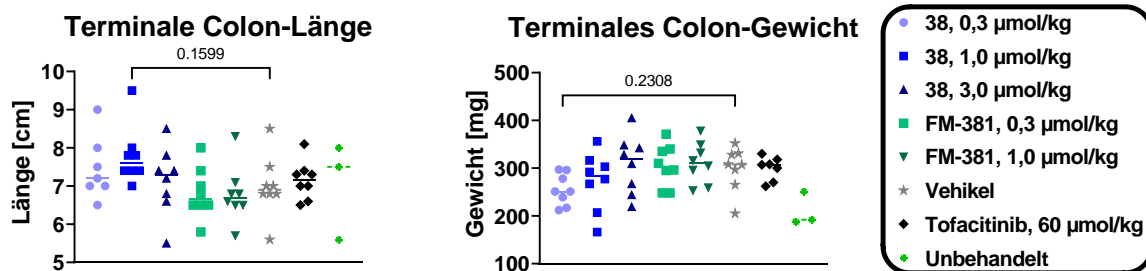


Abbildung 4.84: Colon-Länge (links) bzw. –Gewicht (rechts) der erkrankten Mäuse. Miteinbezogen sind die Werte bereits vorzeitig verstorbener Tiere. Mit **38** behandelte Tiere hatten im Schnitt längere Colons als die Vehikeltiere, und das Colongewicht in den 0,3 bzw. 1,0 µmol/kg Gruppen war gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Beide Parameter waren aber statistisch nicht signifikant. $n = 8$.

Wie in den vorigen Studien lag besonders bei der Colonlänge eine hohe individuelle Streuung zwischen den Tieren vor. Im Schnitt waren die Colons der mit **38** oder Tofacitinib behandelten Tiere länger als in der Vehikelgruppe; die höchsten Werte ergaben sich für die mittlere Dosis von 1 µmol/kg (nicht signifikant erhöht, $p = 0.16$). In den beiden **FM-381** Gruppen lag durchschnittlich eine leichte, nicht signifikante Verkürzung vor.

Die mittleren Colongewichte waren in allen Gruppen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöht. Gegenüber den Vehikeltieren hatten mit 0,3 oder 1 µmol/kg **38** behandelte Mäuse ein verringertes Colongewicht. Andere Gruppen entsprachen in etwa der Vehikelgruppe oder lagen leicht darüber. Das gleiche Muster zeigte sich auch, wenn man die Colonmassen mit dem gesamten Körpergewicht der jeweiligen Maus in Relation setzte (**Abbildung 4.85**, links).

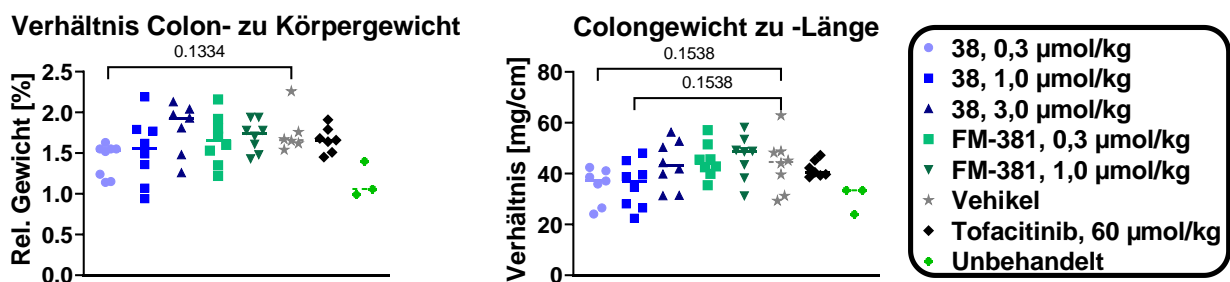


Abbildung 4.85: Prozentualer Anteil der Colonmasse am Gesamtkörpergewicht (links) und Verhältnis der individuellen Colongewichte zu deren Längen (rechts). In kranken Tieren war das relative Gewicht erhöht aufgrund entzündungsbedingter Hyperplasie. Unter Behandlung mit niedrig oder mittel dosiertem **38** kam es zu einer (nicht signifikanten) Senkung des relativen Gewichts. Für die Gewicht-zu-Länge-Verhältnisse waren die Befunde ähnlich. Hier wurde allerdings keine Erhöhung durch die 3,0 µmol/kg **38** Behandlung festgestellt. $n = 8$.

Die mit niedrigdosiertem **38** behandelten Tiere zeigten dabei die niedrigsten Gewichtsverhältnisse und waren im Mittel den gesunden Kontrolltieren am nächsten. Die Unterschiede zur Vehikelgruppe waren statistisch nicht signifikant ($p = 0.14$). Ein ähnliches Muster ergab sich für die Gewichts-zu-Länge-Verhältnisse (**Abbildung 4.85**, rechts) der Colons: Tiere die 0,3 oder 1 µmol/kg **38** bekamen hatten leichtere bzw. längere Colons als Vehikeltiere ($p = 0.15$ für beide Gruppen). Die Daten legen

insgesamt nahe dass niedrige Dosen (0,3-1 $\mu\text{mol/kg}$) von **38**, nicht aber **FM-381**, für eine Verringerung der Colonyhyperplasie sorgten.

Darmpermeabilität: Erneut wurde am letzten Studientag die Darmpermeabilität durch die Bestimmung von Lactulose und Mannitol aus dem Urin (**Abbildung 4.86**, links) bzw. FITC-Dextran aus dem Plasma (**Abbildung 4.86**, rechts) erfasst.

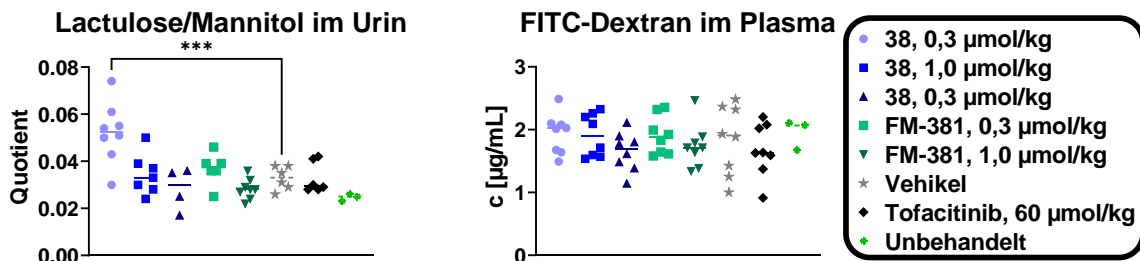


Abbildung 4.86: Zur Einschätzung der krankheitsbedingt erhöhten Permeabilität der Darmwand wurden zwei Parameter erfasst: Zum einen wurde der Quotient aus den im Urin gemessenen Konzentrationen an Lactulose und Mannitol berechnet (links), zum anderen die ins Plasma aufgenommenen Mengen des Fluoreszenzmarkers FITC-Dextran (rechts). Der Lactulose/Mannitol-Quotient war für die mit 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ **38** behandelten Tiere signifikant erhöht. Die Plasmakonzentrationen an FITC-Dex unterschieden sich in den Gruppen nicht signifikant voneinander und entsprachen in etwa jenen gesunder Tiere. $n = 8$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

In den meisten Gruppen entsprach der mittlere Lactulose-Mannitol-Quotient in etwa dem der Vehikelgruppe und war gegenüber völlig gesunden Tieren erhöht. Wie schon in der vorigen Studie war der Quotient paradoxerweise in einer der mit **38** behandelten Gruppen signifikant erhöht. Die Dosis betrug hier aber 0,3 statt 1 $\mu\text{mol/kg}$. Erneut steht die erhöhte Darmpermeabilität im Gegensatz zum anderweitig guten Zustand der Tiere. Die FITC-Dextran Plasmawerte waren in allen Gruppen, inklusive der gesunden Kontrollgruppe, ähnlich. Es handelt sich bei den Signalen also eher um Hintergrundabsorption oder eine geringe, offenbar auch von gesunden Tieren aufgenommene Menge FITC-Dextran. Sinnvoller wäre wie bereits diskutiert eine Gabe früher in der Studie, zum Höhepunkt der Symptomschwere. Rechtlich war dies aber aufgrund des dazu erforderlichen Nahrungsentzuges nicht durchführbar.

Durchflusszytometrie: Die Splenozyten-Populationen der Tiere wurden auf ihre Zusammensetzung bestimmter Subpopulationen untersucht (**Abbildung 4.87**). Genauer genommen lag der Fokus auf der Gruppe der CD4^+ -Zellen („T-Helferzellen“) und deren Anteil an regulatorischen T-Zellen. Diese T_{reg} Zellen lassen sich unter anderem durch das Oberflächenprotein CD25 erkennen, eine Untereinheit des IL-2 Rezeptors die primär bei T_{reg} , seltener bei den IL-2 Rezeptoren anderer T-Effektorzellen zu finden ist.¹⁸⁹ Ein zweiter, intrazellulärer Marker den T_{reg} Zellen exprimieren, ist FOXP3. Dieser für die T_{reg} Funktion wichtige Transkriptionsfaktor ist im Gegensatz zu CD25 intrazellulär lokalisiert und deutlich spezifischer für T_{reg} Zellen.¹⁹⁰ Dreifach positiv gefärbte, also $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+/\text{FOXP3}^+$ -Zellen, lassen sich sehr zuverlässig den T_{reg} Zellen zuordnen. Im Gegensatz zur chronologisch früheren Arthritis-Studie (Kapitel 4.3.6) wurde eine breitere Analyse durchgeführt und noch weitere Oberflächenmarker gefärbt, darunter CD3 (T-Zellen, sowohl CD4^+ als auch CD8^+), CD11b (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen), CD8

(zytotoxische T-Zellen) und B220 (B-Zellen). Die Analyse beschränkte sich auf jeweils eine Gruppe pro Wirkstoff.

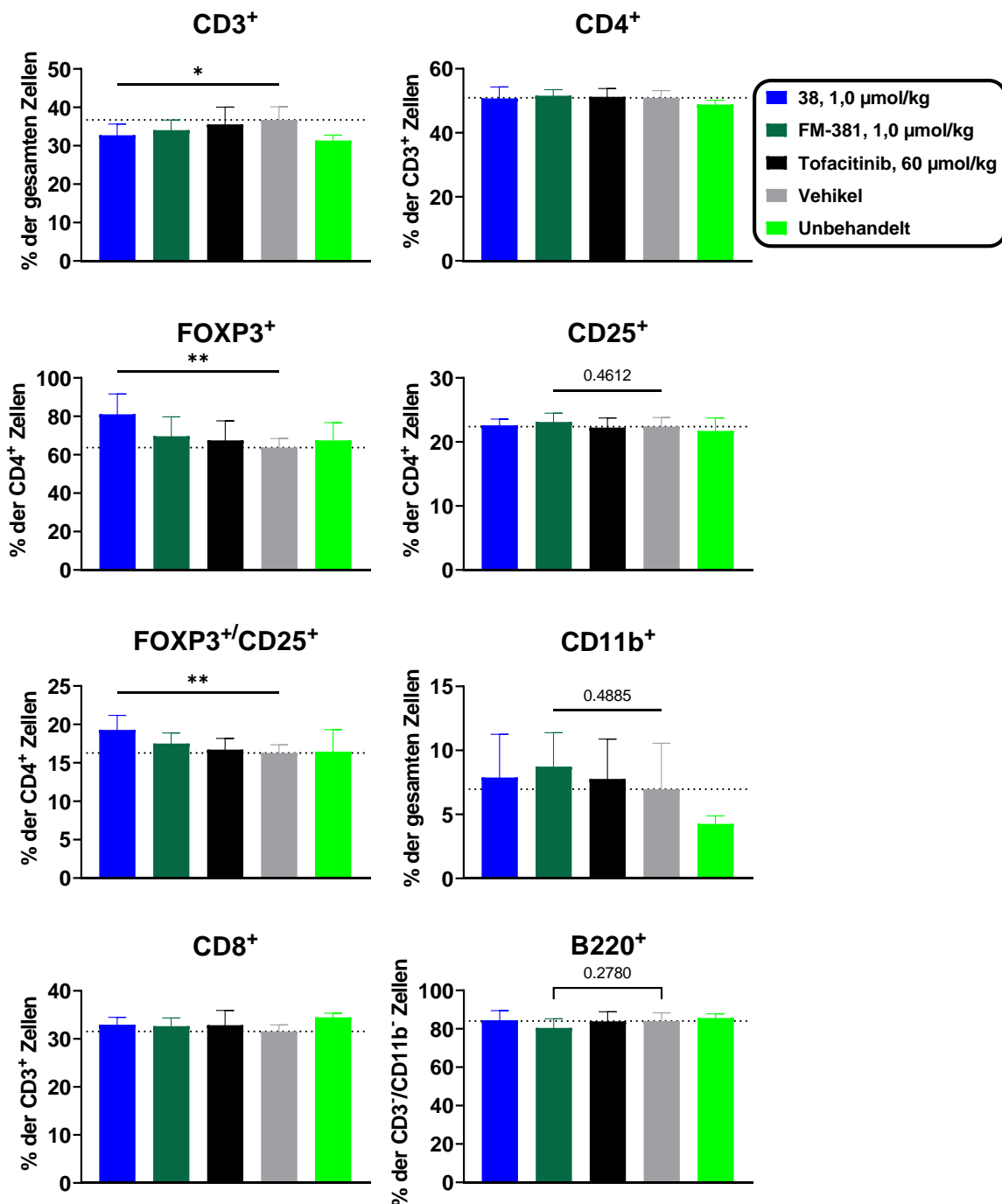


Abbildung 4.87: Durchflusszytometrische Analyse der aus Milzproben isolierten Zellpopulationen. Die Behandlung mit **FM-381** und **38** führte zu einem (für **38** signifikanten) Anstieg des Anteils regulatorischer, CD25/FOXP3 doppelpositiver T-Zellen. Zusätzlich hatten mit **FM-381** behandelte Tiere einen nicht signifikant erhöhten Anteil an CD25⁺ Zellen, während durch Gabe von **38** die FOXP3⁺ Subpopulation expandiert wurde. Der Anteil CD11b⁺ Zellen wurde durch die Behandlungen geringfügig, aber nicht signifikant erhöht, insbesondere mit **FM-381**. Zudem kam es unter **FM-381** zu einer Abnahme der B220⁺ Zellpopulation. $n = 8$. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Regulatorische Zellen: Das hochdosierte Tofacitinib hatte kaum einen Effekt auf die Verhältnisse der Subpopulationen. Unter der Behandlung mit JAK3-Hemmern kam es dagegen zu einem Anstieg des Anteils an T_{reg} Zellen in den Milzen der Tiere: Sowohl in mit **FM-381** als auch **38** behandelten Mäusen (je 1 µmol/kg) wurden mehr FOXP3⁺/CD25⁺ Zellen detektiert. Für die **38**-Gruppe war die Steigerung statistisch signifikant gegenüber der Vehikelgruppe. Die Expansion der T_{reg} Subpopulation bietet einen Erklärungsansatz für den besseren Gesundheitszustand der beiden Gruppen, da hierdurch eine bessere Kontrolle der Entzündungsreaktion zu erwarten ist.

Interessanterweise unterschieden sich die **FM-381**- und die **38**-Gruppen bei den einzeln gefärbten Subpopulationen: Der Anteil an CD25⁺ Zellen wurde durch **FM-381** leicht gegenüber den anderen Gruppen erhöht, nicht aber durch **38**. Der umgekehrte Fall lag wiederum für FOXP3⁺ Zellen vor, die v.a. durch **38** signifikant erhöht wurden. Plausibel ist, dass beide Substanzen durch ihre unterschiedliche Verteilung bzw. Aufnahme in Immunzellen die verschiedenen Subpopulationen der CD4⁺ Zellen unterschiedlich stark beeinflussten. Das gleiche Muster (CD25⁺ Expansion nur durch **FM-381**, FOXP3⁺ Expansion nur durch **38** und Steigerung der CD25⁺/FOXP3⁺ doppelgefärbten Zellen durch beide Substanzen) wurde zuvor in einer weiteren Studie, mit anderem Mausstamm und Krankheitsmodell, beobachtet (Kapitel **4.3.6**). Dort waren die Effekte aufgrund der höheren eingesetzten Dosis (je 16 µmol/kg p.o.) auch von höherer statistischer Signifikanz als bei der Colitis-Studie. Der Behandlungszeitraum war dabei ähnlich lang (13 Tage; hier: 15 Tage).

Dass die T_{reg} Populationen überhaupt durch die JAK3-Hemmer expandiert wurden, erscheint zunächst widersprüchlich. Für die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_{reg} sind sowohl Stimuli durch IL-2 als auch TGF-β nötig.^{189,190} Da der IL-2 Rezeptor auf cytosolischer Seite sein Signal über JAK1/3 weitergibt, ist durch die Behandlung mit **FM-381** oder **38** also eine Blockade des IL-2 Signals zu erwarten, die mit einer verringerten Differenzierung zu T_{reg} Zellen einhergehen würde. Während die Expression von CD25 sehr von IL-2 Stimuli abhängt, ist die FOXP3-Expression davon relativ unabhängig.¹⁸⁹ Dennoch scheint IL-2 auch für bereits gereifte FOXP3⁺ T_{reg} Zellen eine Rolle für deren Zustand und Überleben in der Peripherie zu spielen.^{189,190} Die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen zeigen, dass durch Blockade oder Knockout der JAK3 in T-Zellen eine Gruppe von Zellen mit regulatorischer Funktion induziert werden kann. Diese exprimieren aber weder CD25 noch FOXP3, produzieren aber u.a. IL-10 und TGF-β.^{191,192} Die erhöhten Konzentrationen an TGF-β wiederum könnten zur gesteigerten Induktion „echter“, CD25⁺/FOXP3⁺ T_{reg} Zellen in den Tieren geführt haben. Eine nähere mechanistische Untersuchung oder Erfassung der TGF-β Spiegel waren allerdings nicht mehr im Rahmen dieser Studie.

Andere Oberflächenmarker: Insgesamt kam es unter Behandlung mit 1 µmol/kg der JAK3 Inhibitoren **38** und **FM-381** zu einer (für **38** signifikanten) Verringerung der CD3⁺ Splenozyten (von 37 ± 3 auf 33 ± 3 bzw 34 ± 3%). Der Anteil der CD3⁺ Zellen näherte sich also wieder jenem der gesunden Tiere (31 ± 1 %) an. Der Anteil CD4⁺ Zellen unter den CD3⁺ Zellen (T-Helferzellen inklusive der oben erwähnten T_{reg}) war in allen Behandlungsgruppen nahezu identisch zur Vehikelgruppe und geringfügig höher als bei gesunden Tieren. Kombiniert mit den Ergebnissen zu CD25⁺ und FOXP3⁺ Färbung kam es also zu einer veränderten Zusammensetzung der T-Helferzellen hin zu einer stärker regulatorischen Gesamtpopulation, ohne dass sich deren Gesamtzahlen geändert hätten.

Die CD11b⁺ Population, also überwiegend Zellen der angeborenen Immunantwort, war in allen drei untersuchten Behandlungsgruppen leicht gegenüber der Vehikelgruppe und stark gegenüber gesunden Tieren erhöht. Dies begründet unter Umständen die leicht gesunkenen Anteile der CD3⁺ Zellen (CD11b⁺ Zellen sind CD3-negativ). Bei allen Gruppen inklusive Vehikel lagen aber hohe Streuungen vor, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Die CD8⁺ Populationen unterschieden sich in allen Gruppen nur geringfügig voneinander, ggf. lag eine schwache, nichtsignifikante Erhöhung vor. Aufgrund der Blockade der IL-2 Signale durch die JAK-Hemmer wäre allerdings eher mit einer Senkung zu rechnen gewesen.

Zuletzt wurden noch B220⁺ Zellen, also B-Zellen, erfasst. Die mit 1 µmol/kg **FM-381** behandelten Tiere wiesen eine (nicht signifikant, $p = 0.28$) verringerte B-Zellpopulation auf. Grund könnte die Blockade der IL-4 Signalwege sein: In B-Zellen sorgt IL-4 u.a. für das Überleben der Zellen und deren Wanderung aus der Peripherie in die Milz.¹⁹³ Die Behandlung mit JAK3 Inhibitoren könnte demnach also sowohl die Gesamtzahl der B-Zellen, als auch deren Ansammlung im entnommenen Milzgewebe verringert haben. Dagegen spricht, dass die Senkung nicht in der mit 1 µmol/kg **38** behandelten Gruppe beobachtet wurde.

Histologie: Die histologische Analyse der entnommenen Colons ist auch für diese Studie vorgesehen, war aber zum Abschluss dieser Arbeit noch nicht vollendet worden.

Zusammengefasst zeigten sowohl niedrigdosierte JAK3 Inhibitoren als auch Tofacitinib Wirksamkeit im DSS Colitis-Modell. Während durch Tofacitinib die niedrigsten Scores erreicht wurden, erwiesen sich 1 µmol/kg **38** als am effektivsten zum Erhalt des Körpergewichts. Für **38** ergab sich eine hufeisenförmige Dosis-Wirkbeziehung, bei der die mittlere Dosis die beste Wirksamkeit hatte. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Stoffklasse auch in anderen Studien, z.B. der LPS Challenge (Kapitel **4.3.2.5**) gemacht. Im Falle der Colitis ist denkbar, dass hoch dosierte JAK3-Inhibitoren zu einer zu starken Immunsuppression im Colon führen. Dies würde die Tiere anfälliger gegenüber Darmbakterien machen und schlimmstenfalls zu einer Exazerbation der Symptome führen. Allerdings betrug die Dosierschritte in dieser Studie nur jeweils Faktor 3. Eine Studie mit einem breiteren Dosierbereich wäre angeraten, um die unübliche Dosis-Wirkbeziehung näher zu untersuchen.

4.3.6 Collagen-induced arthritis Modell

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, bei der es zur fortschreitenden Zerstörung der Gelenke kommt. Ein definitiv auslösender Faktor konnte noch nicht identifiziert werden, nach aktuellen Annahmen tragen aber Abnormitäten in den Genen für HLA-DR, einem Klasse II MHC, wesentlich zum Entzündungsgeschehen bei. HLA-DR soll in diesem Falle bestimmte Epitope präsentieren, die Anfälligkeit gegenüber RA vermitteln. Autoreaktive T-Zellen werden nach Bindung an den (auf dendritischen Zellen befindlichen) MHC-Epitop-Komplex aktiviert und lösen eine (primär lokale) Immunantwort aus, die weitere Immunzellen anlockt. Es kommt zur Schädigung des Gewebes durch einwandernde Lymphozyten und Makrophagen sowie durch abbauende Enzyme. Die zentrale, vermittelnde Rolle der T-Zellen wird durch Befunde zahlreicher Tiermodelle unterstützt. Auch die Bildung

von Immunkomplexen durch Autoantikörper und die Aktivierung des Komplementsystems scheinen relevant für die Pathomechanismen zu sein.¹⁹⁴

Grob lässt sich der Verlauf der RA in drei Stadien einteilen: Zunächst betroffen ist die Gelenkinnenhaut oder Synovialis, was sich in Schwellung, Schmerz, Röte, Wärme und Gelenksteifheit äußert. Durch nachfolgende rasche Teilung/Vervielfältigung von dort befindlichen Synovialzellen bildet sich der sog. Pannus, funktionsloses Granulationsgewebe. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Expression kataboler Enzyme zum Abbau von Knochen und Knorpelgewebe, was sich klinisch im Funktionsverlust der betroffenen Gelenke äußert.¹⁹⁵ Die Krankheit geht mit einem hohen Leidensdruck einher und führt, wird sie nicht adäquat behandelt, in vielen Fällen zur Berufsunfähigkeit und stark eingeschränkter Lebensqualität.

Die Behandlung von RA Patienten erfolgt i. d. R. lebenslang mit sogenannten Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs), die die destruktive Immunreaktion einschränken und den Funktionsverlust der Gelenke verlangsamen sollen. Neben den schon seit längerem genutzten DMARDs wie Methotrexat und Leflunomid kamen vor rund fünfundzwanzig Jahren die anti-TNF α Biologicals, wie zum Beispiel der chimäre monoklonale Antikörper Infliximab oder der lösliche TNF α -Rezeptor Etanercept als effektive, aber kostspielige Therapeutika hinzu. Innerhalb der letzten Dekade erhielten schließlich mehrere niedermolekulare JAK-Inhibitoren, darunter Tofacitinib, Baricitinib, Filgotinib und Upadacitinib (Kapitel **1.6.3**), die Zulassung zur Behandlung der RA.

Der Erfolg der JAK-Inhibitoren auf diesem Gebiet lässt sich, zumindest teilweise, durch die Blockade der IL-6- bzw. IL-12/23 Signalwege begründen. Die Pathogenese der RA geht u.a. mit Überproduktion dieser Zytokine einher, welche jeweils über die JAK1 bzw. JAK2 signalisieren.¹⁹⁶ Die JAK3 bindet zwar nicht an die Rezeptoren der genannten Interleukine, in unseren Experimenten (Kapitel **4.2.3** und **4.3.2**) konnte aber gezeigt werden, dass die verwendeten JAK3-Inhibitoren zu einer Senkung der Freisetzung von IL-6 beitragen.

Das am häufigsten untersuchte Tiermodell für rheumatoide Arthritis ist das Collagen Induced Arthritis (CIA) Modell, bei der die Versuchstiere gegen Typ II Kollagen (das den Großteil des im Knorpel vorliegenden Kollagens ausmacht) immunisiert werden. Andere Modelle umfassen z.B. die Immunisierung gegen andere, körpereigene Antigene wie Albumin oder Gelenk-Protoglykane, die Gabe von für Knorpelproteine spezifischen Antikörpern oder „spontane“ Modelle mit genetisch bedingt anfälligen Tieren.

Pathologische Gemeinsamkeiten der CIA mit menschlicher RA sind u.a. die Einwanderung von Lymphozyten, die zum Pannus führende Gelenkshyperplasie, und der Abbau von Gelenkknorpel. Es gibt aber auch wesentliche Unterschiede: Zum Beispiel sind von der RA überwiegend Frauen betroffen (ca. dreimal so häufig wie Männer), während das Geschlecht beim CIA Modell keinen Einfluss auf die Inzidenz hat. Zudem verläuft die RA meist schubweise. Die CIA verläuft hingegen einphasig, nach Rückgang der Entzündung kommt es entweder zur weitestgehenden Normalisierung des Gelenkzustandes oder aber zu bleibender Gelenksteife durch Fibrosierung. In Mäusen ist das Modell MHC-restriktiv, d.h. die Erkennung der Antigene durch Lymphozyten erfordert die vorige Präsentation auf MHC Proteinen.

Dementsprechend eignen sich primär Stämme, die geeignete Klasse II MHCs exprimieren, z.B. DBA/1 LacJ.^{195,197}

Die CIA wird, ähnlich wie bei der EAE (Kapitel 4.3.4), durch Injektion mit einem Antigen (in diesem Fall Typ II Kollagen) und Complete Freund's Adjuvant induziert; Die Injektion der Antigen-Emulsion erfolgt intradermal, damit die Epitope der Mykobakterien von dendritischen Zellen erkannt werden. Diese antigenpräsentierenden Zellen prozessieren das Kollagen und präsentieren es anschließend über Typ II MHC, was die Aktivierung autoreaktiver T- und B-Zellen ermöglicht und schließlich zur Entstehung des Krankheitsbildes führt. Dabei spielen die produzierten Antikörper gegen Typ II Kollagen eine wichtige Rolle und dienen u.a. zur Erkennung durch das Komplementsystem.^{197,198}

Es kommt an der Einstichstelle zu einer initialen, limitierten Entzündungsreaktion, die sich mit der Zeit legt und zur (Gelenk-) Arthritis übergeht. Symptome beginnen ca. 2-4 Wochen nach der Immunisierung (Abhängig vom Stamm). Bei manchen Modellen, wie auch in der dargestellten Studie, wird nach 21 Tagen eine erneute Immunisierung mit einer Emulsion aus Typ II Kollagen in Incomplete Freund's Adjuvant (also ohne *M. tuberculosis*) durchgeführt (**Abbildung 4.88**). Die Tiere sollten über den Verlauf der Studie eng überwacht werden um sicherzustellen, dass sie in der Lage sind, an Wasser und Futter zu gelangen. Zur Erfassung des Krankheitsverlaufs werden in regelmäßigen Intervallen Körpergewicht und Umfang der (Hinter-)Pfoten gemessen; zudem werden Rötung und Schwellung der Gelenke mit einem Score von 0-3 pro Gelenk bewertet. Nach Studienende können weitere Untersuchungen, z.B. histologische Analyse der Gelenke oder die Zytokinkonzentrationen im Blut oder bestimmten Organen, erfolgen.

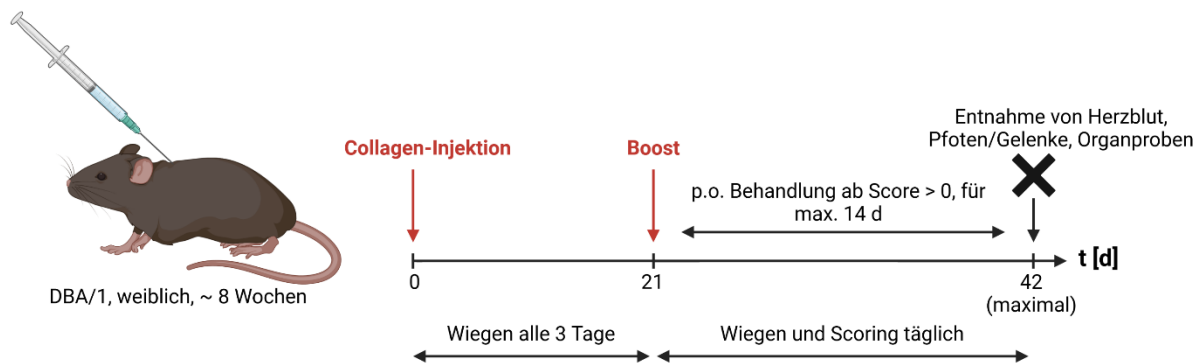


Abbildung 4.88: An Tag 0 werden die Mäuse gewogen und mit Collagen in Complete Freund's Adjuvant immunisiert. Vor Symptombeginn wird alle drei Tage das Körpergewicht bestimmt. An Tag 21 erfolgt eine Boosterinjektion mit Collagen in Incomplete Freund's Adjuvant. Ab Tag 21 werden die Mäuse täglich gewogen und gescored bis zum Studienende. Die Behandlung mit den Testsubstanzen erfolgt therapeutisch, nach dem das jeweilige Versuchstier einen Score von 1 erreicht hat. 14 Tage nach Auftreten der ersten Symptomatik, oder 42 Tage nach Studienbeginn, werden die Tiere euthanasiert und Herzblut, Leber, Milz sowie Gelenkproben für die Histologie entnommen.

Aus ethischen Gründen sollten Schmerz und Stress für die Tiere minimiert werden. Die Gabe von Analgetika kann jedoch problematisch für die Bewertung des Behandlungserfolgs sein, da diese (z.B. bei NSARs) einen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen haben oder potentiell durch CYP-Inhibition bzw. -Induktion

mit den Testsubstanzen wechselwirken. Empfohlen wird der Einsatz weicher Einstreu und die Reduktion von Stressfaktoren, weswegen die Tiere nicht täglich in direkten Kontakt mit Menschen kommen sollten (sondern eher alle 2-3 Tage). Sollte die Verabreichung von Schmerzmitteln unvermeidbar sein, wird die Gabe nicht-antiinflammatorischer Schmerzmittel empfohlen. Für die Synovo-Studien werden in diesem Falle bevorzugt Agar-Würfel eingesetzt, die in der Gelphase gelöstes Buprenorphin (0,3 µg/ml) enthalten. Gleichzeitig hilft der Verzehr der Würfel dabei, die Wasserversorgung der Tiere zu unterstützen, da bei stärkerer Symptomatik beobachtet wurde, dass sie nur noch ungern aus der (schwerer erreichbaren) Trinkflasche trinken. Ein Nachteil der Verwendung von Buprenorphin ist dessen Metabolismus über CYP3A4, weswegen bei höheren Dosen eine Wechselwirkung mit anderen CYP-Substraten nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem sollten die Körpergewichte der Tiere mit Vorsicht diskutiert werden, da sich die appetitzügelnde Wirkung von Opiaten unter Umständen auf die Nahrungsaufnahme auswirken kann.

Die aufgeführte CIA-Studie wurde in kleinem Rahmen, zur generellen Etablierung des Modells mit JAK3-Inhibitoren, durchgeführt. Als Kandidaten wurden **FM-381** mit **38** (mit jeweils 16 µmol/kg p.o. täglich) verglichen. Letzteres hatte sich bereits in anderen Modellen wie der LPS Challenge und der DSS-Colitis bewährt. Als Positivkontrolle diente das anti-TNF α Biological Etanercept. Der lösliche TNF α -Rezeptor wird am Menschen u.a. zur Behandlung der RA, aber auch von Formen der Psoriasis eingesetzt. In murinen Modellen der Arthritis ist Etanercept ebenfalls eine beliebte Kontrollsubstanz, die hier verwendete Dosis betrug 10 mg/kg i.p. jeden zweiten Tag. Das Vehikel für die oral behandelten Gruppen war 4 % DMSO in PBS.

Da die Studie wie erwähnt als Etablierungsstudie gedacht war, beschränkten sich die Readouts auf Erfassung von Körpergewicht, Symptomscore und Durchmesser der erkrankten Gliedmaßen. Nach Ende der Studie wurden die Milzen der Tiere per Durchflusszytometrie untersucht, um die Zusammensetzung der enthaltenen Immunzellen zu vergleichen.

Score und Körpergewicht: Die Symptom-Scores sämtlicher Gruppen, inklusive der Vehikeltiere, stiegen nach der zweiten Kollagen-Injektion nur langsam an (**Abbildung 4.89**, links). Dementsprechend waren die Score-Unterschiede zwischen den Behandlungsarten eher gering. Die mildeste Symptomatik ergab sich für Tiere, die mit **38** behandelt worden waren. Die Interpretation der Scores wird allerdings dadurch erschwert, dass ein Score von 0 in den Behandlungsgruppen sowohl von erfolgreicher Behandlung, als auch von zu milder Induktion herrühren könnte. Die Kollagenosis war vergleichsweise niedrig angesetzt, um das Risiko eines vorzeitigen Versterbens der Tiere beim Boost (aufgrund einer überschießenden akuten Immunreaktion) zu mindern. Für die Entwicklung stärkerer Symptomatik hätte die Studie noch länger andauern müssen, was aber aufgrund rechtlicher Bedingungen leider nicht zulässig war.

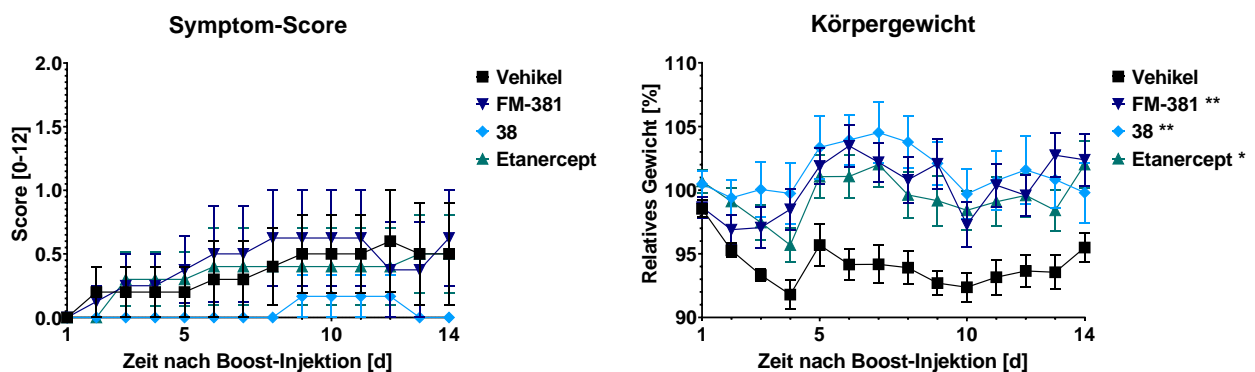


Abbildung 4.89: Arthritis-Scores (links) und Körpergewichte (rechts) (jeweils Mittelwert \pm SEM) von DBA1-Mäusen nach der zweiten Booster-Injektion mit bovinem Typ II Kollagen. Behandelt wurde ab Erreichen des ersten Scores > 1 . Die Behandlung mit $16 \mu\text{mol/kg}$ **38** p.o. führte zu den niedrigsten Scores unter den Gruppen (per AUC), die Ergebnisse waren aber statistisch nicht signifikant. Durch die Kürze der Studie (insgesamt 35 Tage) waren aber die Scores aller Gruppen insgesamt recht niedrig. Alle drei Behandlungsarten führten zu einem signifikanten Erhalt des Körpergewichts gegenüber der Vehikelgruppe, insbesondere für **38**. $n = 6$ (**38**), 7 (**FM-381**), 10 (Vehikel, Etanercept). Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Die Pfotendurchmesser der Tiere (nicht gezeigt) wurden auch erfasst, es ergaben sich allerdings nur minimalste Unterschiede zwischen den Gruppen. Aufgrund der Messmethode sind die Werte ohnehin anfällig für Schwankungen, da die mit dem Messschieber ausgeübte Kraft bei der Messung von der durchführenden Person abhängt.

Wie bereits an anderer Stelle diskutiert stellt das Körpergewicht in vielen Krankheitsmodellen ebenfalls einen guten Parameter für das Wohlbefinden und den Allgemeinzustand der Tiere dar. Im Gegensatz zum Score, der selbst bei geschultem Personal nicht immer perfekt objektiv ist, stellt das Gewicht zudem eine rein objektive messbare Größe dar. Sowohl die JAK3 Inhibitoren als auch die Positivkontrolle Etanercept hatten einen signifikant positiven Effekt auf das Körpergewicht (**Abbildung 4.89**, rechts). Der Gewichtserhalt war für **FM-381** und **38** sogar stärker ausgeprägt als für Etanercept.

Durchflusszytometrie: Wie schon unter Kapitel **4.3.5.3** diskutiert wurden auch in dieser Studie Milzproben entnommen und die Zusammensetzung der Splenozyten analysiert (**Abbildung 4.90**). Untersucht wurden nur die mit Vehikel oder JAK-Inhibitoren behandelten Tiere. Die Etanercept-Gruppe wurde nicht in die Zytometrie-Analyse einbezogen, da die Milzen für ein weiteres Projekt höherer Priorität benötigt wurden.

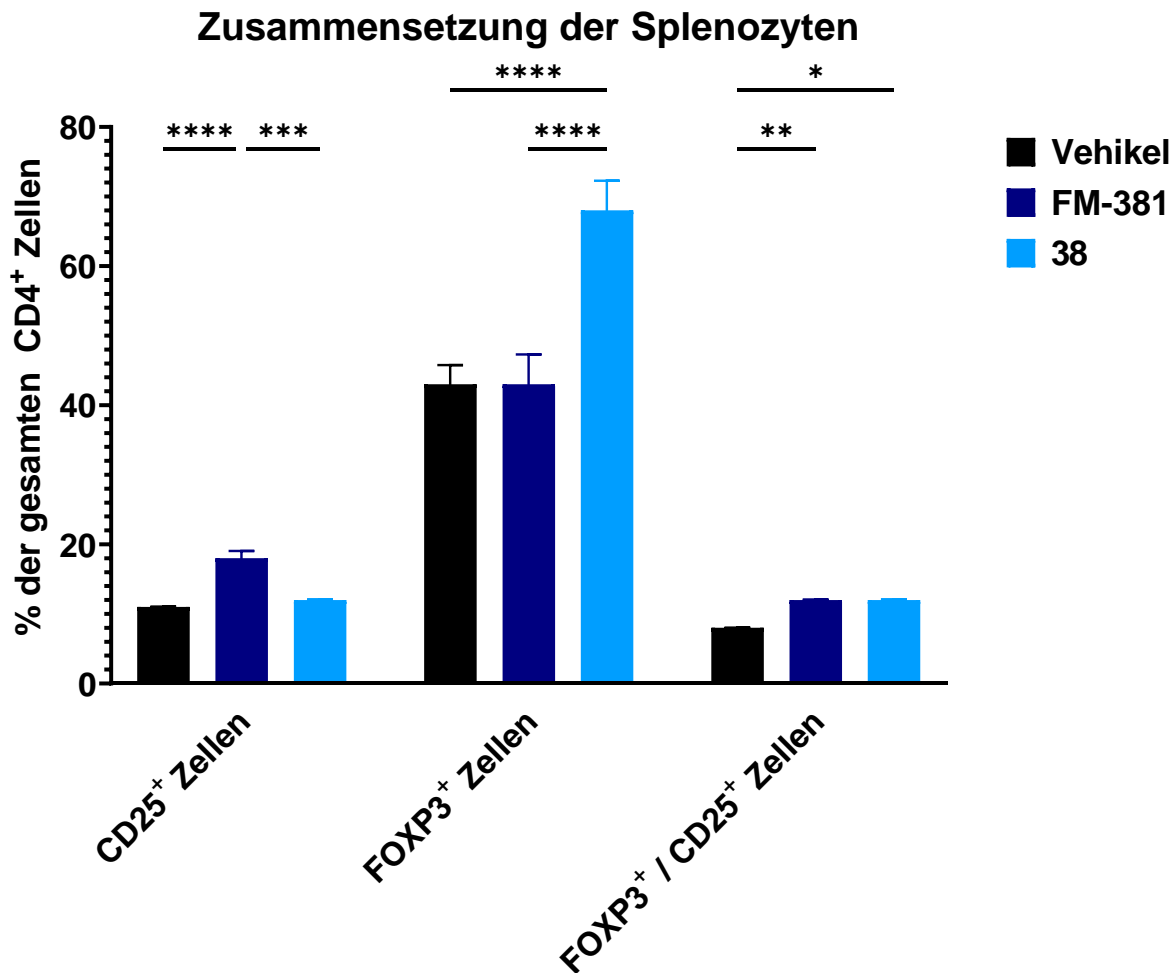


Abbildung 4.90: Durchflusszytometrische Analyse der aus Milzproben isolierten CD4⁺-Zellpopulationen. Die Behandlung mit **FM-381** und **38** führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils regulatorischer, CD25/FOXP3 doppelpositiver T-Zellen. Zusätzlich hatten mit **FM-381** behandelte Tiere einen signifikant erhöhten Anteil an CD25⁺ Zellen gegenüber anderen Gruppen, während die Gabe von **38** zur signifikanten Steigerung der FOXP3⁺ Subpopulation führte. $n = 6$ (**38**), 7 (**FM-381**), 10 (Vehikel). Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Durch die Gabe der JAK3-Hemmen kam es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an T_{reg} Zellen in den Milzen der Tiere: Sowohl in mit **FM-381** als auch **38** behandelten Mäusen wurden mehr FOXP3⁺/CD25⁺ Zellen gezählt. Wie schon in der Colitis-Studie (Kapitel **4.3.5.3**) gab es Unterschiede zwischen den Gruppen bei den einzeln gefärbten Subpopulationen: Das Verhältnis an CD25⁺ Zellen wurde durch **FM-381** signifikant erhöht, während nur **38** den Anteil an FOXP3⁺ Zellen signifikant steigerte. Die bereits im vorigen Kapitel besprochenen Erklärungsansätze gelten auch hier. Die Effekte der Testsubstanzen waren hier aber bei allen drei verglichenen Subpopulationen stärker ausgeprägt, was am Ehesten auf die höhere Dosis zurückzuführen ist.

Zusammengefasst zeigten sowohl **38** als auch die Referenz **FM-381** Effekte in einem murinen Modell der Arthritis und führten zu signifikantem Erhalt des Körpergewichts und gesteigerter Expansion an schützenden regulatorischen T-Zellen.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zunächst wurden die bis dahin unbekanntenen pharmakokinetischen Eigenschaften von **FM-381** in Mäusen untersucht. Da insbesondere die Plasmastabilität als auch orale Aufnahme als unzureichend beurteilt wurden, wurden verschiedene Serien an Derivaten hergestellt. Dabei konnten sowohl die *in vivo* Stabilität deutlich gesteigert, als auch Stoffe dargestellt werden, die sich bevorzugt in bestimmten Zielgeweben anreichern (**Abbildung 5.1**). Auch ein ZNS-gängiger Stoff mit guter Potenz (**18**) wurde auf diesem Weg entdeckt. Ein metabolischer Schwachpunkt der Substanzklasse wurde in Form der Seitenkette identifiziert, welche die JAK-Selektivitätstasche adressiert. Die *in vivo* Stabilität konnte durch Modifikation dieser Seitenkette, z.B. durch Einführung gespannter oder aromatischer Ringsysteme, deutlich gesteigert werden, was aber mitunter zulasten der JAK3-Aktivität ging.

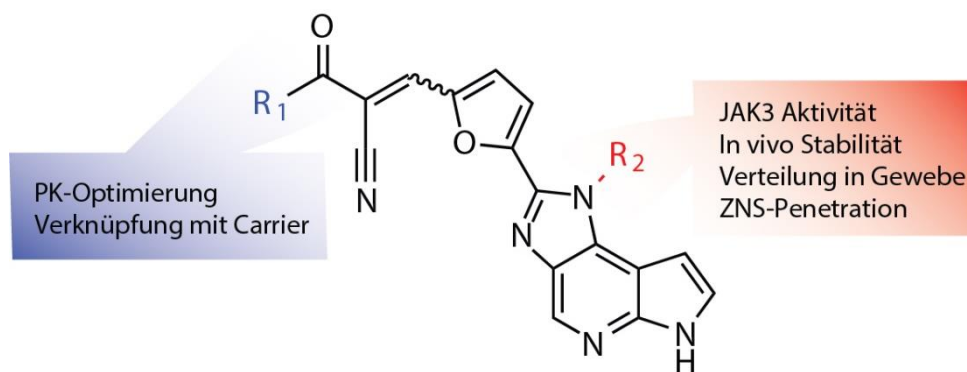


Abbildung 5.1: Schematische Übersicht über die durchgeführten Modifikationen am auf **FM-381** basierenden Gerüst, sowie deren Effekte. Der tricyclische Kern und das Cyanacrylamid wurden beibehalten, um hohe JAK3-Selektivität und zu gewährleisten. Durch Variation am Amid-Rest R_1 konnten die PK-Eigenschaften optimiert werden, insbesondere durch Konjugation mit Makrolid-Carriern. Die R_2 -Gruppe hatte ebenfalls Einfluss auf bestimmte PK-Parameter, aber auch auf die inhibitorische Potenz.

Über die Reste am Cyanacrylamid konnten ebenfalls die physikalischen und pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert werden. Als besonders erfolgreich erwies sich dabei das Konzept der Makrolid-Konjugate, bei dem von Azithromycin ausgehend Träger-Gerüste synthetisiert wurden. Diese wurden mit den aktiven JAK3-Inhibitor Warheads verknüpft um Wirkstoffe zu erhalten, die hohe Aufnahme und Stabilität mit guter Aktivität vereinen. Besonders hervorzuheben sind dabei **37** und **38** mit einer JAK3 IC_{50} von jeweils 35 bzw. 39 nM (**FM-381**: 12 nM) und *in vivo* Plasmahalbwertszeiten von 96 bzw. 97 min in Mäusen (**FM-381**: 23 min).

Die antiinflammatorische Wirksamkeit der Testsubstanzen wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in LPS-basierten Entzündungsmodellen untersucht. Durch Einsatz der JAK3-Hemmer konnte die Zytokinfreisetzung nach TLR4-Stimulus günstig beeinflusst werden: Es kam zur starken Senkung der messbaren $TNF\alpha$ -Spiegel, während das antiinflammatorische Zytokin IL-10 in ähnlichem oder gar erhöhtem Maße freigesetzt wurde. Besonders gute IL-10/ $TNF\alpha$ -Verhältnisse konnten durch die Konjugate, z.B. **13** und **38**, im murinen Modell erreicht werden (**Abbildung 5.2**). Ein weiterer Vorteil der selektiven JAK3-Inhibitoren ist, dass im Gegensatz zu den JAK1-hemmenden Stoffen der (JAK1-abhängige) IL-10 Signalweg nicht blockiert wird.

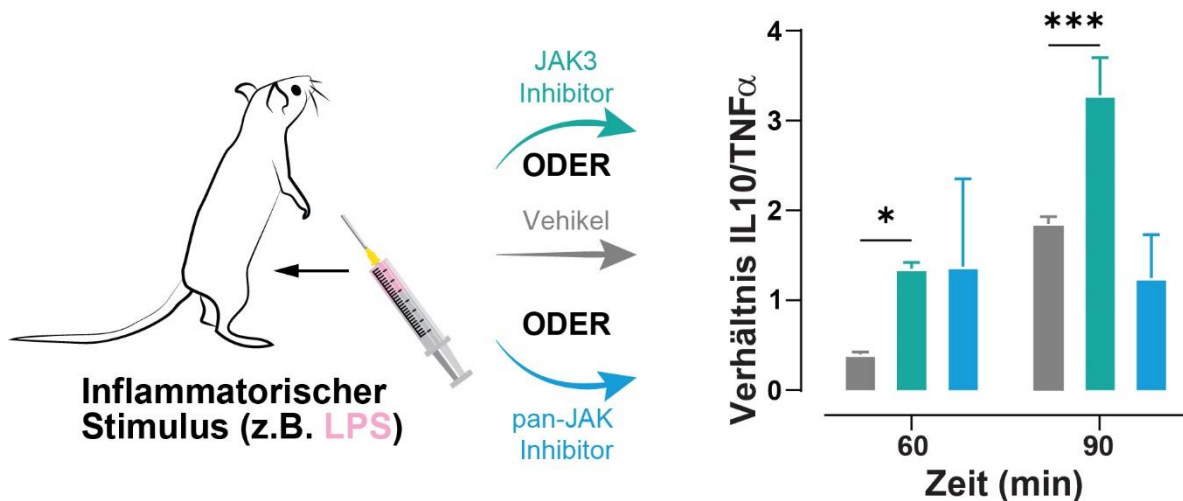


Abbildung 5.2: Kurzzusammenfassung der Erkenntnisse aus dem *in vivo* „LPS Challenge“ Modell: Durch die Behandlung der Tiere mit JAK3-Inhibitoren (hier: **13**) konnte einer durch LPS-Injektion ausgelösten Immunantwort entgegengewirkt werden, was sich durch gesenkte Spiegel an TNF α und erhöhtes IL-10 im Plasma äußerte. Die Effekte einer gleichen Dosis des unselektiven JAK-Inhibitors Tofacitinib waren deutlich geringer ausgeprägt. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist dargestellt als: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Im Zuge der Arbeit wurde die intrinsische Fluoreszenzaktivität der Testsubstanzen entdeckt, die auf dem ausgeprägten π -System der JAK-Warheads beruht. Diese wurde genutzt, um direkt – ohne weitere chemische Modifikation – die Verteilung der Stoffe fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Beobachtet wurde eine besonders starke zelluläre Aufnahme bzw. Anreicherung der Makrolid-Konjugate (**Abbildung 5.3**), die deren Einsatz als „leukotrope“ Immunsuppressiva noch eleganter macht. Durch *in vivo* Studien wurde auch die spezifische Verteilung der Stoffe innerhalb verschiedener Organe dargestellt.

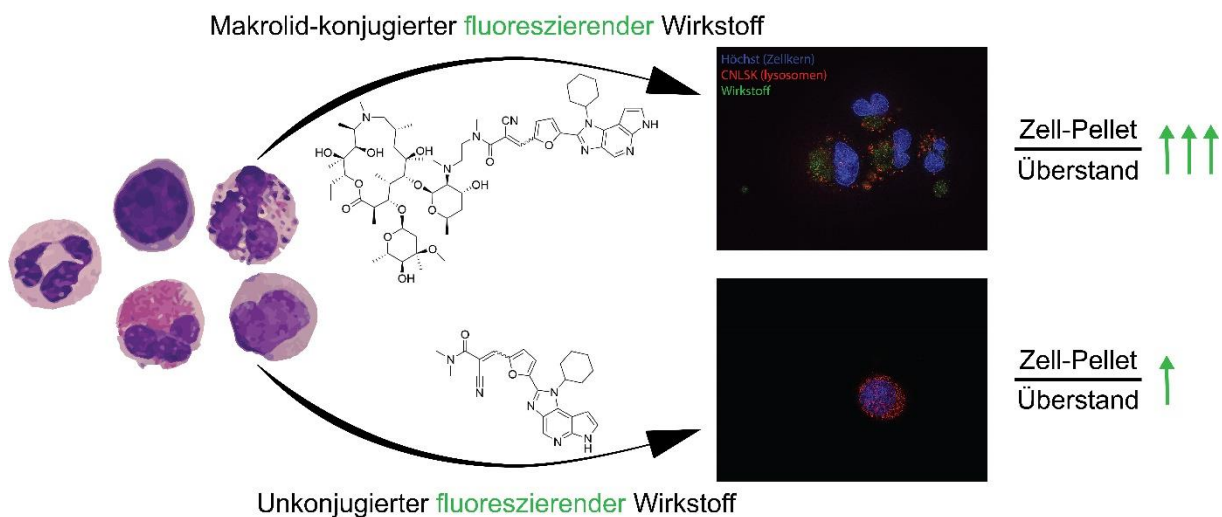


Abbildung 5.3: Durch das intrinsische Fluoreszenzverhalten der trizyklischen Cyanacrylamid-Warheads konnten die Stoffe per Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und die Verteilung in Immunzellen gezeigt werden. Da das Absorptions- und Emissionsverhalten der Stoffe überwiegend sehr ähnlich war, konnte so auch semiquantitativ deren Aufnahme in die Zellen verglichen werden. Bei gleicher Konzentration (10 μ M) reicherten sich nur bestimmte Verbindungen, v.a. die Konjugate, ausreichend in den Zellen an um sichtbar im grünen Vis-Bereich zu fluoreszieren. Über Anfärben der Lysosomen (rot) wurde zudem gezeigt, dass die basischen Wirkstoffe vor allem dort lokalisiert waren. Die hohe Aufnahme der Makrolidkonjugate in Immunzellen wurde auch durch HPLC-MS Analyse von mit den Substanzen inkubierten Immunzell-Pellets bzw. deren zentrifugierten, zellfreien Überständen quantifiziert.

Die vielversprechendsten Kandidaten (entweder aufgrund ihrer antiinflammatorischen Potenz oder günstiger Pharmakokinetik) wurden in verschiedenen präklinischen Krankheitsmodellen getestet. Einige Substanzen zeigten u.a. gute Wirksamkeit bei der Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (z. B. **38**, **Abbildung 5.4**) und hatten protektive Effekte auf Körpergewicht, Symptomatik und Gesamtüberleben. Zudem wurde durch die Behandlung mit JAK3-Hemmern erfolgreich die Population regulatorischer T-Zellen expandiert, was sich auch in einem Arthritis-Modell bei einem anderen Mäusestamm replizieren ließ. In einem murinen Modell der Multiplen Sklerose (EAE) wurde mit **18** ein Kandidat für die Behandlung entzündlicher Erkrankungen des ZNS identifiziert. Dieser führte im EAE-Modell zu einer signifikanten Verbesserung der Parameter Körpergewicht, Score und Überleben, auch histologisch zeigten sich positive Effekte der Behandlung. Weiterführende Studien mit diesen Kandidaten sind bereits in Planung.

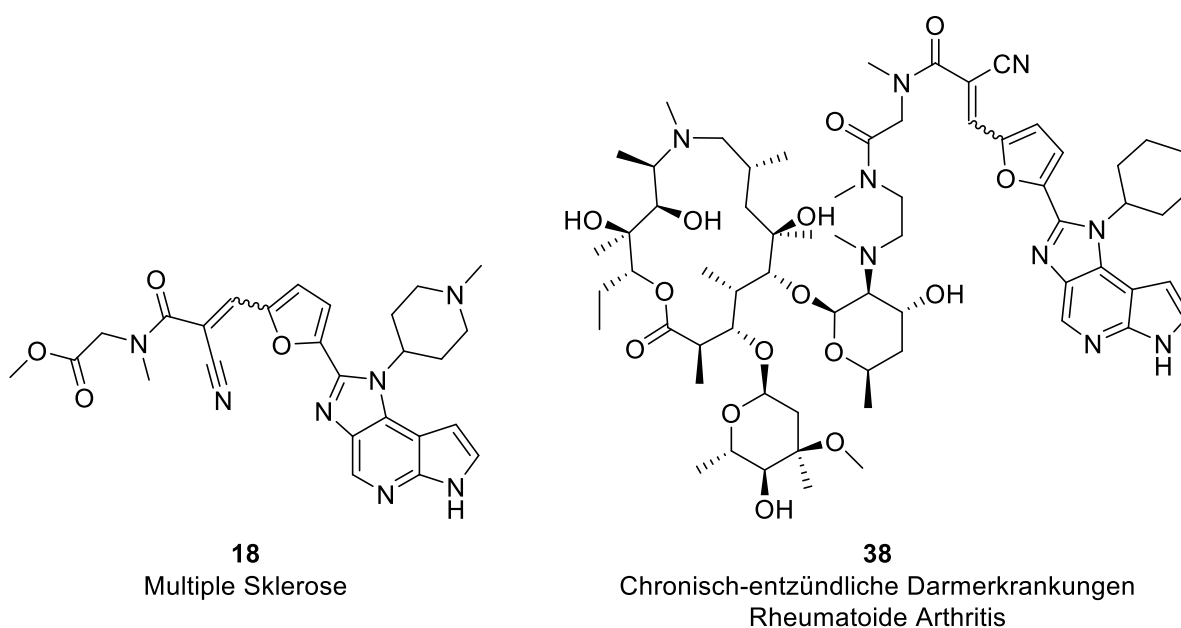


Abbildung 5.4: Strukturen der erfolgreichsten Testsubstanzen aus *in vivo* Studien und ihre potentiellen Anwendungsgebiete. Das N-methylpiperidin substituierte **18** (links) zeichnete sich durch seine gute ZNS-Gängigkeit aus und war in einem murinen Modell der Multiplen Sklerose wirksam. Das Makrolid-Konjugat **38** (rechts) zeigte in mehreren Studien zur DSS-induzierten Colitis sowie im Arthritis-Modell Wirksamkeit.

Längerfristig sollen die aus den *in vivo* Screening-Studien hervorgegangenen Wirkstoffkandidaten weiter im präklinischen Umfeld erforscht und weiterentwickelt werden. Unter anderem sind, nach Hochskalierung der Synthese, umfassende Studien zur Ermittlung der optimalen Dosis und Applikationsart, repeated-dose PK sowie auch toxikologische Studien in geeigneten Organismen vorgesehen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien und allgemeine Methoden

Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden die eingesetzten Lösemittel und Reagenzien von folgenden Anbietern bezogen: Fisher Scientific, Sigma Aldrich, Acros Organics, Carbosynth, Carl Roth, TCI, ABCR, Chempur, Fluorochem, VWR.

Deuterierte Lösemittel zur Aufnahme von NMR-Spektren wurden von Deutero bezogen.

Pufferlösungen, Peptide, Proteine und bakterielle Produkte wurden von den oben angegebenen Herstellern sowie von Jena Bioscience, Difco, und Panatecs bezogen.

Säulenchromatographie

Die chromatographische Aufreinigung von Substanzen erfolgte entweder manuell durch Säulenchromatographie über mit Kieselgel (60-200 μM , 60 A, Acros Organics) gefüllte Glassäulen (Normag, mit Filterplatten-Porosität D3, verschiedene Längen und Innendurchmesser) oder automatisch als Flash-Chromatographie mit einem Interchim PuriFlash 5.020 System, vorgepackten Interchim Chromatographie-Säulen (15 μM oder 50 μM Kieselgel) und der begleitenden „TLC to Flash and Prep Chromatography“ Software.

Dünnschichtchromatographie

Für analytische DC wurden Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten verwendet. Ausgewertet wurde unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder unter Zuhilfenahme von geeigneten Färbereagenzien.

Analytische HPLC

HPLC-Analytik zur Bestimmung der Reinheit und Retentionszeiten von Substanzproben wurde auf einem Varian ProStar210 System, gekoppelt mit einem SEDEX LT-ELSD 80 LT Detektor und Dr. Maisch ReproSil-Pur120 C18-Aq Säulen (75 x 3 mm, 5 μm), durchgeführt. Alternativ zur Detektion per ELSD wurde bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ detektiert. Als Fließmittel dienten Wasser + 0,05 % Ameisensäure (A) und Methanol + 0,05 % Ameisensäure (B). Die Elution erfolgte über einen der folgenden Gradienten (**Tabelle 6.1**), die in Abhängigkeit von der Polarität der Eluenten ausgewählt wurden.

Tabelle 6.1: Zusammensetzung des Elutionsmittels bei den für die analytische HPLC verwendeten Gradienten.

t [min]	Gradient A		Gradient B	
	% A	% B	% A	% B
0-5	80	20	95	5
5-25	auf 0	auf 100	auf 0	auf 100
25-29	0	100	0	100
29-30	auf 80	auf 20	auf 95	auf 5
30-35	80	20	95	5

Die Flussrate für beide Gradienten lag bei 1.3 ml/min. Für die Verneblung der mobilen Phase wurde Stickstoff bei 3.3 bar verwendet, die ELSD-Temperatur lag bei 75 °C.

Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration in Blut-, Plasma- und Organproben aus *in vitro* und *in vivo* Studien erfolgte auf einem Agilent System mit einem 1260 HiP Degasser, 1260 BinPump, 1260 HiP ALS, 1290 Thermostat und Agilent C18 2.7 µm Säulen. Detektiert wurde mit einem AB SCIEX API 4000 MS mit TurboSpray Ionenquelle (Quellspannung 45 V, Ionenspray 4.5 kV, Temperatur 300 °C, Gas-Flussrate 5 l/min).

Massenspektrometrie

Massenspektren für Reaktionskontrollen und Zwischenprodukte wurden auf einem Thermo Finnigan LCQ DEXA XP System als ESI-MS im Positivmodus aufgenommen (ESI Spannung 3 kV, Kapillarspannung 9 V, Kapillartemperatur 275 °C, Gas-Flussrate 7 l/min).

HRMS-Aufnahmen für Testverbindungen wurden von der MS-Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität Tübingen aufgenommen. Gemessen wurde als ESI-HRMS auf einem maXis 4G ESI-TOF (Bruker Daltonik) im Positivmodus (Kapillarspannung 4.5 kV, Quelltemperatur 200 °C, Gas-Flussrate 6 l/min, Vernebler-Gasdruck 1.2 bar, Endplatten-Spannung -500 V).

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf einem Bruker Avance 400 Mhz, einem Bruker Avance III HDX 400 Mhz oder einem Bruker Avance III 300 Mhz aufgenommen. Chemische Verschiebungen in ppm sind in Relation zu Tetramethylsilan angegeben und gegen die Lösemittelpeaks der jeweiligen verwendeten Lösemittel kalibriert.

IR-Spektroskopie

IR-Spektren von Testverbindungen wurden auf einem Agilent Cary 630 FTIR aus den Reinsubstanzen aufgenommen.

UV-VIS Spektroskopie

UV-VIS Absorptionsspektren wurden auf einem Implen Nanophotometer NP80 in einer Hellma Analytics QS HighPrecision Cell Küvette (10 mm) bei Raumtemperatur aufgenommen. Gemessen wurde in einer Lösung aus PBS und 0.5 % DMSO ($c = 50 \mu\text{M}$).

Emissionsspektren wurden auf einem VersaMax Tunabale Microplate Reader in Sarstedt ELISA Platten (weiß, High Bind F) aufgenommen. Lösemittel und Konzentration waren identisch zur Aufnahme der Absorptionsspektren. Die Anregungswellenlängen entsprachen den jeweiligen Absorptionsmaxima der gemessenen Stoffe. Emissionsspektren wurden als Triplikate in 5 nm Schritten im Bereich 420-750 nm aufgenommen, sofern nicht anders angegeben.

Experimentelle Bestimmung der Löslichkeit

Für jede Testsubstanz wurde ein Überschuss des Analyten mit einem definierten Volumen an PBS versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurden die Proben für 5 min bei 14.000 g zentrifugiert, wobei auf konstante Einhaltung der Raumtemperatur geachtet wurde. Von den Überständen wurde jeweils ein Aliquot pipettiert, 1:1 mit PBS und dann erneut 1:6 mit Acetonitril und internen Standards (5 nM Sulfentrazon, 1 nM Terbutylazin) verdünnt. Nach gründlicher Homogenisierung wurden die Lösungen in HPLC-Vials überführt und per HPLC-MS (s.o.) analysiert.

Schmelzpunkt-Bestimmung

Die Schmelzpunkte der Endverbindungen wurden mit einem Mettler Toledo MP70 mit einer automatischen Methode von 100 °C auf 300 °C mit einer Heizrate von 6 °C /min bestimmt.

Röntgenkristallographie

Von den Verbindungen **3h**, **58** und **69** wurden Röntgenkristallstrukturen am Institut für organische Chemie, Universität Mainz, von Dr. Dieter Schollmeyer aufgenommen. Die Aufnahmen wurden bei – 80 °C mit einem STOE IPDS 2T Diffraktometer mit Mo-K α Graphitmonochromator durchgeführt. Zugehörige Kristall- und Verfeinerungsdaten sind dem **Anhang (7.2.5)** zu entnehmen.

6.2 *In vitro* Testverfahren

JAK3 IC₅₀ Bestimmung

JAK3 IC₅₀-Werte der Testverbindungen wurden an der Universität Tübingen im Arbeitskreis Laufer von Katharina Bauer ermittelt. Das Verfahren wurde bereits veröffentlicht sowie in der Dissertation von Dr. Silke Bauer beschrieben.^{104,105}

Radiometrischer JAK-Selektivitäts-Assay

Zur Bestimmung der Selektivität innerhalb der JAK-Familie wurde der radiometrische ³³PanQinase® Activity Assay der Reaction Biology Europe GmbH verwendet. Die Durchführung erfolgte mit 96-well ScintiPlates™ (PerkinElmer) nach folgendem Pipettierschema:

- 25 μ l Assay-Puffer
- 10 μ l wässrige ATP-Lösung
- 5 μ l der Testsubstanz in 10 % DMSO
- 10 μ l Enzym-/Substrat-Gemisch

Im Assay enthalten waren 70 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 3 mM MgCl₂, 3mM MnCl₂, 3 μ M Na-Orthovanadat, 1,2 mM Dithiothreitol, 50 μ g/ml PEG_{20.000}, ³³P-ATP (variable Konzentration je nach Kinase, s.u.), die jeweilige JAK und das zugehörige Substrat. Zur Qualitätskontrolle wurde zusätzlich noch eine Reihe mit dem unspezifischen Kinasehemmer Staurosporin als Testsubstanz gemessen (Daten nicht aufgeführt).

Tabelle 6.2: Parameter des ³³PanQinase® Assays zur Bestimmung der Selektivität innerhalb der JAK-Familie

Kinase	C _{Kinase} [nM]	C _{ATP} [µM]	K _{m(ATP)} [µM]	Substrat	C _{substrat} [µg/50 µl]
JAK1	42,7	1,0	1,45	RBER-IRStide	2,0
JAK2	6,4	0,3	0,25	Poly(Ala,Glu,Lys,Tyr)6:2:5:1	0,125
JAK3	2,9	0,1	0,10	Poly(Ala,Glu,Lys,Tyr)6:2:5:1	0,125
TYK2	2,9	0,1	0,13	Poly(Ala,Glu,Lys,Tyr)6:2:5:1	0,125

Die aufgeführten Parameter wurden dem Bericht der Firma Reaction Biology zum durchgeführten Assay entnommen.

Die Ansätze wurden für 1 h bei 30 °C inkubiert, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl H₃PO₄ (2 % V/V in Wasser) gestoppt, die Platten getrocknet und zweimal mit 200 µl 0,9 % Saline gewaschen. Die Phosphorylierung des Substrats mit ³³P-Phosphat wurde mit einem Szintillationszähler (Microbeta) bestimmt. Zur Erfassung des Grundrauschens durch unspezifisches Binden von ³³P-ATP zur Platte wurden zusätzlich 8 Wells ohne Kinase pipettiert. Zusätzlich wurden 8 Wells mit Kinase, aber ohne Inhibitor, pipettiert. Die volle Aktivität (100 %) definiert sich so aus der Signaldifferenz zwischen den inhibitorfreien Proben („Signal_{uninhibiert}“) und den kinasefreien („Signal_{Grundrauschen}“) Proben.

In Wells, die sowohl Inhibitor als auch Kinase enthielten, berechnet sich die verbliebene JAK-Aktivität (%) demnach aus:

$$\frac{\text{Signal}_{\text{Testsubstanz}} - \text{Signal}_{\text{Grundrauschen}}}{\text{Signal}_{\text{uninhibiert}} - \text{Signal}_{\text{Grundrauschen}}} \times 100$$

Zelluläre nanoBRET assays

Die Bestimmung der JAK3 IC₅₀ auf zellulärer Ebene wurde im AK Knapp der Universität Frankfurt durchgeführt. Die genaue Prozedur kann der Literatur entnommen werden.¹⁹⁹ Kurz zusammengefasst: HEK293T-Zellen, die das gewünschte JAK3/NanoLuc-Fusionsprotein (komplette JAK3 mit NanoLuc-Fusion am C-Terminus, NV1471, Promega) exprimieren, wurden mit einer konstanten Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Tracer (NanoBRET Kinase Tracer K10, Promega) und variablen Konzentrationen an Testsubstanz versetzt. Zwei Stunden nach Zugabe wurde das Luciferase-Substrat (NanoGlo, Promega) zugegeben und die BRET-Signale bei 450 nm (Lumineszenz von NanoLuc) und 610 nm (Fluoreszenz des Tracers) gemessen und die EC₅₀ der Testsubstanzen anhand der Verhältnisse von Signal und Konzentration berechnet.

MTT/Live-Dead Staining

Die Viabilitäts- bzw. Toxizitäts-Assays wurden in den Laboren der Synovo GmbH durchgeführt.

MTT-Assay: Die suspendierten Zellen (U937) werden zunächst für 48 h mit 100 mM Phorbol 12-myristat 13-acetat behandelt, um deren Adhärenz zu erhöhen. Dann werden sie mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert (Endkonzentration an DMSO 0,1 - 0,5 %). 50 µl einer 5 mg/ml Lösung aus 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS werden zu je 200 µl der Zellsuspensionen gegeben und für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die entstandenen Formazan-Kristalle werden durch Zugabe von 100 µl DMSO für 2 h unter Lichtausschluss gelöst. Anschließend wird die optische Dichte (OD) der Lösungen bei 570 und 680 nm mit einem VersaMax Spektrophotometer bestimmt; der Wert bei 680 nm diente hierbei als Nullwert.

ZAAD-Assay: Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanzen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden sie in 96-Well Platten gegeben, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach Zugabe von 20 µl Lösepuffer und Inkubation für 15 min wurden 280 µl 0,5 % 7-Aminoactinomycin-Lösung (PBS + 5 mM EDTA) zu jedem Well gegeben. Nach 15 min Inkubationszeit unter Lichtausschluss wurden die Proben auf einem Guava®easyCyte 8HT flowcytometer (Merck) und der zugehörigen Software analysiert.

LPS Stimulations ELISA

Die LPS-Stimulations-Assays wurden in den Laboren der Synovo GmbH durchgeführt. IL-6, IL-10 (Biolegend) und TNF α (R&D Systems) ELISAs wurden entsprechend der Herstelleranleitung ausgeführt.

ELISA Platten (Sarstedt) werden über Nacht mit dem ersten Antikörper (1:200 für IL-6 und IL-10 in coating buffer, 1:120 in PBS für TNF α) beschichtet. Nach viermaligem Waschen (1x PBS + 0,05 % Tween) werden 150 µl Assay Diluent (Biolegend) pro well auf die Platte gegeben und für eine Stunde inkubiert. Der Waschschritt wird wiederholt, bevor je 100 µl Proben und Standards pro well in der angepassten Verdünnung aufgetragen werden. Die Platte wird für zwei Stunden inkubiert. Nach dem Waschen werden für eine Stunde 100 µl des verdünnten Detektionsantikörpers (1:200 IL-6, IL-10 und 1:60 TNF α in assay diluent) zugegeben. Im nächsten Schritt werden nach dem Waschen 100 µl HRP (Horse radish Peroxidase, Biolegend) pro well dazugegeben (1:1000 in Assay Diluent). Nach 30 Minuten wird die Platte 8-mal gewaschen und pro well 100 µl TMB substrate (Substrate A + B, 1:1; Biolegend) hinzugegeben. Nach 10 – 20 Minuten wird die Reaktion mit 50 µl 1 N H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm auf einem VersaMax Plate Reader gemessen.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellsuspensionen (U937 Zellen, HBC, HMC3 oder Vollblut) wurden mit Höchst 33342 Lösung und Cell Navigator Lysosome Staining Kit versetzt, um die Zellkerne bzw. Lysosomen anzufärben (jeweils in einer 1:1000 Verdünnung). Nach 15 min wurden die Testverbindungen zugefügt (Endkonzentration 10 µM, 0,1 % DMSO) und für 0 bzw. 2 h bei RT inkubiert. Je 20 µl wurden auf Objektträger pipettiert und

Aufnahmen mit einem Keyence BZ-810 Fluoreszenzmikroskop erstellt. Für Bilder bei hundertfacher Vergrößerung wurde Immersionsöl (Cargille Laboratories) verwendet. Für die Nachbearbeitung der Aufnahmen wurde die zugehörige Software von Keyence verwendet. Die Testsubstanzen erscheinen im grünen (OP-87763 BZX-Filter GFP, Anregungswellenlänge 470/40 nm, Detektionswellenlänge 525/50 nm), Zellkerne im blauen (OP-87762 BZX-Filter DAPI, Anregungswellenlänge 360/40 nm, Detektionswellenlänge 460/50 nm) und Lysosomen im roten Filterbereich (OP-87765 TexasRed, Anregungswellenlänge 560/40 nm, Absorptionswellenlänge 630/75 nm).

Zellaufnahme in HBC

Menschlicher Buffy Coat ($c = 5 \times 10^6$ Zellen) wurde mit je 1 μM der Testsubstanzen für 0, 30 oder 120 min inkubiert.¹⁴⁰

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße für 2 min bei 400 g zentrifugiert und die Überstände in separate Gefäße überführt. Sowohl zu den Überständen als auch den Zellpellets wurde Acetonitril mit internen Standards (5 nM Terbuthylazin, 1 nM Sulfentrazone) zugefügt und die Proben wurden bis zur Messung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Analysenmethode der Proben per HPLC-MS entsprach der der *in vivo* Plasmaproben (siehe oben).

Stabilität in menschlichem Vollblut und Plasma

Vollblut: Menschliches Vollblut von gesunden, freiwilligen Spendern ($n = 3$) wurde in zur Antikoagulation mit EDTA versetzten Blutentnahmeröhrchen (Sarstedt Monovetten) entnommen. Jedes Aliquot wurde ohne weitere Verdünnung bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Testsubstanzen wurden aus 10 mM DMSO-Stocks zugefügt (Endkonzentration = 10 μM Substanz, 0,1 % (V/V) DMSO). Nach 0, 5, 15, 30, 60, 120, 240 und 1440 min wurden jeweils Proben entnommen. mit dem dreifachen Volumen an ACN sowie internem Standard (5 nM Terbuthylazin) versetzt und sofort bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Unmittelbar vor der Analyse durch HPLC-MS wurden die Proben für 10 min bei 20.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Gefäße pipettiert. Die Analysenmethode der Proben per HPLC-MS entsprach jener der *in vivo* Plasmaproben (siehe oben).

Plasma: Das Experiment in Plasma wurde analog zur Vollblut-Methode durchgeführt. Plasma wurde aus frisch entnommenem Vollblut durch Zentrifugation bei 400 rpm für 10 min gewonnen und unmittelbar danach verwendet.

Metabolismus in murinen Lebermikrosomen

Zur *in vitro* Bestimmung der metabolischen Stabilität einiger Testsubstanzen wurden diese im Arbeitskreis Laufer mit murinen Lebermikrosomen (Xenotech, CD1 Männchen) inkubiert. Letztere wurden in einem NADPH-regenerierenden System (5mM Glucose-6-phosphat, 1 mM NADP^+ , 5 U/ml Glucose-6-phosphat Dehydrogenase) mit 4 mM MgCl_2 in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,44) bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ prä-inkubiert.

Nach Zugabe der Testsubstanzen (Endkonzentration 100 μM) wurden die Mikrosomen auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 10, 20, 30, 60, 120 min) Aliquote gezogen. Diese wurden mit 100 μl des 50 μM internen Standards in ACN vermengt, 30 s im Vortexmischer homogenisiert und dann zentrifugiert (19,800 relative Zentrifugalkraft, 15 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$).

Die Quantifizierung der Überstände erfolgte per LC-MS auf einer Alliance 2695 HPLC (Waters GmbH, Eschborn) mit einer Kinetex 2,6 μ C18 100 Å Säule (50 x 3 mm) und 5 μ l Injektionsvolumen. Eluent A: 90 % H₂O, 10 % ACN, 0,1 % Ameisensäure. Eluent B: 100 % ACN, 0,1 % Ameisensäure. Gradient: 10 % B für 2,5 min, auf 70 % B in 7,5 min, 70 % B für 2 min, auf 10 % B in 0,01 min, 10 % V für 3 min. Die Säulentemperatur wurde auf 40 °C reguliert. Detektiert wurde auf einem Micromass Quattro Tripel-Quadrupol Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn) im ESI-Positivmodus. Spannungen für Spray, Konus, Extractor und RF-Linse waren jeweils auf 4 kV, 30 V, 5V und 1 V eingestellt. Die Desolvations-Temperatur lag bei 350 °C, die Gas-Flussrate bei 650 l/h. Die Analyse der Daten wurde mit der Software MassLynx 4.1 durchgeführt.

Metabolismus in menschlichem Lebergewebe

Im Arbeitskreis Koch (Uni Regensburg) wurde eine Auswahl an Testsubstanzen auf ihren Metabolismus durch menschliches Lebergewebe untersucht. Die S9-Fraktion menschlicher Leberproben (Thermo Fisher) wurde in PBS zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml gegeben. Dem Ansatz wurden zudem MgCl₂, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, Alamethicin, NADP, UDPGA, PAPS sowie die Testsubstanzen (Endkonzentration: 100 μ M) zugefügt. In Parallelansätzen wurden zur Kontrolle entweder die S9-Fraktion und entweder das für Phase I Metabolismus nötige NADP, die für Phase II benötigten UDPGA und PAPS oder alle drei der genannten Co-Faktoren weggelassen.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 3 h bei 37 °C. Anschließend wurden vorhandene Proteine durch Zugabe von EtOH gefällt, die Gefäße zentrifugiert und die Überstände zur Analyse gewonnen.

Die Quantifizierung der Proben erfolgte per HPLC-MS mit einer auf 25 °C temperierten RP-18 Hibar Purospher Säule, einem Injektionsvolumen von 20 μ l und Detektion bei 254 nm und 360 nm. Eluent A: H₂O + 0,1 % Ameisensäure. Eluent B: ACN + 0,1 % Ameisensäure. Gradient: 5 % B für 20 min, auf 100 % B in 2 min, 100 % B für 3 min, auf 5 % B in 5 min. Die MS-Detektion wurde mit einem Agilent MS Q-TOF 6540 UHD durchgeführt, ionisiert wurde per ESI.

6.3 *In vivo* Studien

Allgemein

Alle Tierstudien wurden nach geltenden gesetzlichen Richtlinien und unter Zustimmung der Ethik-Kommission des Regierungspräsidium Tübingen durchgeführt. Die Studien wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit 7-8 Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen (Janvier Labs) durchgeführt. Vor Studienbeginn hatten die Tiere eine Akklimatisierungsphase von mindestens sieben Tagen nach Ankunft. Bei Studien mit Dauer > 1 d wurden die Tiere täglich gewogen, bei kürzeren Studien (z.B. PK, LPS-Challenge) unmittelbar vor der Behandlung.

Die statistische Auswertung der Studien erfolgte über die Software GraphPad Prism.

Pharmakokinetik-Studien

Formulierung und Dosis: Um die Anzahl der verwendeten Tiere zu reduzieren, wurden Testsubstanzen für PK-Studien kassettenweise (üblicherweise 3-5 Substanzen pro Gruppe) formuliert, die Gruppengröße betrug 3. Um gleiche Dosierungen für alle Tiere zu gewährleisten, wurden diese unmittelbar vor der Behandlung gewogen. Die Formulierung der Substanzkassetten erfolgte frisch vor Beginn der jeweiligen Studie. Sofern nicht anders vermerkt, war das Vehikel für i.v. Behandlung 10 % DMSO in murinem Serum, das Applikationsvolumen 5 ml/kg Körpergewicht und die Dosis jeder Testsubstanz 2,4 µmol/kg. Für p.o. Applikation wurde in 10 % DMSO in 0,5 % Zitronensäurelösung formuliert, mit einem Applikationsvolumen von 5 ml/kg und der Dosis 12 µmol/kg. Die Substanzkassetten wurden per Vortexmischer und Ultraschallbad vor der Applikation gründlich homogenisiert. Einige PK-Studien wichen in Tierart, Dosis, Formulierung und/oder Applikationsart vom obigen Muster ab; diese sind bei der Diskussion der jeweiligen Studie (Kapitel **4.3.1**) näher beschrieben.

Probenentnahme: Um Plasma- bzw. Blutkonzentrationen der Testsubstanzen zu bestimmen, wurden den Mäusen während der Studiendauer bis zu acht Mal Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Zeitpunkte hingen hierbei von der Applikationsroute und der Studie ab. Die Tiere wurden, sofern nicht anders vermerkt, 8 h nach Behandlung durch CO₂ Inhalation euthanasiert. Zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration in Organen und Geweben wurden Galle, Hirn, Ileum, Leber, Lunge, Nieren, Milz sowie gegebenenfalls weitere Organe und Herzblut bzw. Herzplasma entnommen. Die Blutproben wurden in mit Antikoagulantien (Heparin oder K-EDTA) versehenen Gefäßen gesammelt, für 8 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen entnommen. Zur Bestimmung der Blutkonzentrationen wurden gegebenenfalls die entstandenen Blutpellets verwendet. Sowohl Plasma- bzw. Blut- als auch Organproben wurden sofort bei -25 °C gelagert.

Aufarbeitung für HPLC-MS: Die Aufarbeitung der Blut- bzw. Plasmaproben erfolgte durch Verdünnung mit ACN und internen Standards (5 nM Sulfentrazon, 1 nM Terbutylazin), Homogenisierung in einem FastPrep FP-120 Homogenisator und anschließender Zentrifugation für 7 min bei 14000 rpm und 4 °C. Organproben wurden mit 1 µl Proteinase K Lösung (0,5 mg/ml in 20 mM Phosphatpuffer) pro mg Organgewicht versetzt und dann analog zu den Plasmaproben aufgearbeitet. Gallenproben wurden mit Wasser verdünnt, homogenisiert und anschließend mit ACN und internen Standards versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Die Analyse per HPLC-MS erfolgte nach den oben bereits beschriebenen Methoden.

Berechnung der Plasmahalbwertszeiten: Halbwertszeiten der Testsubstanzen in Mäusen wurden aus den Plasmakonzentrationen nach i.v. Gabe berechnet, die nach den oben beschriebenen Methoden gemessen wurden. Um den Einfluss von initialen Verteilungsprozessen nach Injektion zu reduzieren, wurden Werte vor $t = 15$ min nicht inkludiert. Werte außerhalb der Quantifikationslimits der Messungen wurden ebenfalls nicht in die Berechnung der Eliminationskonstanten und Halbwertszeiten miteinbezogen. Zur graphischen Berechnung der Eliminationskonstanten wurden die natürlichen Logarithmen der Plasmakonzentrationen in Microsoft Excel gegen die Zeit aufgetragen und eine Ausgleichsgerade gelegt. Der Betrag der Steigung der Geraden

entspricht der Eliminationskonstanten k_{el} , und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ berechnet sich wie folgt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

Berechnung anderer pharmakokinetischer Parameter: AUC- und AUMC-Werte für Plasmaspiegelkurven wurden mit der Software GraphPad Prism erhalten.

Die (scheinbare) Bioverfügbarkeit BV bei nicht-intravenöser Gabe berechnete sich aus:

$$BV = \frac{AUC_{nicht-i.v.}}{AUC_{i.v.} \times KF}$$

Gegebenenfalls wurden die AUC-Werte noch um einen Faktor KF korrigiert, sofern die Dosen beider Applikationsarten unterschiedlich hoch waren.

Die mittlere Verweildauer (= *mean residence time*, MRT) in min der Testsubstanzen wurde für die jeweilige Applikationsart und Dosis aus den AUC- und AUMC-Werten berechnet nach:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

Die Plasma-Clearance Cl in ml/min wurde anhand der applizierten Dosis D und der AUC einer Plasmaspiegelkurve nach i.v. Gabe berechnet nach:

$$Cl = \frac{D}{AUC}$$

Für D wurde hierbei die durchschnittliche molare Dosis pro Tier (unter Annahme von 0,02 kg Körpergewicht bei BALB/c Weibchen) angenommen.

Präparation von Histologieproben per Cryoschnitt zur Fluoreszenzmikroskopie

Organproben für die histologische Analyse wurden in PBS gewaschen und für 4 h bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie zunächst für 8 h in 15 % Sucrose in PBS und dann für 24 h in 30 % Sucrose in PBS inkubiert. Nach vollendeter Inkubationszeit wurden die Organe bei -20 in Tissue Tek OCT Compound eingebettet. Mit einem Microtome-386040-HM-500_OM (MICROM International) wurden die eingebetteten Proben zu Schnitten von 5 µm Dicke verarbeitet. Direkt nach ihrer Anfertigung wurden die Schnitte mit ROTI-Mound FluorCare DAPI Glue auf SuperFrost Objektträgern fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Mikroskopie der fertigen Proben erfolgte auf einem Keyence-BZ 810 (s.o.); die Belichtungszeiten wurden für jedes Organ so eingestellt, dass im gewünschten Kanal keine Autofluoreszenz der Zellen mehr in Proben der Vehikelgruppe zu beobachten war. Anschließend wurden die gleichen Parameter genutzt, um Bilder von Proben der Verumgruppe aufzunehmen.

LPS-Stimulations Studien

Die *in vivo* Effektivität der Testsubstanzen zur Bekämpfung einer LPS-induzierten Immunreaktion wurde mit weiblichen Balb/c Mäusen durchgeführt. Dosis und Applikationsart der Behandlung mit den Testsubstanzen hingen von der jeweiligen Studie ab und werden dort näher ausgeführt (Kapitel **4.3.2**). Behandelt wurde 15, 30 oder 60 min vor der LPS-Gabe. Die Lipopolysaccharide entstammten *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. Die Dosis für LPS, gelöst in steriler PBS, betrug 10 mg/kg Körpergewicht und das Applikationsvolumen 10 ml/kg (i.p.). Alternativ wurden 10 µg/kg LPS zusammen mit 500 mg/kg Galactosamin in einer gemeinsamen Lösung appliziert (ebenfalls 10 ml/kg i.p.).

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der LPS-Lösung (üblicherweise 60, 90 und 180 min) wurde den Tieren Blut über die Schwanzvene entnommen, zentrifugiert (Bedingungen analog zu PK-Proben, s.o.) und der Überstand zur Bestimmung der Konzentration diverser Zytokine verwendet. Nach dem letzten Blutungszeitpunkt wurden die Tiere per CO₂-Inhalation euthanasiert und gegebenenfalls Organe zur Bestimmung der Wirkstoff- oder Zytokinkonzentrationen entnommen.

Psoriasis Modell:

Formulierung der Testsubstanzen: Die Testsubstanzen wurden zunächst in 100 % DMSO gelöst und dann homogen in Basiscreme DAC eingearbeitet. Die finalen Konzentrationen in der Creme waren 2 % Testsubstanz und 5 % DMSO.

Induktion: Weibliche BALB/c Mäuse im Alter von 8 Wochen wurden an Tag 0 der Studie auf Gruppen von je 8 Tieren pro Käfig aufgeteilt. Ein jeweils gleich großer Teil des Rückens jedes Tieres wurde zunächst rasiert und dann Enthaarungscreme (Veet Sensitive) aufgetragen.

Behandlung: An den Folgetagen (1-7) wurden einmal täglich zunächst bei jedem Tier 50 mg Aldara® auf die freigelegte Stelle am Rücken aufgetragen. 2 h später erfolgte jeweils die Behandlung mit den Testsubstanzen bzw. Vehikel (ebenfalls je 50 mg) an der gleichen Stelle.

Symptom-Scoring: Die Tiere wurden täglich gewogen. Die Schwere der Symptomatik wurde durch einen kombinierten Score aus drei einzelnen Parametern (Hautrötung, Krustenbildung, Hautverdickung) erfasst; dabei wurde jeweils mit der Haut komplett unbehandelter Kontrolltiere verglichen. Der Score konnte dabei pro Parameter 0-4 betragen (Tabelle **6.3**), sodass sich für jedes Tier ein additiver Symptom-Score zwischen 0 und 12 ergab. Am letzten Tag der Studie die Dicke der Hautschicht jedes Tieres mit Messschiebern bestimmt.

Tabelle 6.3: Bewertung des Symptom-Scores in Abhängigkeit des Schweregrads

Score	Ausprägung Symptom
0	keine Veränderungen ggü. unbehandelt
1	leichte Veränderung
2	moderate Veränderung
3	schwere Veränderung
4	massive Veränderung

EAE Modell:

Tiere: Die Studie wurde mit 7 Wochen alten weiblichen C57BL/6 Mäusen (Janvier) in Gruppen von je acht Tieren durchgeführt. Nach Ankunft wurde eine Akklimatisierungsphase von sieben Tagen eingehalten.

Diät: Die Gruppen bekamen entweder eine energiereiche und ausgewogene Diät (VRF1, ssniff) oder eine ballaststoffarme, noch energiereichere „Erhaltungsdiaät“ mit vergleichsweise geringerem Anteil an Vitaminen und Spurenelementen (AIN93M, ssniff). Die genaue Zusammensetzung kann der Website des Herstellers entnommen werden.

Vorbereitung und Administration der CFA/MOG-Peptid Emulsion: Zunächst wurde CFA gründlich homogenisiert und in einer 5 ml Spritze 1:1 (je 2 ml) mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid-Lösung (2 mg/ml in PBS) vermischt. Über einen Konnektor wurde die Spritze mit einer weiteren 5 ml Spritze verbunden und die Emulsion zwischen beiden Spritzen so lange transferiert, bis eine homogene, viskose Emulsion entstand. Diese wurde dann in 1 ml Spritzen überführt und jede Maus wurde subkutan mit 100 µl der Emulsion versetzt, sodass 100 µg Peptid pro Tier gegeben wurden.

Vorbereitung und Administration der Pertussistoxin-Lösung: PTX-Stammlösung wurde mit steriler PBS auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Jedes Tier wurde zwei Mal i.p. mit 200 µl der Lösung behandelt: Zunächst direkt nach Injektion der MOG₃₅₋₅₅ Peptid-Lösung, sowie erneut 48 h später.

Symptom-Scoring: Die tägliche Bewertung der Symptome, wie z.B. Gangart, Schwanzmobilität, Gleichgewichtssinn, etc. wurde nach dem Herkel-Score System durch geschultes Personal durchgeführt. Zudem wurde täglich das Körpergewicht in Relation zum Startgewicht erfasst. Das Erreichen eines Symptom-Scores > 4 bzw. eines Körpergewichts < 80 % des Startgewichtes wurde als Abbruchkriterium für das individuelle Tier festgelegt und hatte die vorzeitige Euthanasie durch CO₂-Inhalation zur Folge.

Behandlung: Nach Feststellen eines Symptomscores > 0 wurde die Behandlung begonnen; den Tieren wurden einmal täglich entweder 6 µmol/kg **18** i.p. (10 ml/kg) oder Vehikel (Polyethylenglycol 400/Tween 80 4:1, als 10 %ige wässrige Lösung) verabreicht.

Probennahme: Nach Euthanasie der Tiere wurden ihnen Proben von Plasma, Hirn, Rückenmark, Milz und Leber entnommen und bis zur Auswertung bei -20 °C (für HPLC-MS), - 80 °C (für qPCR) bzw. in 4 % Paraformaldehyd in EtOH (für Histologie) gelagert.

qPCR: Hirn, Rückenmark und Leberproben wurden in Lysepuffer gegeben und mit einem FastPrep-24 5G Gerät (MP Biomedicals) homogenisiert. Die gesamt-RNA wurde mit einem Total RNA Purification Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. RNA Quantität und Reinheit wurden spektrophotometrisch auf einem NP-80 (Implen) überprüft.

Histologie: Nachdem die Gewebeproben für 24 h in 4 % Paraformaldehyd in Ethanol fixiert wurden, wurden die Organe seziiert und in Paraffinblöcke eingebettet. 5 µm dicke Abschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin Färbung (für Zellkerne bzw. Zytoplasma) und Basischem Myelinprotein-Antikörpern eingefärbt und auf einem PANNORAMIC DESK II DW Scanner analysiert.

DSS-Colitis Modell:

Tiere: Die Studien wurden mit 8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (Janvier) in Gruppen von je zehn Tieren (erste Studie) bzw. acht Tieren (zweite und dritte Studie) durchgeführt. Nach Ankunft wurde eine Akklimatisierungsphase von sieben Tagen eingehalten.

Induktion der Symptome: Um eine Entzündungsreaktion im Darm hervorzurufen wurden dem Trinkwasser (Leitungswasser) der Tiere 2,8 % DSS (durchschn. MW 36.000-50.000, MP Biomedicals) beigemischt. Nach fünf Tagen wurde wieder auf normales Trinkwasser gewechselt.

Behandlung, erste Studie: Die Tiere wurden einmal täglich mit Lösungen bzw. Suspensionen von 1,6 µmol/kg Tofacitinibcitrat, 8 µmol/kg **FM-381**, 0,8 µmol/kg **38** oder Vehikel (0,5 % Methylcellulose in Wasser, 10 ml/kg) p.o. behandelt. Die Behandlung erfolgte von Beginn der Studie an, noch vor Auftreten erster Symptome.

Behandlung, zweite Studie: Die Tiere wurden einmal täglich mit Lösungen bzw. Suspensionen von 1,0 µmol/kg Tofacitinibcitrat, **FM-381**, **18**, **29**, **37**, **38**, **39**, **77** oder Vehikel (0,5 % Methylcellulose in Wasser, 10 ml/kg) p.o. behandelt. Die Behandlung erfolgte von Beginn der Studie an Tag -1, einen Tag vor Verabreichung des DSS-haltigen Trinkwassers. Am letzten Studientag wurde nicht mehr behandelt, um die fluorimetrische Analyse der FITC-Dextran Konzentrationen (s.u.) nicht durch ins Plasma aufgenommene, ebenfalls fluoreszierende Reste der Testsubstanzen zu stören.

Behandlung, dritte Studie: Die Tiere wurden einmal täglich mit Lösungen bzw. Suspensionen von 0,3, 1 oder 3 µmol/kg **38**, 0,3 oder 1 µmol/kg **FM-381**, 60 µmol/kg Tofacitinibcitrat oder Vehikel (0,5 % Methylcellulose in Wasser, 10 ml/kg) p.o. behandelt. Die Behandlung erfolgte von Beginn der Studie an Tag -1, einen Tag vor Verabreichung des DSS-haltigen Trinkwassers. Am letzten Studientag wurde nicht mehr behandelt, um die fluorimetrische Analyse der FITC-Dextran Konzentrationen (s.u.) nicht durch ins Plasma aufgenommene, ebenfalls fluoreszierende Reste der Testsubstanzen zu stören.

Symptom-Scoring: Die Symptome wurden anhand zweier Parameter von geschultem Personal bewertet: Zum einen wurde die Konsistenz des Stuhls (normal, weich, ohne Konsistenz, Diarrhoe, wässrige Diarrhoe) von 0-4 bewertet, zum anderen das Vorhandensein von Blut im Stuhl (0, 2 oder 4 Punkte). Beides zusammen wurde zum Krankheits-Score addiert. Das Erreichen eines Krankheits-Score > 7 bzw. eines Körpergewichts < 80 % des Startgewichtes wurde als Abbruchkriterium für das individuelle Tier festgelegt und hatte die vorzeitige Euthanasie durch CO₂-Inhalation zur Folge. Bei einem Score > 5 oder Kombinationen aus erhöhtem Score und niedrigem Körpergewicht, welche einzeln noch unter den Grenzwerten liegen würden, wurden ggf. ebenfalls Tiere nach Konsultation des Tierarztes vorzeitig aus der Studie entfernt und euthanasiert.

Darm-Permeabilität: Zur Untersuchung der Darm-Permeabilität wurde Tieren 2 h vor ihrem Ausscheiden aus der Studie eine Mischung aus 200 mg/kg Lactulose, 80 mg/kg Mannitol und 500 mg/kg FITC-gekoppeltes Dextran (durchschnittliches MW 6.000) in Wasser (10 ml/kg p.o.) verabreicht. Gesammelter Urin wurde zur Analyse der Konzentration an aufgenommenem Lactulose und Mannitol per HPLC-MS (analog zur bei PK-Studien beschriebenen Methode) entnommen. Die Konzentration an aufgenommenem FITC-Dextran wurde über einen VersaMax Tunabale Microplate Reader in Sarstedt ELISA Platten fluorimetrisch aus Herzserum bestimmt, indem über definierte Mengen an FITC-Dextran in Plasma eine Standardkurve erstellt wurde.

Histologie: Die Präparation und Analyse der histologischen Gewebeproben wurde analog zur EAE-Studie (s.o.) durchgeführt.

Durchflusszytometrie (nur dritte Studie): Nach Euthanasie der Tiere wurden die Milzen entnommen und sofort in Pufferlösung (PBS+ 1 % FBS, Biowest) gegeben. Sie wurden anschließend durch ein 40 µm Zellsieb zerkleinert und die erhaltene Einzelzellsuspension mit PBS auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt. Die Suspensionen wurden für 5 min bei 400 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach Resuspension der Zellen mit 1 ml PBS wurden von jeder Probe 100 µl entnommen und die Zellkonzentration auf einem Biorad ZE5 Analyzer bestimmt. Gegebenenfalls wurden die Konzentrationen der Proben durch Verdünnung mit PBS angeglichen. Pro Probe wurden dann ca. 2×10^6 Zellen in Reaktionsgefäße überführt.

Die Viabilität der Zellen wurde durch Färbung mit Zombie NIR (Biolegend, Stocklösung 1:500 in PBS) erfasst, indem die Probengefäße mit 50 µl der Stocklösung versetzt und für 15 min im Dunkeln inkubiert wurden. Die Färbung der Epitope erfolgte mit Fluorophor-markierten Antikörpern: für CD4 mit VioBlue (final 1:50 verdünnt), für CD25 mit APC (final 1:50 verdünnt), für FOXP3 mit anti-FOXP3 (final 1:50 verdünnt), für CD3 mit PE/Cy5 (final 1:160 verdünnt), für CD11b mit BV605 (final 1:320 verdünnt), für B220 mit FITC (final 1:80 verdünnt) und für CD8 mit APC (final 1:80 verdünnt). Für die Oberflächenmarker wurde für 40 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, bei FOXP3 unter gleichen Bedingungen über Nacht.

Die durchflusszytometrische Analyse wurde auf einem Biorad ZE5 Analyzer bei 3000 Events/s durchgeführt.

CIA Modell:

Tiere: Die Studie wurde mit weiblichen, ca. 8 Wochen alten DBA1-Mäusen (Janvier) durchgeführt. Nach Ankunft wurde eine Akklimatisierungsphase von sieben Tagen eingehalten.

Herstellung der Kollagenemulsionen: Bovines Typ II Kollagen (Genentaur/Chondrex) wurde über Nacht bei 4 °C in 10 mM sterilfiltrierter Essigsäure zu einer Konzentration von 4 mg/ml gelöst. Die fertige Kollagenlösung wurde dann unter steter Kühlung mit CFA (Genentaur/Chondrex, mit 4 mg/ml *M. tuberculosis*) bzw. Incomplete Freund's Adjuvans (Genentaur/Chondrex) nach der Zweispritzenmethode (s.o.) zu einer homogenen Emulsion verarbeitet.

Induktion des Krankheitsmodells und Booster-Injektion: An Tag 0 der Studie wurden die Tiere subkutan mit 100 µl der Kollagenemulsion (mit CFA) injiziert. An Tag 21 wurden auf diese Art erneut 100 µl Emulsion (mit Incomplete Freund's Adjuvans) injiziert.

Symptom-Scoring: Die Bewertung der Symptomatik erfolgte nach der Boost-Injektion täglich. Dabei wurden visuell die Pfoten der Tiere auf Schwellung und Rötung untersucht und dabei pro Pfote ein Score von 0-3 vergeben, sodass für jedes Tier ein Gesamtscore von 0-12 möglich war. Der Durchmesser der Pfoten wurde zur Quantifizierung der Schwellung ebenfalls erfasst. Körpergewichte wurden vor Eintreten erster Symptome dreimal pro Woche, danach täglich gewogen.

Behandlung: Die Behandlung der Tiere erfolgte therapeutisch ab Erreichen eines Scores > 0. Behandelt wurde täglich mit **FM-381, 38** oder Vehikel p.o. (4 % DMSO in PBS, 5 ml/kg) bei einer Dosis von 16 µmol/kg. Eine weitere Gruppe wurde jeden zweiten Tag mit 10 mg/kg Etanercept (Enbrel) i.p. behandelt.

Durchflusszytometrie: Die durchflusszytometrische Analyse der Milzproben wurde analog zur dritten Colitis-Studie (s.o.) durchgeführt.

6.4 Allgemeine Synthesevorschriften

A: Nukleophile Substitution am Halogenaromaten

In einem ausreichend proportionierten, dreihalsigen Rundkolben werden 1,0 Äq. des halogenierten Aromaten in IPrOH (0,2 M) gegeben und unter Rühren mit 1,4 Äq. Triethylamin und 1,25 Äq. (sofern nicht anders angegeben) des jeweiligen Amin-Nukleophils versehen; beim Einsatz von Hydrochloriden wird die Menge an Triethylamin um die äquimolare Menge erhöht. Die Mischung wird zum Rückfluss erhitzt und gerührt, bis DC oder MS-Kontrolle die vollständige Umsetzung anzeigen. Anschließend wird eine 2:1 Mischung aus H₂O und ges. NH₄Cl-Lösung portionsweise zugegeben (35 ml pro Gramm des Aromaten), woraufhin das Produkt beginnt auszufallen. Es wird für 5 min in der Hitze weitergerührt, dann auf RT abgekühlt und anschließend mindestens 30 min im Eisbad gerührt. Das Präzipitat wird über Vakuumfiltration abgetrennt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Sofern nicht anders angegeben, wird das Produkt ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

B: Reduktion aromatischer Nitrogruppen zu Aminen

1,0 Äq. des Nitroaromaten werden in EtOAc (0,075 M) gelöst und die gerührte Mischung mit Argon gesättigt. Durch Verbindung des Systems zu einer Waschflasche und einer darauffolgenden Wassersäule wird ein gelinder Überdruck im Reaktionsgefäß sichergestellt. 0,1 Massenäquivalente Pt/C (5 %) werden zugefügt und erneut wird mit Argon gesättigt. Anschließend wird das System mit Wasserstoff gesättigt, wobei die Waschflasche als Reservoir dient, und bei Raumtemperatur gerührt bis DC- oder MS-Kontrolle die vollständige Umsetzung anzeigen. Der Verbrauch an Wasserstoff (bzw. eventuelle Verluste) kann hierbei semiquantitativ an der Höhe der Wassersäule abgelesen werden; falls nötig, wird weiterer Wasserstoff nachgegeben. Nach vollendeter Reaktion wird die Apparatur erneut mit Argon gesättigt und somit übriger Wasserstoff entfernt. Anschließend wird diese geöffnet und die Suspension durch Filtration über Kieselgur von Feststoffpartikeln befreit. Der Filterkuchen wird mit EtOAc gewaschen und das Filtrat im Vakuum getrocknet. Das Produkt kann anschließend direkt weiterverwendet werden.

C: Alternative Reduktionsmethode für aromatische Nitrogruppen

1,0 Äq. der Nitroverbindung werden in Ethanol (0,1 M) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Eine 0,8 M Lösung von Na₂S₂O₄ in Wasser (6 Äq.) wird portionsweise zugefügt und die Lösung auf 70 °C erhitzt. Es wird gerührt, bis DC- oder MS-Kontrolle die vollständige Umsetzung anzeigen, üblicherweise über Nacht. Der ethanolische Anteil der Lösung wird unter vermindertem Druck verdampft und die resultierende wässrige Mischung in einen Scheidetrichter überführt. Nach mehrmaligem Ausschütteln mit DCM werden die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum verdampft, um das Produkt als Feststoff zu erhalten. Falls nötig wird das Rohprodukt noch per Flash-Chromatographie aufgereinigt.

D: Imidazol-Ringschluss

Das nach **B** oder **C** erhaltene vizinale Diamin (1 Äq.) wird in DMF gelöst (0,2 M) und 1,2 Äq. Hydroxymethylfurfural werden zugefügt. Die Mischung wird für 15 min bei RT

gerührt, anschließend werden 3 % (V/V) Wasser und 0,7 Äq. KHSO_5 zugefügt. Üblicherweise ist erneute Zugabe von KHSO_5 im Laufe der Reaktion nötig, deren Fortschritt per MS kontrolliert wird. Nach vollständiger Umsetzung zum geschlossenen Imidazol werden 2 Äq. Kaliumcarbonat-Lösung (0,2 M) zugefügt und der resultierende bräunliche Niederschlag per Filtration gesammelt. Nach Trocknung im Vakuum wird das Rohprodukt entweder per Säulenchromatographie oder Flash-Chromatographie aufgereinigt.

E: Dess-Martin-Oxidation der furylischen Alkohole

Das in **D** erhaltene Produkt wird in DCM gelöst (0,2 M) und im Eisbad auf ca. 0 °C gekühlt. Anschließend werden 1,2 Äq Dess-Martin-Periodinan zugefügt und das Eisbad entfernt, sodass der gerührte Ansatz langsam RT annimmt. Nachdem DC oder MS die vollständige Umsetzung des Edukts anzeigen, wird der Ansatz mit ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt und die Phasen in einem Scheidetrichter getrennt. Nach fünfmaliger Extraktion der wässrigen Phase mit DCM werden die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend per Säulenchromatographie oder Flash-Chromatographie aufgereinigt.

F: Tosyl-Entschützung

Der in **E** erhaltene Aldehyd wird in 1 M methanolischer KOH-Lösung gelöst bzw. suspendiert und bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem DC oder MS-Kontrolle die vollständige Umsetzung anzeigen wird der Ansatz mit ges. NH_4Cl -Lösung versetzt und in einen Scheidetrichter überführt. EtOAc und Wasser werden in ausreichenden Volumina zugefügt, um klare, getrennte Phasen zu erhalten. Die organische Phase wird zwei bis drei Mal mit Wasser, danach einmal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum entfernt. Das erhaltene feste Rohprodukt wurde, wenn nötig, per Säulenchromatographie oder Flash-Chromatographie aufgereinigt.

G: Knoevenagel-Kondensation der furylischen Aldehyde mit Cyanoacetamid-Derivaten

Das in **F** oder **F1** erhaltene Produkt wird in MeOH, EtOH oder iPrOH gelöst (0,2 M) und mit 0,1 Äq. Piperidin sowie 1,0 bis 1,1 Äq. des jeweiligen Cyanoacetamids versetzt. Die Lösung wird nun auf 50-70 °C erhitzt, entweder in einem Ölbad oder einem Schüttelinkubator. Nachdem DC- oder MS-Kontrolle die vollständige Umsetzung anzeigen, wird der Ansatz für mehrere Stunden bzw. über Nacht bei -20 °C gelagert und anschließend der Feststoff durch Filtration gewonnen, oder das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie aufgereinigt. Bei beiden Methoden fallen üblicherweise Mischungen der möglichen *E/Z* Isomere an.

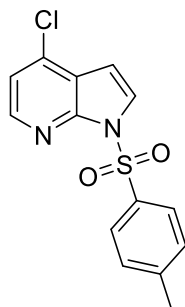
H: Reduktion des Michael-Akzeptors

Das in **G** erhaltene Produkt wird in MeOH suspendiert (0,1 M) und portionsweise mit 1,1 Äq. NaBH_4 versetzt. Es wird bei RT gerührt, bis MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung anzeigen. Anschließend wird langsam Wasser zugegeben, der Methanol abrotiert und die Suspension in ges. NaHCO_3 und DCM aufgenommen. Der Ansatz wird in einen Scheidetrichter überführt, dreimal mit DCM extrahiert und die organische

Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einrotieren erhält man das Produkt, i. d. R. ist keine weitere Aufreinigung mehr nötig.

6.5 Synthese und Analytik der beschriebenen Verbindungen

4-Chlor-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin (1)

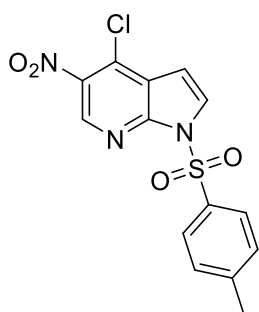


C₁₄H₁₁ClN₂O₂S
 exakte Masse: 306,023
 M_R: 306,764

In einem dreihalsigen Rundkolben werden 25 g 4-Chloro-7-azaindol (163,9 mmol) in 700 ml trockenem THF gelöst. Die Lösung wird im Eisbad gekühlt und unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend werden 7,6 g NaH (60 % Dispersion in Mineralöl, 196,6 mmol, 1,2 Äq.) portionsweise zugegeben und nach vollständiger Zugabe für 15 min gerührt. Dann werden 33 g p-Tosylchlorid (172 mmol, 1,05 Äq.) in 120 ml trockenem THF gelöst und tropfenweise zum Ansatz gegeben. Nach vollständiger Zugabe wird das Eisbad entfernt und bei RT für zwei Stunden gerührt, bis DC- und MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung des 4-Chlor-7-azaindol indizieren. Die Mischung wird mit 25 ml ges. NH₄Cl-Lösung gequenchet, mit EtOAc verdünnt und in einen Scheidetrichter überführt. Die

organische Phase wird zweimal mit 200 ml 1M K₂CO₃ und einmal mit 200 ml ges. NaCl gewaschen und einrotiert. Der erhaltene Feststoff wird mit kaltem MeOH versehen und mit einem Glasstab zerrieben. Dann wird dekantiert und der Feststoff im Vakuum getrocknet. Man erhält 46 g (92 %) **1** als braunen Feststoff. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 147.5, 145.6, 145.2, 136.7, 135.1, 129.8, 128.1, 126.92, 122.2, 119.0, 103.3, 21.6. MS (ESI) *m/z*: 307,33 [M+H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 14,0 min (Gradient A)

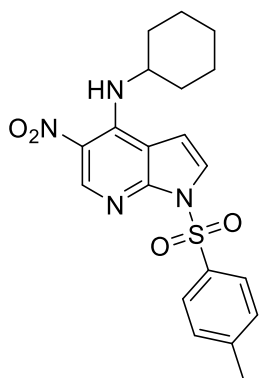
4-Chlor-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin (2)



C₁₄H₁₀ClN₃O₄S
 exakte Masse: 351,008
 M_R: 351,761

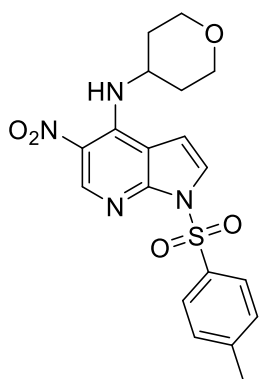
44 g **1** (143,4 mmol) und 25,5 g Tetramethylammoniumnitrat (186,4 mmol, 1,3 Äq.) werden in einem dreihalsigen Kolben in 700 ml DCM gelöst. Der Ansatz wird in ein Eisbad getaucht, bei 0-5 °C gerührt und mit Argon versetzt. Im Verlauf von ca. 8 h werden 26,3 ml Trifluoressigsäureanhydrid (186,4 mmol, 1,3 Äq.) tropfenweise zugegeben und über Nacht ohne Kühlung weitergerührt. Bei Detektion unverbrauchten Edukts **1** werden weitere 10 ml Trifluoressigsäureanhydrid über 8 h zugetropft und erneut über Nacht gerührt. Die gelbe Lösung wird mit DCM verdünnt und mit Wasser, ges. NaHCO₃, ges. Na₂CO₃ und ges. NaCl gewaschen. Die verbliebene rote organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Der Feststoff wird in MeOH suspendiert, über Nacht bei -20 °C

gelagert und filtriert. Nach Waschen mit geringen Mengen an kaltem MeOH und Trocknen im Vakuum erhält man 36,9 g (72 %) **2** als beiges Pulver. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.91 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 8.04 – 7.95 (m, *J* = 7.8, 4.0 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.28 – 7.20 (m, 2H), 6.79 – 6.71 (m, *J* = 3.8 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 147.1, 146.6, 142.2, 140.5, 134.3, 131.2, 130.1, 130.0, 128.5, 122.9, 104.5, 21.8. MS (ESI) *m/z*: 352,2 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 20,9 min (Gradient A)

N-Cyclohexyl-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (3a)

C₂₀H₂₂N₄O₄S
 exakte Masse: 414,136
 M_R: 414,480

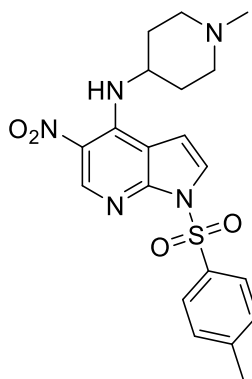
Die Synthese von **3a** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 5,03 g **2** und 2,06 ml Cyclohexylamin. Man erhält 5,65 g (96 %) **3a** als roten Feststoff. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.01 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.21 (d, 2H), 6.62 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.97 – 3.77 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.10 – 1.96 (m, 2H), 1.86 – 1.69 (m, 2H), 1.50 – 1.12 (m, 6H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 148.9, 146.4, 145.9, 144.9, 134.9, 129.8, 128.6, 126.5, 123.6, 107.6, 106.7, 52.9, 33.5, 25.3, 24.4, 21.8. MS (ESI) *m/z*: 415,33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 21,7 min (Gradient A)

5-Nitro-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (3b)

C₁₉H₂₀N₄O₅S
 exakte Masse: 416,115
 M_R: 416,452

Die Synthese von **3b** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 13,0 g **2** und 4,78 g 4-Aminotetrahydropyran. Man erhält 14,57 g (95 %) **3b** als hellgelben Feststoff. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.89 (s, 1H), 8.85 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 2H), 7.81 – 7.74 (m, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.08 – 6.99 (m, 1H), 4.34 – 4.22 (m, 1H), 3.88 – 3.75 (m, 2H), 3.56 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.02 – 1.90 (m, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.74 – 1.57 (m, *J* = 19.6, 9.6 Hz, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 148.0, 146.0, 145.3, 144.1, 134.1, 130.1, 128.0, 126.4, 124.2, 107.5, 107.1, 65.0, 49.3, 32.8, 21.1. MS (ESI) *m/z*: 417.4 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 17.6 min (Gradient A)

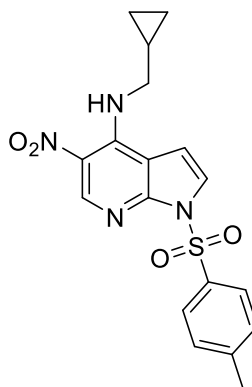
N-(1-Methylpiperidin-4-yl)-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (3c)



C₂₀H₂₃N₅O₄S
 exakte Masse: 429,147
 M_R: 429,495

Die Synthese von **3c** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 8,35 g **2** und 3,58 ml 4-Amino-1-methylpiperidin. Man erhält 8,9 g (87 %) **3c** als gelben Feststoff. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.08 – 8.96 (m, *J* = 11.6 Hz, 2H), 8.05 – 7.89 (m, *J* = 11.3, 8.4 Hz, 2H), 7.56 – 7.44 (m, *J* = 11.5, 4.1 Hz, 1H), 7.23 (t, *J* = 9.5 Hz, 2H), 6.69 – 6.58 (m, *J* = 10.6, 4.2 Hz, 1H), 3.94 (s, 1H), 2.77 – 2.62 (m, 2H), 2.36 – 2.17 (m, *J* = 19.2, 9.6 Hz, 8H), 2.11 – 1.98 (m, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.78 – 1.63 (m, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 148.8, 146.2, 145.9, 144.8, 134.7, 129.7, 128.5, 126.6, 123.7, 107.5, 106.5, 53.3, 50.2, 46.2, 32.5, 21.7. MS (ESI) *m/z*: 430.45 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 13.1 min (Gradient B).

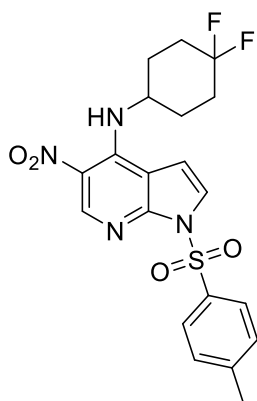
N-(Cyclopropylmethyl)-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (3d)



C₁₈H₁₈N₄O₄S
 exakte Masse: 386,105
 M_R: 386,426

Die Synthese von **3d** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 8,14 g **2** und 2,48 ml 1-Cyclopropylmethanamin. Man erhält 8,35 g (93 %) **3d** als gelben Feststoff. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.87 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.60 – 3.53 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.25 – 1.10 (m, *J* = 12.3, 7.3 Hz, 1H), 0.59 – 0.51 (m, 2H), 0.39 – 0.33 (m, *J* = 4.8 Hz, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 148.2, 146.2, 145.5, 145.4, 134.4, 130.2, 128.2, 126.3, 123.8, 123.7, 108.1, 49.4, 40.6, 40.4, 40.1, 39.8, 39.5, 39.2, 39.0, 21.4, 10.9, 3.6. MS (ESI) *m/z*: 387.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 20.7 min (Gradient B).

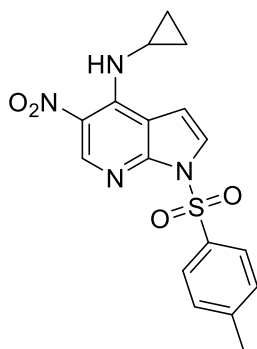
N-(4,4-Difluorocyclohexyl)-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (3e)



C₂₀H₂₀F₂N₄O₄S
 exakte Masse: 450,117
 M_R: 450,461

Die Synthese von **3e** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 1,95 g **2** und 1,0 g 4,4-Difluorocyclohexylamin (1,05 Äq.). Man erhält 2,18 g (87 %) **3e** als gelben Feststoff. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.89 (s, 1H), 8.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.03 – 7.98 (m, 2H), 7.81 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.35 – 4.26 (m, *J* = 8.3 Hz, 1H), 2.39 – 2.33 (m, 5H), 2.10 – 1.99 (m, *J* = 9.4 Hz, 4H), 1.82 – 1.68 (m, *J* = 21.1, 10.2 Hz, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 146.0 (s), 145.2 (s), 144.3 (s), 134.1 (s), 130.3 (d, *J* = 10.5 Hz), 130.02 (s), 127.9 (s), 126.5 (s), 124.1 (s), 107.4 (s), 49.5 (s), 30.8 (t, *J* = 24.6 Hz), 28.5 (d, *J* = 9.5 Hz), 21.1 (s). MS (ESI) *m/z*: 451.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 18.3 min (Gradient A).

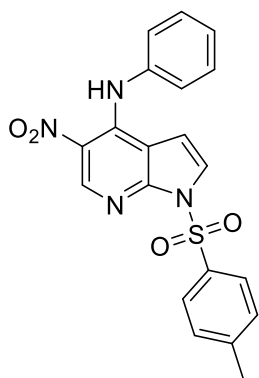
N-Cyclopropyl-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (3f)



C₁₇H₁₆N₄O₄S
 exakte Masse: 372,089
 M_R: 372,399

Die Synthese von **3f** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 2,03 g **2** und 501 µl Cyclopropylamin. Man erhält 1,83 g (85 %) **3f** als gelben Feststoff. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.98 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 3.04 – 2.89 (m, *J* = 6.6, 3.0 Hz, 1H), 2.30 (s, 3H), 0.97 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 0.78 – 0.73 (m, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 148.8, 146.9, 145.8, 145.8, 134.8, 129.8, 128.5, 126.6, 123.3, 108.9, 107.4, 27.2, 21.7, 10.1. MS (ESI) *m/z*: 373.40 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 18.5 min (Gradient A).

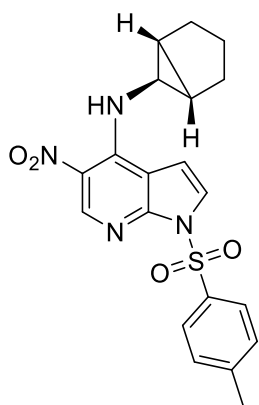
5-Nitro-N-phenyl-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (**3g**)



C₂₀H₁₆N₄O₄S
 exakte Masse: 408,089
 M_R: 408,432

Die Synthese von **3g** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 5,17 g **2** und 5,5 ml Anilin (4,1 Äq.). Nach Filtration und Waschen des Rohprodukts wird dieses in einem geringen Volumen Ether suspendiert und für 1h bei -20 °C gelagert. Anschließend wird der rötliche Überstand verworfen und der verbliebene Feststoff im Vakuum getrocknet. Man erhält 5,32 g (88 %) **3g** als orangefarbenen Feststoff. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.98 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.60 – 7.34 (m, 9H), 2.36 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 148.3, 146.3, 145.0, 143.3, 139.1, 134.4, 130.3, 129.7, 128.2, 127.7, 126.9, 124.1, 109.4, 106.3, 99.7, 21.4. MS (ESI) *m/z*: 409.40 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 20.1 min (Gradient A).

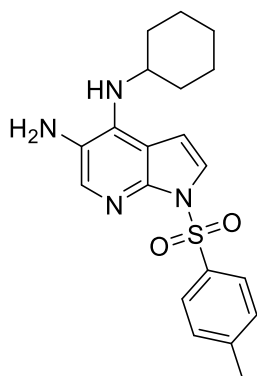
N-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (**3h**)



C₂₀H₂₀N₄O₄S
 exakte Masse: 412,121
 M_R: 412,464

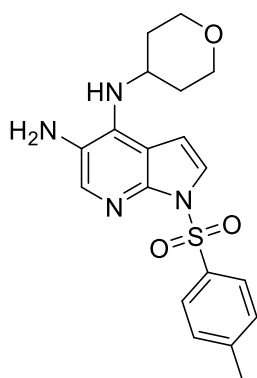
Die Synthese von **3h** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 5,76 g **2** (16,34 mmol, 1.0 Äq.) und 1,59 g **70** (*cis/trans* Mischung) (16,34 mmol, 1.0 Äq.). Nach Fällung und Filtration wird das erhaltene *cis/trans*-gemischte Rohprodukt per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 5,0 g (75 %) des isomerenreinen **3h** als gelben Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.06 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 2.76 – 2.72 (m, *J* = 1.9 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.02 (dd, *J* = 13.0, 7.9 Hz, 2H), 1.85 (ddd, *J* = 21.6, 10.2 Hz, 2H), 1.71 (td, 1H), 1.59 (bs, 2H), 1.25 – 1.12 (m, 1H). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 148.8, 146.6, 145.9, 145.8, 135.1, 129.8, 128.6, 126.7, 123.3, 108.9, 106.8, 34.3, 28.6, 27.2, 21.8, 21.6. MS (ESI) *m/z*: 413.20 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 21.2

min (Gradient A).

N⁴-Cyclohexyl-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4,5-diamin (4a)

C₂₀H₂₄N₄O₂S
 exakte Masse: 384,162
 M_R: 384,498

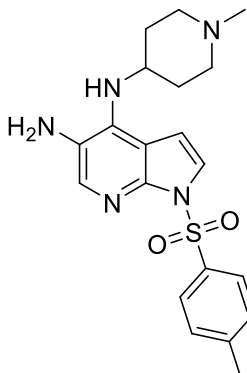
Die Synthese von **4a** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **B** aus 5,65 g **3a**. Man erhält 5,24 g (quant.) **4a** als violetten, festen Schaum. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.36 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.46 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.66 – 3.53 (m, *J* = 11.6, 8.2 Hz, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.08 (s, 1H), 2.00 – 1.94 (m, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.75 – 1.66 (m, 2H), 1.35 – 1.16 (m, 6H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 146.1, 144.6, 140.6, 137.4, 135.7, 129.4, 127.9, 123.0, 122.3, 108.0, 104.9, 52.3, 34.3, 25.6, 24.8, 21.6. MS (ESI) *m/z*: 385.14 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 14.4 min (Gradient A)

N⁴-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4,5-diamin (4b)

C₁₉H₂₂N₄O₃S
 exakte Masse: 386,141
 M_R: 386,470

Die Synthese von **4b** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **B** aus 14,1 g **3b**. Man erhält 13,08 g (quant.) **4b** als fliederfarbenen Schaum. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.17 – 7.12 (m, *J* = 8.3 Hz, 3H), 6.44 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 4.73 – 4.64 (m, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.95 – 3.89 (m, 2H), 3.44 (t, *J* = 16.0, 6.2 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.92 (s, 2H), 1.53 – 1.44 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 146.0, 144.8, 140.1, 137.8, 135.7, 129.5, 128.0, 123.5, 122.8, 108.4, 104.5, 66.6, 49.8, 34.5, 21.7. MS (ESI) *m/z*: 387.4 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 10.4 min (Gradient B)

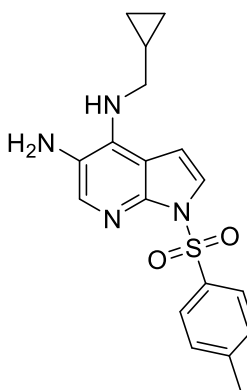
N⁴-(1-methylpiperidin-4-yl)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4,5-diamin (4c)



C₂₀H₂₅N₅O₂S
 exakte Masse: 399,173
 M_R: 399,513

Die Synthese von **4c** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **B** aus 8,85 g **3c**. Man erhält 8,07 g (98 %) **4c** als fliederfarbenen Schaum. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.44 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.69 – 3.45 (m, 1H), 2.88 (s, 1H), 2.79 – 2.67 (m, *J* = 11.6 Hz, 2H), 2.28 – 2.20 (m, *J* = 7.6 Hz, 6H), 2.10 (t, *J* = 10.5 Hz, 2H), 2.03 – 1.90 (m, *J* = 10.0 Hz, 3H), 1.58 – 1.43 (m, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 146.0, 144.7, 140.4, 137.6, 135.7, 129.5, 127.9, 123.3, 122.7, 108.2, 104.7, 54.2, 50.0, 46.2, 33.4, 21.6. MS (ESI) *m/z*: 400.5 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 8.4 min (Gradient B).

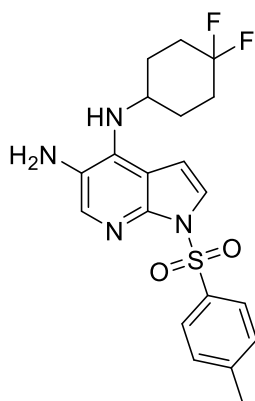
N⁴-(cyclopropylmethyl)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-4,5-diamin (4d)



C₁₈H₂₀N₄O₂S
 exakte Masse: 356,131
 M_R: 356,444

Die Synthese von **4d** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **B** aus 8,35 g **3d**. Man erhält 7,56 g (98 %) **4d** als dunkelgelben Schaum. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 5.47 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.39 – 3.27 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.11 – 1.01 (m, 1H), 0.51 – 0.42 (m, 2H), 0.32 – 0.18 (m, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 144.7, 143.6, 137.2, 135.0, 132.7, 129.5, 127.3, 125.9, 122.3, 107.8, 106.0, 48.9, 21.0, 11.3, 3.4. MS (ESI) *m/z*: 357.27 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 11.7 min (Gradient A).

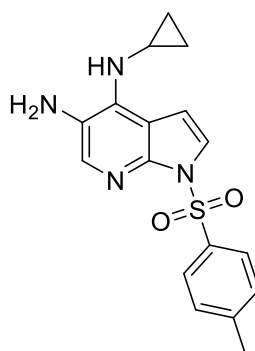
N⁴-(4,4-Difluorocyclohexyl)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-4,5-diamin (4e)



C₂₀H₂₂F₂N₄O₂S
 exakte Masse: 420,143
 M_R: 420,479

Die Synthese von **4e** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **B** aus 3,43 g **3e**. Nach Detektion unbekannter Verunreinigungen wird nach der Filtration per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 2,51 g (78 %) **4e** als grauen Schaum. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.45 – 7.39 (m, *J* = 4.2 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.50 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.90 – 3.74 (m, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.07 – 1.98 (m, *J* = 9.5 Hz, 4H), 1.90 – 1.78 (m, 4H), 1.62 – 1.50 (m, *J* = 20.4, 10.3 Hz, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 146.4, 144.6, 139.3, 135.5, 135.2, 129.2, 127.6, 127.4, 123.0, 107.6, 104.3, 49.9, 31.5, 28.8, 20.8. MS (ESI) *m/z*: 421.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 17.7 min (Gradient A).

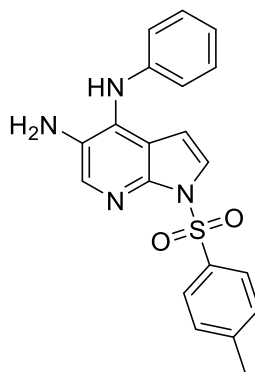
N⁴-Cyclopropyl-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4,5-diamin (4f)



C₁₇H₁₈N₄O₂S
 exakte Masse: 342,115
 M_R: 342,417

Die Synthese von **4f** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **B** aus 1,65 g **3f**. Man erhält 1,57 g (quant.) **4f** als blass pinken Feststoff. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 2.84 – 2.68 (m, *J* = 4.0, 2.5 Hz, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.21 – 1.15 (m, *J* = 8.3, 5.1 Hz, 1H), 0.83 – 0.71 (m, 2H), 0.61 – 0.52 (m, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 146.0, 144.7, 141.6, 137.0, 135.7, 129.5, 127.9, 122.8, 122.3, 109.1, 105.9, 26.6, 21.6, 9.7. MS (ESI) *m/z*: 343.3 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 10.5 min (Gradient A).

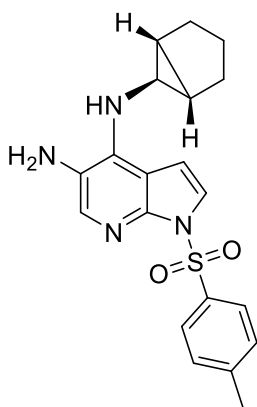
N⁴-phenyl-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-4,5-diamin (4g)



C₂₀H₁₈N₄O₂S
 exakte Masse: 378,115
 M_R: 378,450

Die Synthese von **4g** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **C** aus 5,32 g **3g**. Man erhält 4,8 g (98 %) **4g** als Feststoff. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.20 – 7.11 (m, 3H), 6.93 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 5.98 (s, 1H), 5.89 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 144.9, 144.3, 141.7, 136.5, 135.7, 132.3, 129.6, 129.3, 129.1, 127.9, 124.3, 122.4, 119.4, 114.2, 104.5, 21.7. MS (ESI) *m/z*: 379.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 15.2 min (Gradient A).

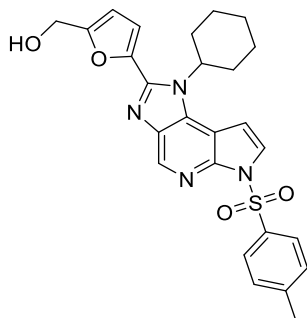
N⁴-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-4,5-diamin (4h)



C₂₀H₂₂N₄O₂S
 exakte Masse: 382,146
 M_R: 382,482

Die Synthese von **4h** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **C** aus 3,7 g **3h**. Man erhält 3,4 g (98 %) **4h** als Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 4.92 (bs, 1H), 2.94 (bs, 2H), 2.54 – 2.50 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.91 (dd, *J* = 12.7, 8.0 Hz, 2H), 1.75 (ddd, *J* = 20.7, 10.8 Hz, 2H), 1.63 (td, *J* = 12.9, 8.4 Hz, 1H), 1.42 (bs, 2H), 1.15 – 1.03 (m, *J* = 19.7, 8.3 Hz, 1H). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 146.0, 144.6, 141.5, 137.0, 135.9, 129.5, 127.8, 122.7, 122.3, 109.0, 105.3, 34.1, 28.3, 27.2, 21.9, 21.6. MS (ESI) *m/z*: 383.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 14.3 min (Gradient A).

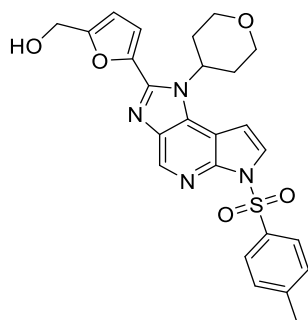
5-(1-Cyclohexyl-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5a)



C₂₆H₂₆N₄O₄S
 exakte Masse: 490,167
 M_R: 490,578

Die Synthese von **5a** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 4,97 g **4a**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (DCM/MeOH, automatischer Gradient). Man erhält 5,21 g (82 %) **5a** als hellbraunes Pulver. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.88 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.33 – 7.16 (m, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.21 – 2.09 (m, *J* = 0.9 Hz, 2H), 1.98 – 1.67 (m, *J* = 17.0 Hz, 5H), 1.61 – 1.23 (m, 5H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.1, 145.3, 144.5, 143.3, 142.8, 138.1, 136.8, 135.2, 133.1, 129.6, 128.2, 124.8, 114.5, 109.5, 107.7, 104.6, 57.1, 30.7, 26.9, 25.6, 24.8, 21.6. MS (ESI) *m/z*: 491.4 [m + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 19.6 min (Gradient A)

(5-(1-(Tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5b)

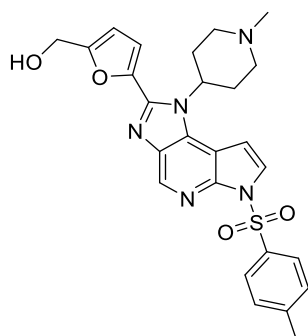


C₂₅H₂₄N₄O₅S
exakte Masse: 492,147
M_R: 492,550

Die Synthese von **5b** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 14,0 g **4b**. Aufreinigung per Säulenchromatographie (DCM → DCM/EtOAc, 1:2). Man erhält 7,56 g (42 %) **5b** als gelbweißes Pulver. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.79 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.13 – 4.93 (m, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.14 – 3.99 (m, 3H), 3.43 (t, *J* = 11.4 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.96 (s, 1H), 1.80 – 1.66 (m, *J* = 13.0, 4.3 Hz, 2H), 1.22 – 1.10 (m, 1H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.1, 145.4, 144.2, 143.6, 142.9, 138.3, 137.1, 135.3, 132.9, 129.7, 128.3, 125.1, 114.7, 109.8,

107.8, 104.9, 67.3, 57.3, 53.3, 30.5, 21.7. MS (ESI) *m/z*: 493.3 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 16.6 min (Gradient A)

(5-(1-(1-Methylpiperidin-4-yl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5c)

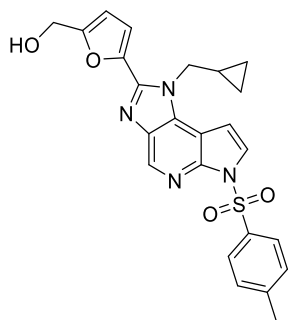


C₂₆H₂₇N₅O₄S
exakte Masse: 505,178
M_R: 505,593

Die Synthese von **5c** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 6,0 g **4c**. Das *in situ* entstandene N-Oxid wird noch vor dem Aufreinigungsschritt mit 15 ml TiCl₃-Lösung (12 % in HCl) behandelt und 2 h bei RT gerührt, bis kein N-Oxid mehr per MS detektiert wird. Die Mischung wird mit Chloroform verdünnt und 60 ml KOH (15 % in H₂O) zugefügt. Der Ansatz wird in einen Scheidetrichter überführt und die Wasserphase mehrfach mit Chloroform extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden einrotiert und das Rohprodukt per Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient). Man erhält 3,21 g (42 %) **5c** als beigen Feststoff. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.77 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz,

2H), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.94 – 4.81 (m, 1H), 4.54 (s, 2H), 2.99 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 2.54 – 2.39 (m, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.16 – 2.06 (m, 2H), 1.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.0, 145.5, 144.3, 142.6, 142.0, 137.4, 137.0, 134.7, 132.5, 129.9, 127.7, 125.5, 114.6, 109.0, 107.5, 105.3, 55.8, 54.4, 53.7, 45.9, 29.4, 21.0. MS (ESI) *m/z*: 506.38 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 12.9 min (Gradient B).

(5-(1-(Cyclopropylmethyl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5d)

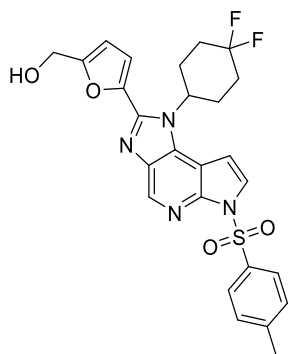


$C_{24}H_{22}N_4O_4S$
exakte Masse: 462,136
 M_R : 462,524

Die Synthese von **5d** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 7,56 g **4d**. Nach Filtration und Trocknung des erhaltenen Feststoffes ist keine weitere Aufreinigung nötig. Man erhält 8,38 g (85 %) **5d** als braunen Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.73 (s, 1H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.97 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.23 (dd, J = 3.7, 2.7 Hz, 2H), 6.58 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 5.47 (s, 1H), 4.67 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.54 (s, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.33 – 1.15 (m, 1H), 0.44 – 0.34 (m, J = 7.4, 3.4, 2.0 Hz, 4H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.7, 145.4, 143.8, 143.4, 142.2, 136.7, 136.2, 134.7, 134.0, 129.8, 127.6, 125.5, 113.9, 109.1, 107.0, 102.3, 55.7, 49.2, 20.9, 11.4, 3.1.

MS (ESI) m/z : 463.33 $[M + H]^+$; HPLC t_{ret} = 21.8 min (Gradient A).

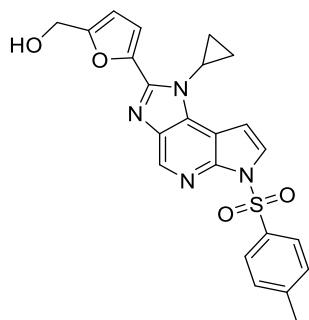
5-(1-(4,4-Difluorocyclohexyl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5e)



$C_{26}H_{24}F_2N_4O_4S$
exakte Masse: 526,149
 M_R : 526,559

Die Synthese von **5e** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 2,4 g **4e**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 2,05 g (68 %) **5e** als braunen Schaum. 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.77 (s, 1H), 8.10 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 7.06 (bs, 1H), 6.59 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 5.18 – 5.04 (m, 1H), 4.55 (s, 2H), 2.52 – 2.49 (m, 1H), 2.46 – 2.39 (m, J = 11.2 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.25 – 2.19 (m, J = 4.6 Hz, 3H), 2.10 – 2.04 (m, 4H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.0, 145.5, 144.2, 142.5, 142.1, 137.3, 136.7, 134.6, 132.6, 129.8, 127.7, 125.6, 123.6, 114.6, 108.9, 107.2, 103.8, 55.7, 53.5, 31.6, 26.2, 21.0. MS (ESI) m/z :

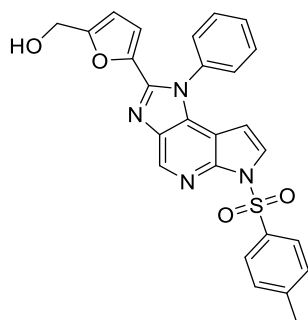
527.47 $[M + H]^+$; HPLC t_{ret} = 22.9 min (Gradient A).

(5-(1-Cyclopropyl-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5f)

C₂₃H₂₀N₄O₄S
exakte Masse: 448,121
M_R: 448,497

Die Synthese von **5f** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 1,45 g **4f**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 1,11 g (54 %) **5f** als braunen Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.66 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.41 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.84 – 3.77 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 1.43 – 1.39 (m, *J* = 6.7 Hz, 2H), 0.93 – 0.89 (m, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.8, 145.3, 145.0, 142.8, 142.2, 136.6, 135.7, 135.0, 134.7, 129.6, 127.5, 124.9, 114.5, 108.7, 107.6, 103.7, 55.8,

26.9, 21.0, 9.9. MS (ESI) *m/z*: 449.47 [*M* + *H*]⁺; HPLC *t*_{ret} = 16.7 min (Gradient A).

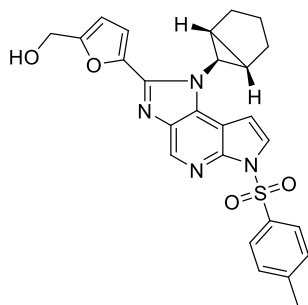
(5-(1-phenyl-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5g)

C₂₆H₂₀N₄O₄S
exakte Masse: 484,121
M_R: 484,530

Die Synthese von **5g** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 4,35 g **4g**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 3,38 g (61 %) **5g** als braunen Feststoff. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.82 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.63 – 7.52 (m, 3H), 7.45 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.41 – 7.33 (m, 2H), 7.21 – 7.13 (m, 2H), 6.14 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.53 (s, 2H), 3.22 (s, 1H), 2.21 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.0, 145.3, 144.1, 143.5, 143.1, 137.9, 136.3, 136.2, 135.4, 135.3, 130.6, 130.3, 129.7, 128.2, 128.1, 125.1, 113.7, 109.2, 107.6, 101.3, 57.3, 21.7. MS

(ESI) *m/z*: 485.40 [*M* + *H*]⁺; HPLC *t*_{ret} = 16.6 min (Gradient A).

(5-(1-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)methanol (5h)

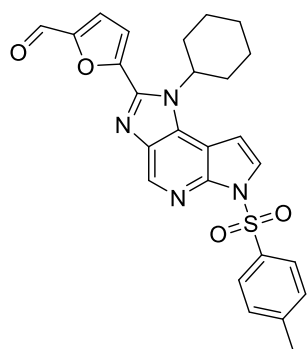


$C_{26}H_{24}N_4O_4S$
exakte Masse: 488,152
 M_R : 488,562

Die Synthese von **5h** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **D** aus 3,3 g **4h**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 2,3 g (54 %) **5h** als braunen Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.75 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 2.86 – 2.81 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.15 – 2.12 (m, $J = 3.5$ Hz, 1H), 1.97 (dd, $J = 12.8, 8.0$ Hz, 2H), 1.78 (ddd, $J = 21.1, 10.0$ Hz, 2H), 1.64 – 1.57 (m, 1H), 1.53 (bs, 2H), 1.09 – 0.95 (m, $J = 11.8, 8.6$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 157.2, 145.6, 145.2, 143.6,

143.0, 137.6, 135.9, 135.6, 135.0, 129.6, 128.2, 124.9, 114.3, 109.6, 108.0, 102.9, 57.2, 34.1, 28.8, 27.7, 21.6, 21.23. MS (ESI) m/z : 489.36 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 20.1$ min (Gradient B)

5-(1-Cyclohexyl-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (6a)

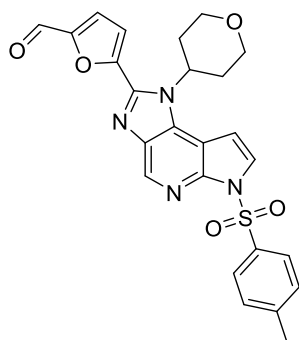


$C_{26}H_{24}N_4O_4S$
exakte Masse: 488,152
 M_R : 488,562

Die Synthese von **6a** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 5,2 g **5a**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 3,73 g (72 %) **6a** als braunen Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.74 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 7.39 – 7.32 (m, $J = 8.7$ Hz, 3H), 7.11 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 5.01 – 4.88 (m, $J = 12.0$ Hz, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.24 – 2.18 (m, $J = 11.4$ Hz, 2H), 2.00 – 1.90 (m, 4H), 1.79 – 1.73 (m, $J = 7.8$ Hz, 1H), 1.58 – 1.44 (m, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.0, 152.7, 148.3, 145.2, 142.3, 142.2, 137.7, 136.7, 134.6, 133.1, 129.6, 127.7, 125.1, 123.1, 115.3, 107.2, 104.5, 57.0, 30.3, 25.1, 24.2, 21.0. MS (ESI) m/z :

489.09 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 20.5$ min (Gradient A).

5-(1-(Tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**6b**)

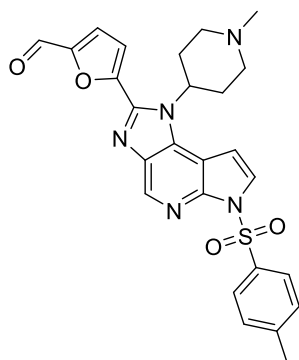


C₂₅H₂₂N₄O₅S
exakte Masse: 490,131
M_R: 490,534

Die Synthese von **6b** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 2,02 g **5b**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 1,9 g (90 %) **6b** als orangen Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.76 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 5.31 – 5.20 (m, 1H), 4.11 (dd, *J* = 11.4, 4.6 Hz, 2H), 3.61 – 3.53 (m, *J* = 11.2 Hz, 2H), 2.47 – 2.39 (m, *J* = 11.6, 7.3 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.98 (dd, *J* = 12.6, 4.4 Hz, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.8, 152.9, 145.6, 142.7, 138.0, 136.9, 134.4, 131.1, 130.3, 129.9, 127.8, 126.3, 125.8, 120.4, 115.7, 107.4, 105.0, 66.3, 53.2,

30.2, 21.0. MS (ESI) *m/z*: 491.4 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 17.2 min (Gradient A).

5-(1-(1-Methylpiperidin-4-yl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**6c**)

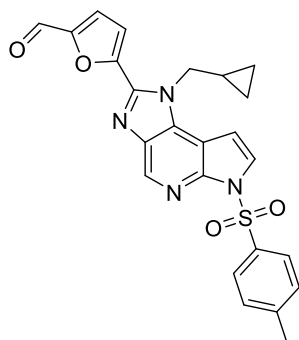


C₂₆H₂₅N₅O₄S
exakte Masse: 503,163
M_R: 503,577

Die Synthese von **6c** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 1,34 g **5c**. Aufreinigung per Säulenchromatographie (EtOAc → EtOAc/MeOH 9:1). Man erhält 935 mg (70 %) **6c** als gelbes Pulver. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.76 – 9.74 (m, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.05 – 4.94 (m, 1H), 3.05 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.50 (dd, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 4H), 2.33 (s, 6H), 2.04 – 1.94 (m, *J* = 10.4 Hz, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.9, 152.9, 148.1, 145.7, 142.8, 142.2, 138.0, 137.0, 134.6, 132.8, 130.0, 127.8, 125.8, 123.3, 115.7, 107.5, 105.4, 69.8, 54.3, 45.7, 29.3, 21.1. MS (ESI) *m/z*: 504.6 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} =

15.0 min (Gradient A).

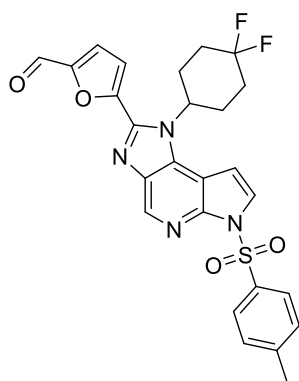
5-(1-(Cyclopropylmethyl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**6d**)



C₂₄H₂₀N₄O₄S
exakte Masse: 460,121
M_R: 460,508

Die Synthese von **6d** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 5,18 g **5d**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 4,33 g (80 %) **6d** als gelben Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.71 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.39 (s, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.43 – 1.31 (m, 1H), 0.59 – 0.40 (m, 4H). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 177.0, 152.9, 149.9, 145.3, 143.3, 142.2, 138.5, 136.9, 135.4, 134.8, 129.7, 128.3, 125.5, 122.43, 114.7, 107.4, 101.4, 50.5, 30.9, 21.6, 11.7, 3.8. MS (ESI) *m/z*: 461.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 22.7 min (Gradient A).

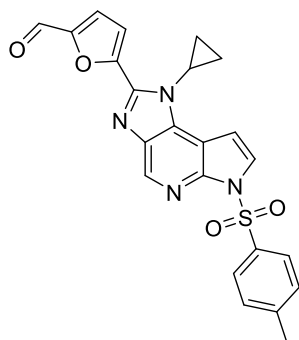
5-(1-(4,4-Difluorocyclohexyl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**6e**)



C₂₆H₂₂F₂N₄O₄S
exakte Masse: 524,133
M_R: 524,543

Die Synthese von **6e** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 2,04 g **5e**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 1,84 g (90 %) **6e** als braunen Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.77 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.03 (d, 2H), 7.75 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.07 (s, 1H), 5.22 – 5.12 (m, *J* = 14.3, 10.0 Hz, 1H), 2.47 – 2.36 (m, *J* = 11.0 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.29 – 2.10 (m, 6H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 179.1, 153.1, 148.0, 145.8, 143.0, 142.4, 138.2, 137.0, 134.7, 130.1, 127.9, 126.1, 122.8, 115.9, 107.5, 104.1, 54.0, 32.1, 31.8, 30.8, 26.5, 21.2. MS (ESI) *m/z*: 525.40 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 20.0 min (Gradient A).

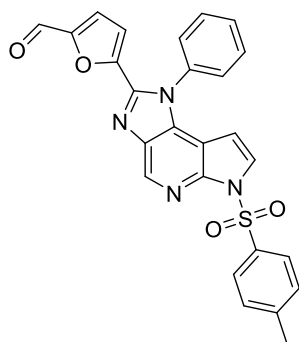
5-(1-Cyclopropyl-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (6f)



C₂₃H₁₈N₄O₄S
exakte Masse: 446,105
M_R: 446,481

Die Synthese von **6f** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 1,02 g **5f**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 800 mg (79 %) **6f** als braunen Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.76 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.05 – 8.02 (m, 2H), 7.99 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.96 – 3.89 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.46 – 1.40 (m, 2H), 0.99 – 0.94 (m, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.9, 152.6, 148.0, 145.6, 144.0, 142.5, 140.5, 137.6, 135.9, 135.5, 134.7, 130.0, 127.7, 125.5, 115.7, 107.8, 104.2, 30.7, 21.1, 9.9. MS (ESI) *m/z*: 447.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 17.1 min (Gradient A).

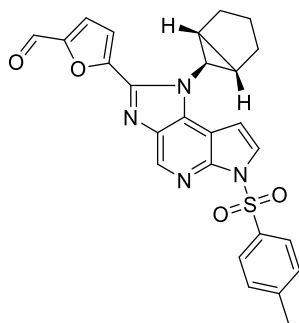
5-(1-Phenyl-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (6g)



C₂₆H₁₈N₄O₄S
exakte Masse: 482,105
M_R: 482,514

Die Synthese von **6g** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 1,75 g **5g**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 1,35 g (78 %) **6g** als braunen Feststoff. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.56 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.00 (d, 2H), 7.62 (m, *J* = 9.0, 3.8, 2.1 Hz, 3H), 7.51 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 2H), 7.22 – 7.17 (m, 2H), 7.08 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.78 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 2.28 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 177.9, 152.8, 147.7, 145.0, 143.3, 142.1, 138.2, 136.0, 135.6, 135.1, 135.0, 130.4, 130.0, 129.3, 127.9, 127.5, 125.0, 118.9, 113.9, 107.2, 100.9, 21.3. MS (ESI) *m/z*: 483.40 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 8.5 min (Gradient A).

5-(1-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-6-tosyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (6h)

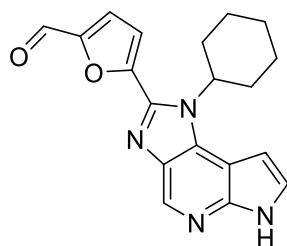


$C_{26}H_{22}N_4O_4S$
exakte Masse: 486,136
 M_R : 486,546

Die Synthese von **6h** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **E** aus 1,35 g **5h**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 1,3 g (96 %) **6h** als Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.80 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.11 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.29 – 7.25 (m, J = 8.2 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 3.55 – 3.50 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.31 (dd, J = 12.8, 8.1 Hz, 2H), 1.94 (ddd, J = 21.2, 10.2 Hz, 2H), 1.88 – 1.81 (m, J = 13.1, 8.5 Hz, 1H), 1.77 (bs, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 1H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.5, 153.5, 149.6, 145.3, 143.9, 143.4, 138.6, 136.4, 135.6,

135.5, 129.7, 128.3, 125.3, 122.0, 114.8, 108.2, 103.1, 34.6, 29.1, 27.7, 21.7, 21.5. MS (ESI) m/z : 487.33 $[M + H]^+$; HPLC t_{ret} = 22.5 min (Gradient B).

5-(1-Cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (7a)

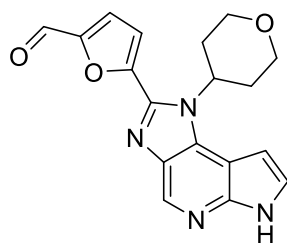


$C_{19}H_{18}N_4O_2$
exakte Masse: 334,143
 M_R : 334,379

Die Synthese von **7a** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 3,63 g **6a**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 988 mg (40 %) **7a** als orangefarbenen Feststoff. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.12 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.76 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.58 – 7.55 (m, 1H), 7.38 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.86 – 6.80 (m, J = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 4.95 (dt, J = 16.5, 8.4, 4.2 Hz, 1H), 2.42 – 2.27 (m, 2H), 2.03 – 1.84 (m, 4H), 1.80 – 1.65 (m, J = 22.2 Hz, 1H), 1.59 – 1.42 (m, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.4, 152.5, 149.1, 144.7, 140.4, 136.3, 134.8, 133.0, 124.1, 123.7, 114.6,

104.0, 99.8, 56.6, 30.2, 25.2, 24.3. MS (ESI) m/z : 335.42 $[M + H]^+$; HPLC t_{ret} = 14.9 min (Gradient A).

5-(1-(Tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (7b)

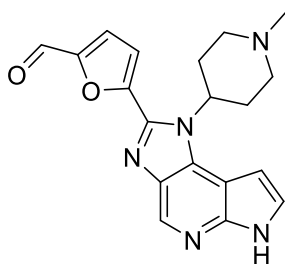


$C_{18}H_{16}N_4O_3$
exakte Masse: 336,122
 M_R : 336,351

Die Synthese von **7b** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 1,75 g **6b**. Es ist keine weitere Aufreinigung nach Extraktion mit Wasser/EtOAc nötig. Man erhält 1,04 g (83 %) **7b** als orangefarbenen Feststoff. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.92 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.57 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 5.12 – 4.95 (m, 1H), 4.05 – 3.90 (m, 2H), 3.88 – 3.79 (m, 1H), 2.53 – 2.37 (m, 1H), 2.37 – 2.29 (m, 1H), 1.85 – 1.72 (m, J = 9.1 Hz, 2H), 1.04 – 0.95 (m, 1H). ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ 178.8, 152.7, 148.9, 144.8, 140.6, 136.5, 135.0, 132.8, 124.5, 123.6, 115.0,

104.3, 100.4, 66.5, 53.0, 30.2. MS (ESI) m/z : 337.4 $[M + H]^+$; HPLC t_{ret} = 12.6 min (Gradient A).

5-(1-(1-Methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**7c**)

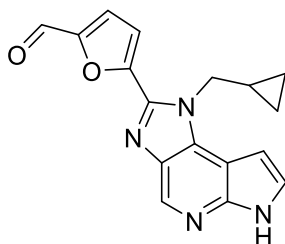


C₁₉H₁₉N₅O₂
exakte Masse: 349,154
M_R: 349,394

Die Synthese von **7c** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 890 mg **6c**. Es ist keine weitere Aufreinigung nach Extraktion mit Wasser/EtOAc nötig. Man erhält 395 mg (64 %) **7c** als gelbes Pulver. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.07 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.63 – 7.55 (m, 1H), 7.40 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 5.04 – 4.92 (m, 1H), 3.03 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H), 2.75 – 2.64 (m, 2H), 2.58 – 2.47 (m, 4H), 2.31 – 2.28 (m, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.4, 152.4, 148.8, 144.5, 140.4, 136.1, 134.8, 132.5, 124.0, 123.4, 114.6, 104.2, 100.4, 54.5, 53.7, 45.9, 29.2. MS (ESI) *m/z*: 350.64 [M + H]⁺; HPLC

*t*_{ret} = 12.7 min (Gradient A).

5-(1-(Cyclopropylmethyl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**7d**)

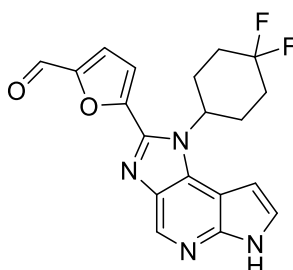


C₁₇H₁₄N₄O₂
exakte Masse: 306,112
M_R: 306,325

Die Synthese von **7d** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 3,3 g **6d**. Nach Detektion von Umwandlung des Produkts zu Nebenprodukten durch DC und MS wird die Reaktion gequencht und der Ansatz per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 618 mg (28 %) **7d** als orangefarbenen Farbstoff. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.85 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.39 – 7.35 (m, 2H), 6.75 – 6.71 (m, *J* = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.50 – 1.39 (m, 1H), 0.51 – 0.43 (m, 4H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.1, 152.1, 149.7, 144.8,

139.8, 135.7, 134.2, 134.2, 123.7, 123.0, 113.3, 103.6, 96.4, 49.6, 11.3, 3.1. MS (ESI) *m/z*: 307.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 15.1 min (Gradient A).

5-(1-(4,4-Difluorocyclohexyl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**7e**)

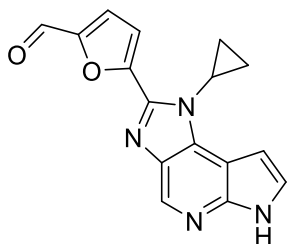


C₁₉H₁₆F₂N₄O₂
exakte Masse: 370,124
M_R: 370,360

Die Synthese von **7e** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 300 mg **6e**. Es ist keine weitere Aufreinigung nach Extraktion mit Wasser/EtOAc nötig. Man erhält 187 mg (88 %) **7e** als orangefarbenen Feststoff. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.16 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.64 – 7.57 (m, 2H), 7.42 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.23 – 5.12 (m, 1H), 2.31 – 2.24 (m, *J* = 13.3 Hz, 4H), 2.18 – 2.09 (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.8, 152.7, 152.3, 148.6, 144.7, 140.8, 136.3, 136.1, 134.9, 132.7, 124.5, 122.9, 114.9, 104.2, 99.2, 53.5, 32.0, 31.8, 31.5, 26.3, 26.2. MS (ESI) *m/z*: 371.46 [M + H]⁺; HPLC

*t*_{ret} = 19.7 min (Gradient A).

5-(1-Cyclopropyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**7f**)

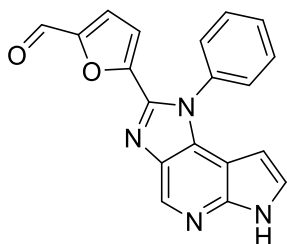


$C_{16}H_{12}N_4O_2$
exakte Masse: 292,096
 M_R : 292,298

Die Synthese von **7f** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 700 mg **6f**. Aufreinigung per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 133 mg (30 %) **7f** als orangefarbenen Feststoff. 1H -NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.91 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 4.7, 3.8$ Hz, 1H), 7.53 – 7.41 (m, $J = 5.9, 3.9$ Hz, 2H), 6.91 – 6.83 (m, 1H), 3.90 (dt, $J = 7.3, 3.8$ Hz, 1H), 1.51 – 1.36 (m, 2H), 1.04 – 0.94 (m, $J = 7.5$ Hz, 2H). ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ 178.1, 152.3, 148.9, 144.9, 141.7, 135.9, 135.2, 133.7, 123.7, 123.3, 114.3, 104.4, 98.6, 30.5, 9.9. MS (ESI) m/z : 293.46 [$M + H$] $^+$; HPLC $t_{ret} =$

11.8 min (Gradient A).

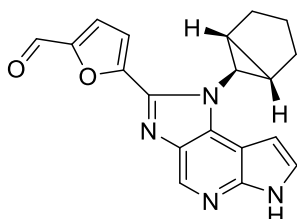
5-(1-Phenyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**7g**)



$C_{19}H_{12}N_4O_2$
exakte Masse: 328,096
 M_R : 328,331

Die Synthese von **7g** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 1,1 g **6g**. Nach Extraktion und Trocknung ist keine weitere Aufreinigung nötig. Man erhält 310 mg (41 %) **7g** als gelben Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.05 – 12.02 (m, 1H), 9.63 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.78 – 7.75 (m, $J = 6.1, 2.2$ Hz, 4H), 7.57 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.37 – 7.34 (m, 2H), 6.45 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 5.66 – 5.63 (m, 1H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.3, 152.1, 148.4, 145.3, 140.3, 136.1, 135.9, 135.1, 133.9, 130.3, 130.1, 128.0, 124.3, 123.5, 113.3, 103.9, 96.2. MS (ESI) m/z : 329.53 [$M + H$] $^+$; HPLC $t_{ret} = 15.2$ min (Gradient A).

5-(1-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-carbaldehyd (**7h**)

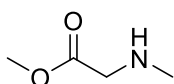


$C_{19}H_{16}N_4O_2$
exakte Masse: 332,127
 M_R : 332,363

Die Synthese von **7h** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **F** aus 650 mg **6h**. Nach Extraktion und Trocknung ist keine weitere Aufreinigung nötig. Man erhält 343 mg (77 %) **7h** als gelben Feststoff.

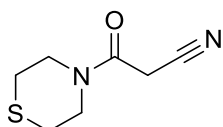
1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.73 (bs, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.41 – 7.31 (m, 2H), 6.89 – 6.82 (m, 2H), 3.36 – 3.33 (m, 1H), 2.56 (s, 1H), 2.24 (dd, $J = 12.2, 8.2$ Hz, 2H), 1.91 – 1.85 (m, $J = 9.7$ Hz, 2H), 1.80 – 1.75 (m, 2H), 1.16 – 1.10 (m, 1H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177.5, 153.2, 150.2, 145.3, 142.6, 136.3, 136.0, 134.6, 123.7, 122.0, 114.0, 105.4, 99.2, 34.6, 29.0, 27.8, 21.5. MS (ESI)

m/z : 333.43 [$M + H$] $^+$; HPLC $t_{ret} = 19.5$ min (Gradient A).

Sarkosinmethylester

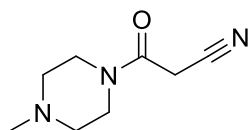
C₄H₉NO₂
 exakte Masse: 103,063
 M_R: 103,121

In einem im Eisbad gekühlten Rundkolben werden 25 g Sarkosin (281 mmol) in 350 ml MeOH gelöst und 21,4 ml SOCl₂ (295 mmol, 1,05 Äq.) werden tropfenweise zugefügt. Nach vollständiger Zugabe wird für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das Eisbad entfernt und für 3 h zum Reflux erhitzt. Dann wird der Ansatz (im Abzug) aufkonzentriert und das Rohprodukt eine geringe Menge MeOH und ein größeres Volumen an Ether zugegeben. Die Mischung wird für 10 min kräftig gerührt und über Nacht zur Kristallisation stehen gelassen. Man erhält 33,5 g (86 %) Sarkosinmethylester als Feststoff. ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 4.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.09 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.86 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.1, 53.4, 48.7, 33.6. MS (ESI) *m/z*: 104.16 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 0.5 min (Gradient B)

3-oxo-3-thiomorpholinopropannitril (53)

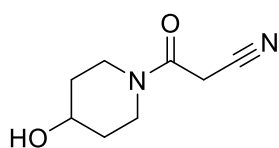
C₇H₁₀N₂OS
 exakte Masse: 170,051
 M_R: 170,230

2,0 ml Thiomorpholin (19,4 mmol, 1,0 Äq.), 2,07 ml Ethylcyanoacetat (19,4 mmol, 1,0 Äq.) und 13 mg Natriumethoxid (0,194 mmol, 0,01 Äq.) werden in einem Rundkolben in 6 ml EtOH gelöst und über Nacht bei 65 °C gerührt. Flüchtige Bestandteile werden einrotiert und die Rückstände per Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient). Man erhält 1,84 g (56 %) **53** als beigen Feststoff. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.03 (s, 2H), 3.76 – 3.68 (m, 2H), 3.62 – 3.55 (m, 2H), 2.68 – 2.60 (m, 2H), 2.60 – 2.53 (m, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 161.5, 115.9, 48.1, 44.3, 24.9. MS (ESI) *m/z*: 168.93 [M – H]⁻; HPLC *t*_{ret} = 13.1 min (Gradient B).

3-(4-Methylpiperazin-1-yl)-3-oxopropannitril (54)

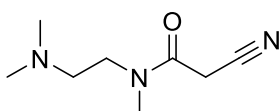
C₈H₁₃N₃O
 exakte Masse: 167,106
 M_R: 167,212

In einem auf Eis gekühlten Rundkolben werden 2,21 ml N-Methylpiperazin (20,0 mmol, 1,0 Äq.) und 1,78 ml Methylcyanoacetat (20,0 mmol, 1,0 Äq.) über Nacht gerührt und dürfen dabei RT annehmen. Flüchtige Reste werden anschließend einrotiert, das Rohprodukt in Ether suspendiert und mit einem Glasstab verrieben. Nach dreimaligem dekantieren mit Ether wird der verbliebene Feststoff filtriert und im Vakuum getrocknet. Man erhält 2,36 g (71 %) **54** als braunen Feststoff. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.01 (s, 2H), 3.44 (t, 2H), 3.32 (t, 2H), 2.31 (t, 2H), 2.25 (t, 2H), 2.18 (s, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 161.3, 116.0, 54.3, 53.9, 45.4, 45.2, 41.5, 24.6. MS (ESI) *m/z*: 168.27 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 0.5 min (Gradient B)

3-(4-Hydroxypiperidin-1-yl)-3-oxopropannitril (55)

C₈H₁₂N₂O₂
 exakte Masse: 168,090
 M_R: 168,196

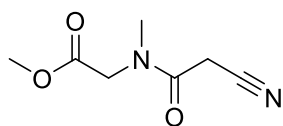
1,58 g 4-Hydroxypiperidin (15,68 mmol, 1,0 Äq.), 1,67 ml Ethylcyanoacetat (15,68 mmol, 1,0 Äq.) und 11 mg Natriummethoxid (0,157 mmol, 0,01 Äq.) werden in einem Rundkolben in 6 ml EtOH gelöst und über ein Wochenende bei RT gerührt, bis DC- und MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung der Edukte anzeigen. Die Mischung wird auf Kieselgel gezogen und per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 800 mg (30 %) **55** als rötliches Öl. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 4.74 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.90 – 3.77 (m, 1H), 3.76 – 3.64 (m, 1H), 3.57 – 3.45 (m, *J* = 12.8, 4.5 Hz, 1H), 3.20 – 2.97 (m, *J* = 16.4, 11.2, 3.3 Hz, 2H), 1.81 – 1.61 (m, 2H), 1.49 – 1.19 (m, *J* = 17.2, 8.9, 3.9 Hz, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.1, 116.3, 65.6, 43.4, 34.0, 24.8. MS (ESI) *m/z*: 169.20 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 1.2 min (Gradient B).

2-Cyano-N-(2-(dimethylamino)ethyl)-N-methylacetamid (56)

C₈H₁₅N₃O
 exakte Masse: 169,122
 M_R: 169,228

180 mg Methylcyanoacetat (1,82 mmol, 1 Äq.) und 236 µl N,N,N'-Trimethylethan-1,2-diamin (1,82 mmol, 1 Äq.) werden über Nacht bei RT gerührt. Das braune Gemisch wird in Ether und H₂O aufgenommen, in einen Scheidetrichter überführt und die Wasserphase zweimal mit Ether gewaschen. Die organische Phase wird verworfen und die Wasserphase einrotiert. Man erhält 245 mg (80 %) **56** als Feststoff. ¹H-NMRn (400 MHz, DMSO) δ 3.99 (s, 2H), 3.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.55 – 2.37 (m, 2H), 2.21 (s, 6H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.7, 116.2, 56.1, 45.5, 45.3, 35.4, 25.0. MS (ESI) *m/z*: 170.2 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 7,8 min (Gradient

B)

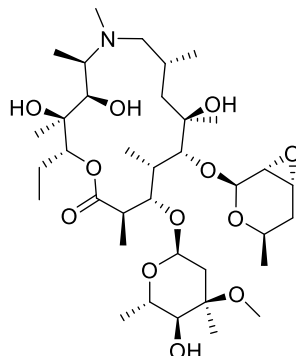
Methyl-N-(2-cyanoacetyl)-N-methylglycinat (57)

$C_7H_{10}N_2O_3$
exakte Masse: 170,069
 M_R : 170,168

In einem Rundkolben werden 8,25 g Cyanessigsäure (97 mmol, 1,0 Äq.) mit 250 ml DCM versetzt. Der Kolben wird mit einem Septum mit Blasenähler versehen, mit Argon geflutet und in ein Eisbad gegeben. Über eine Spritze werden 3 ml DMF durch das Septum zugegeben und anschließend portionsweise 8,7 ml Oxalylchlorid (101,9 mmol, 1,05 Äq.) zugespritzt. Die Umsetzung zum Säurechlorid wird durch Gasbildung angezeigt. Die Mischung wird für 40 min auf Eis gerührt, dann wird das Eisbad entfernt und 10 g Sarkosinmethylester (97 mmol, 1,0 Äq.) zugeführt. Anschließend werden 27 ml Et_3N langsam zugegeben und die Mischung über Nacht gerührt.

Nach Zugabe von H_2O und ges. $NaHCO_3$ werden die beiden Phasen in einen Scheidetrichter überführt und man extrahiert zweimal mit DCM. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird mit Flash-Chromatographie gereinigt (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient). Man erhält 12,5 g (75 %) **57** als bräunliches Öl. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 4.10 (d, $J = 2.6$ Hz, 4H), 3.66 (s, 3H), 3.00 (s, 3H). ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ 169.3, 163.9, 115.8, 51.8, 49.2, 36.3, 24.7. MS (ESI) m/z: 171.13 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 1.3$ min (Gradient B)

(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-(((1R,2S,4R,6R)-4-methyl-3,7-dioxabicyclo[4.1.0]heptan-2-yl)oxy)-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-on (58)

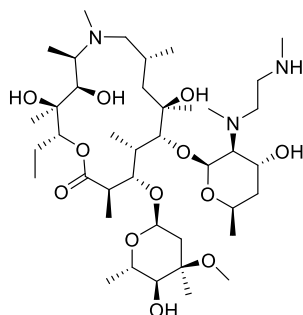


$C_{36}H_{65}NO_{12}$
exakte Masse: 703,451
 M_R : 703,911

5 g Azithromycin (6,67 mmol) werden in 50 ml *n*-BuOH gelöst und im Ölbad auf 85-90 °C erhitzt. 15 ml Glycidol (226 mmol, 33 Äq.) werden 1:1 mit *n*-BuOH verdünnt und über 1 h über einen Tropftrichter dem Ansatz zugeführt. Es wird für 1 h bei Hitze °C weitergerührt, bis MS-Kontrollen keine weitere Umsetzung des Azithromycin anzeigen. Die Lösung wird fast bis zur Trockne aufkonzentriert und mit 1 l H₂O versetzt. Die Suspension wird bei RT über Nacht gerührt und anschließend der Niederschlag filtriert. Nach Umkristallisieren des Niederschlags in MeOH erhält man 1,33 g (28 %) **58** als farblose bis weiße Kristalle bzw. Plättchen. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.08 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.68 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.03 (dq, *J* = 12.4, 6.1

Hz, 1H), 3.67 – 3.61 (m, 2H), 3.50 – 3.44 (m, *J* = 15.8 Hz, 2H), 3.42 – 3.38 (m, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.33 – 3.30 (m, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.19 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 3.00 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H), 2.95 – 2.90 (m, 1H), 2.81 – 2.66 (m, 2H), 2.54 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 2.37 (s, 1H), 2.34 – 2.30 (m, *J* = 5.2 Hz, 3H), 2.20 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 2.04 – 1.95 (m, *J* = 14.1 Hz, 3H), 1.93 – 1.84 (m, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 1H), 1.74 – 1.61 (m, *J* = 29.9, 14.7 Hz, 2H), 1.56 (dd, *J* = 15.2, 4.7 Hz, 1H), 1.51 – 1.41 (m, 1H), 1.35 – 1.27 (m, *J* = 11.5, 5.1 Hz, 7H), 1.24 – 1.18 (m, 7H), 1.14 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 1.11 – 1.06 (m, *J* = 8.9 Hz, 6H), 0.98 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.94 – 0.86 (m, *J* = 15.9, 7.0 Hz, 6H). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 178.2, 97.8, 94.7, 85.9, 77.8, 76.8, 76.5, 73.9, 73.5, 73.0, 72.5, 69.8, 65.2, 62.2, 61.6, 53.8, 51.5, 49.0, 44.9, 41.6, 41.4, 36.0, 34.4, 32.3, 27.0, 26.4, 21.6, 21.3, 21.0, 20.6, 18.0, 16.0, 14.5, 11.0, 8.9, 6.9. MS (ESI) *m/z*: 704,60 [*M* + H]⁺; HPLC *t*^{ret} = 14.1 min (Gradient A).

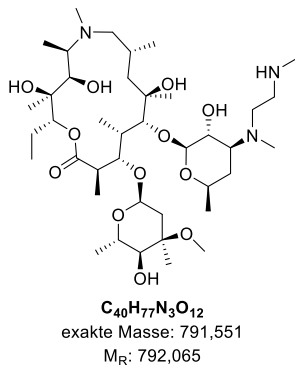
(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-11-(((2S,3S,4R,6R)-4-hydroxy-6-methyl-3-(methyl(2-(methylamino)ethyl)amino)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-on (59a)



$C_{40}H_{77}N_3O_{12}$
exakte Masse: 791,551
 M_R : 792,065

6,0 g **58** (8,52 mmol) werden in einem Rundkolben in 10 ml N,N' -Dimethylethylendiamin gelöst und bei 60 °C Ölbadtemperatur gerührt. Nach zwei Tagen zeigen MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung des Edukts **58** an. Das Rohprodukt wird auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc → EtOAc/MeOH 2:1). Man erhält 4,47 g (66 %) **59a** als weißen Feststoff sowie 1,25 g des 3'-substituierten Isomers. 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.51 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.86 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.75 (dd, J = 10.1, 2.4 Hz, 1H), 4.31 – 4.28 (m, J = 2.3 Hz, 1H), 4.12 – 4.04 (m, 2H), 4.02 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 3.86 – 3.83 (m, 3H), 3.53 (d, 2H), 3.43 (s, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.16 (s, 1H), 3.07 – 2.99 (m, 1H), 2.84 – 2.76 (m, J = 13.1, 5.9 Hz, 1H), 2.74 – 2.69 (m, J = 5.7 Hz, 2H), 2.66 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.36 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 2.27 (s, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.11 – 2.06 (m, J = 6.9, 4.7 Hz, 1H), 1.98 (s, 1H), 1.93 – 1.74 (m, 3H), 1.66 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 1.54 – 1.45 (m, 3H), 1.44 – 1.25 (m, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.17 (s, 2H), 1.15 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 1.11 (s, 3H), 1.09 – 1.05 (m, 5H), 1.00 (s, 3H), 0.96 – 0.92 (m, J = 6.9, 3.2 Hz, 4H), 0.88 – 0.82 (m, 6H), 0.81 – 0.76 (m, J = 7.3 Hz, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.11, 99.7, 94.6, 83.4, 77.4, 77.0, 76.3, 74.9, 73.6, 72.6, 72.3, 69.0, 68.7, 65.6, 64.8, 63.2, 61.5, 59.6, 53.9, 48.6, 47.6, 45.7, 44.9, 41.6, 36.8, 35.6, 34.0, 27.6, 26.0, 22.0, 21.6, 20.9, 20.6, 18.3, 17.6, 14.8, 14.0, 10.8, 8.7, 6.6. MS (ESI) m/z : 859,73 $[M + H]^+$; HPLC t_{ret} = 13,7 min (Gradient A)

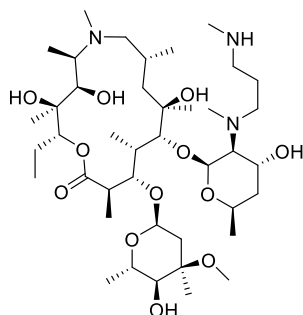
(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-11-(((2S,3R,4S,6R)-3-hydroxy-6-methyl-4-(methyl(2-(methylamino)ethyl)amino)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-on (59d)



59d wird im Zuge der Synthese von **59a** als weiteres Produkt erhalten und durch Säulenchromatographie isoliert. Man erhält 1,25 g (19 %) **59d** als weißen Feststoff. 1H -NMR: (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.99 (s, 1H), 5.08 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 4.62 (dd, $J = 9.7, 1.8$ Hz, 1H), 4.33 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.22 – 4.18 (m, 1H), 4.02 (dt, $J = 15.2, 6.1$ Hz, 2H), 3.96 – 3.91 (m, 1H), 3.59 (s, 1H), 3.54 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.47 – 3.38 (m, 2H), 3.27 (s, 3H), 3.20 (dd, $J = 9.9, 7.5$ Hz, 1H), 2.96 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 2.91 (s, 1H), 2.81 (s, 1H), 2.76 – 2.60 (m, 6H), 2.51 – 2.44 (m, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.37 – 2.36 (m, $J = 0.9$ Hz, 1H), 2.29 – 2.27 (m, 1H), 2.25 – 2.22 (m, $J = 2.3$ Hz, 5H), 2.01 –

1.88 (m, 3H), 1.86 (s, 1H), 1.85 – 1.80 (m, 1H), 1.70 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 1.64 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.50 (dd, $J = 15.2, 4.8$ Hz, 1H), 1.43 – 1.34 (m, $J = 20.0, 14.4, 6.4$ Hz, 2H), 1.26 – 1.22 (m, 6H), 1.17 (s, 3H), 1.13 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.01 – 1.00 (m, 1H), 0.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.86 – 0.79 (m, $J = 14.8, 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, DMSO) δ 177.1, 102.4, 94.6, 82.9, 77.5, 76.4, 75.0, 73.7, 72.8, 72.7, 70.5, 68.8, 67.1, 64.8, 64.5, 61.5, 52.7, 51.7, 48.8, 48.5, 48.2, 44.7, 42.0, 41.7, 40.4, 36.6, 35.8, 35.0, 30.8, 29.1, 27.4, 26.1, 22.1, 21.4, 21.0, 18.4, 17.7, 14.8, 10.9, 9.1, 6.8. MS (ESI) m/z : 792.67 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 12.5$ min (Gradient A)

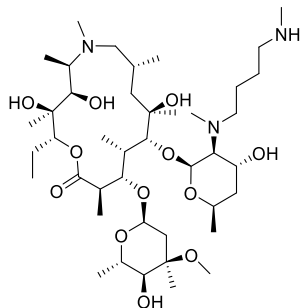
(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-11-(((2S,3S,4R,6R)-4-hydroxy-6-methyl-3-(methyl(3-(methylamino)propyl)amino)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-on (59b)



$C_{41}H_{79}N_3O_{12}$
exakte Masse: 805,566
 M_R : 806,092

In einem Schraubdeckelgefäß werden 519 mg **58** (0,74 mmol, 1,0 Äq.) in einem Überschuss an N,N'-Dimethyl-1,3-diaminopropan (ca. 0,5 ml) suspendiert und bei 105 °C unter kontinuierlichem Schütteln über Nacht inkubiert. Nach Kontrolle der vollständigen Umsetzung per DC und MS wird die Mischung in einen Rundkolben überführt, auf Kieselgel gezogen und per Flash-Chromatographie (Aceton/Methanol, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 270 mg (46 %) **59b** als farblosen Feststoff. 1H -NMR (600 MHz, DMSO) δ 4.89 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.86 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.75 (dd, J = 10.2, 2.7 Hz, 1H), 4.32 – 4.29 (m, J = 2.1 Hz, 1H), 4.09 (dq, J = 12.4, 6.1 Hz, 1H), 3.96 – 3.91 (m, J = 17.0, 7.6, 4.5 Hz, 1H), 3.77 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.51 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.43 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 2.89 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 2.84 – 2.75 (m, 1H), 2.68 – 2.64 (m, 2H), 2.61 (dt, J = 13.0, 6.6 Hz, 1H), 2.47 – 2.44 (m, J = 7.1 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.38 – 2.34 (m, 1H), 2.27 – 2.22 (m, J = 11.1 Hz, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.15 – 2.07 (m, 2H), 1.91 – 1.82 (m, 2H), 1.77 (ddd, J = 14.1, 7.5, 2.6 Hz, 1H), 1.72 – 1.68 (m, 1H), 1.52 – 1.46 (m, 4H), 1.45 – 1.41 (m, J = 13.6 Hz, 2H), 1.38 – 1.34 (m, 1H), 1.27 (dd, J = 14.2, 7.7 Hz, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.16 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.07 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.93 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.86 (d, J = 7.4 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.78 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ 177.1, 99.7, 94.5, 83.3, 77.4, 77.0, 76.3, 75.2, 73.6, 72.6, 72.3, 68.9, 68.8, 65.5, 64.9, 64.8, 63.0, 61.6, 58.5, 54.9, 49.9, 48.6, 44.9, 42.2, 41.8, 40.2, 36.9, 36.3, 35.6, 34.6, 27.9, 27.6, 26.0, 22.0, 21.8, 20.9, 18.4, 17.7, 15.1, 14.8, 10.9, 8.0, 6.6. MS (ESI) m/z: 806.73 [M + H]⁺; HPLC t_{ret} = 8.9 min (Gradient B).

(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-11-(((2S,3S,4R,6R)-4-hydroxy-6-methyl-3-(methyl(4-(methylamino)butyl)amino)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-on (59c)

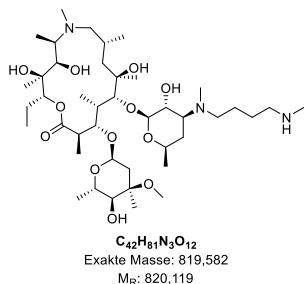


$C_{42}H_{81}N_3O_{12}$
Exakte Masse: 819,582
 M_R : 820,119

2,3 g **58** (3,27 mmol, 1,0 Äq.), 1,14 ml Et_3N (8,18 mmol, 2,5 Äq.) und 0,98 g N,N' -Dimethyl-1,4-diaminobutan (8,18 mmol, 2,5 Äq.) werden in 7 ml $PrOH$ gelöst und bei 90 °C über Nacht gerührt, bis DC- und MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung des Edukts **58** anzeigen. Das Rohprodukt wird aufkonzentriert, auf Kieselgel gezogen und per Flash-Chromatographie ($EtOAc/MeOH$, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 260 mg (10 %) **59c** als weißen Feststoff. 1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.38 (bs, 1H), 4.98 – 4.95 (m, 1H), 4.93 – 4.87 (m, 1H), 4.58 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 4.29 (bs, 1H), 4.09 – 3.99 (m, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.95 – 3.85

(m, 2H), 3.58 (s, 1H), 3.52 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.34 (td, $J = 10.1, 4.9$ Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 2.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 2.78 – 2.71 (m, 1H), 2.66 – 2.57 (m, $J = 4.4$ Hz, 3H), 2.56 – 2.53 (m, 1H), 2.51 – 2.47 (m, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.40 – 2.38 (m, $J = 3.4$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.25 – 2.22 (m, $J = 4.2$ Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.99 – 1.70 (m, 6H), 1.60 – 1.52 (m, $J = 10.8$ Hz, 1H), 1.47 – 1.33 (m, 7H), 1.26 – 1.19 (m, 7H), 1.10 – 1.05 (m, 11H), 0.98 (s, 6H), 0.87 – 0.81 (m, $J = 5.9$ Hz, 3H), 0.80 – 0.74 (m, $J = 5.1$ Hz, 6H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.1, 99.9, 94.4, 84.2, 73.8, 73.1, 72.3, 69.7, 69.6, 65.7, 65.3, 65.1, 63.3, 62.0, 56.9, 51.1, 48.8, 45.8, 45.1, 42.6, 41.8, 39.9, 36.7, 35.9, 35.2, 34.5, 27.3, 26.4, 26.3, 25.8, 25.0, 24.8, 21.7, 21.3, 21.1, 20.9, 17.9, 16.1, 14.6, 10.8, 8.8, 6.8. MS (ESI) m/z : 820.40 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 11-3$ min (Gradient B)

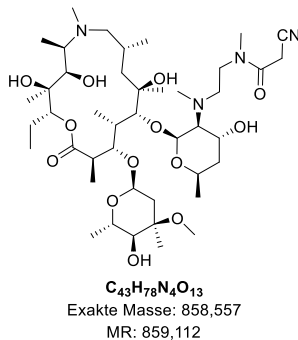
(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-11-(((2S,3R,4S,6R)-3-hydroxy-6-methyl-4-(methyl(4-(methylamino)butyl)amino)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-on (59e)



59e wird im Zuge der Synthese von **59c** als weiteres Produkt erhalten. Man erhält 640 mg (24 %) **59e** als weißen Feststoff. 1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.25 (bs, 1H), 5.02 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.60 – 4.54 (m, 1H), 4.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.24 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 4.03 (dd, $J = 9.0, 6.2$ Hz, 1H), 3.61 – 3.57 (m, $J = 10.1$ Hz, 2H), 3.49 – 3.37 (m, 2H), 3.29 (s, 3H), 3.19 (dd, $J = 9.9, 7.4$ Hz, 1H), 2.98 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 2.72 (dd, $J = 7.2, 4.7$ Hz, 1H), 2.65 – 2.60 (m, $J = 6.4$ Hz, 1H), 2.56 – 2.51 (m, 3H), 2.49 – 2.47 (m, 1H), 2.43 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H), 2.36 (s, 4H), 2.26 (s, 4H), 2.18 (s, 3H), 2.04 – 1.81 (m, 5H), 1.74 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 1.62 – 1.56 (m, $J = 12.3$

Hz, 1H), 1.52 – 1.39 (m, $J = 14.7$ Hz, 7H), 1.26 – 1.22 (m, $J = 5.0$ Hz, 7H), 1.20 – 1.12 (m, 11H), 1.04 – 0.98 (m, 9H), 0.87 – 0.81 (m, $J = 7.4$ Hz, 6H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.6, 103.1, 94.9, 83.9, 78.6, 78.3, 77.7, 77.4, 74.3, 73.5, 73.1, 70.8, 70.3, 68.8, 65.7, 65.5, 63.8, 62.2, 53.6, 51.6, 49.5, 45.2, 42.6, 41.9, 36.8, 36.5, 36.0, 35.0, 29.8, 27.6, 27.2, 26.8, 26.3, 22.1, 21.7, 21.4, 18.4, 16.5, 15.1, 11.3, 9.3, 7.5. MS (ESI) m/z : 820.40 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 10.1$ min (Gradient B)

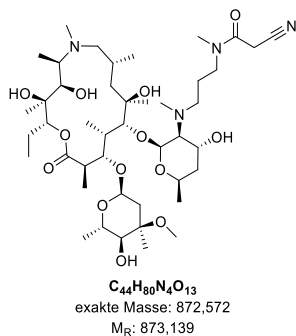
2-Cyano-N-(2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)ethyl)-N-methylacetamid (60a)



566 mg Cyanessigsäure (6,66 mmol, 1,1 Äq.) und 2,3 g HATU (6,06 mmol, 1,0 Äq.) werden in 35 ml trockenem THF und 1 ml Et₃N (7,27 mmol 1,2 Äq.) suspendiert und für 30 min bei RT gerührt. 4,8 g **59a** werden nun hinzugegeben und man rührt für zwei Tage bei RT, bis DC- und MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung von **59a** anzeigen. Man verdünnt mit EtOAc, überführt in einen Scheidetrichter und extrahiert dreimal mit 5 % Zitronensäure. Die vereinten Wasserphasen werden durch langsame Zugabe von K₂CO₃ alkalisiert und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, einrotiert und das

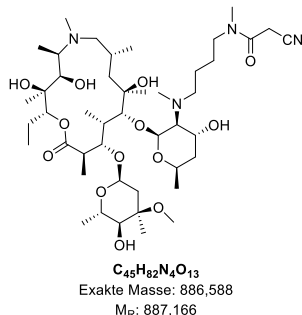
Rohprodukt per Säulenchromatographie (EtOAc → EtOAc/MeOH 8:1) aufgereinigt. Man erhält 3,35 g (64 %) **60a** als weißen Feststoff. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.56 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.74 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.65 (dd, *J* = 16.7, 2.4 Hz, 1H), 4.41 – 4.27 (m, 3H), 4.13 – 4.02 (m, 2H), 3.98 – 3.91 (m, 1H), 3.78 – 3.63 (m, 2H), 3.58 – 3.47 (m, *J* = 15.0, 11.1 Hz, 2H), 3.23 (s, 4H), 3.12 – 3.00 (m, *J* = 16.8, 9.9 Hz, 1H), 2.97 – 2.87 (m, 2H), 2.83 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 2.69 (s, 6H), 2.66 – 2.61 (m, 1H), 2.52 – 2.44 (m, 3H), 2.37 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 2.29 – 2.17 (m, 5H), 2.08 (s, 1H), 1.98 (s, 1H), 1.94 – 1.81 (m, 2H), 1.79 – 1.26 (m, 7H), 1.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 1.16 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.14 – 1.13 (m, 1H), 1.11 (s, 2H), 1.09 – 1.04 (m, 6H), 1.01 (s, 3H), 0.97 – 0.92 (m, *J* = 4.8 Hz, 4H), 0.87 – 0.82 (m, 4H), 0.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.2, 162.8, 116.1, 99.6, 94.6, 82.9, 77.4, 77.1, 76.3, 74.9, 73.6, 72.7, 72.3, 69.8, 68.7, 65.5, 64.8, 61.6, 59.8, 54.2, 53.7, 48.7, 45.0, 41.7, 41.4, 35.6, 34.6, 30.6, 27.6, 26.1, 24.9, 24.5, 22.1, 21.6, 21.0, 20.7, 18.4, 17.6, 14.8, 14.1, 10.9, 8.8, 6.7. ESI-HRMS: [M + H]⁺ berechnet für C₄₃H₇₈N₄O₁₃: 859.56382, gemessen 859.56332; HPLC *t*_{ret} = 14.7 min (Gradient A)

2-Cyano-N-(3-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)propyl)-N-methylacetamid (60b)



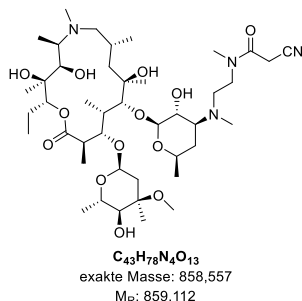
44 mg Cyanessigsäure (0,52 mmol, 1,1 Äq.), 197 mg HATU (0,52 mmol, 1,1 Äq.) und 72 μ l Et_3N (0,52 mmol, 1,1 Äq.) werden in einem Rundkolben in 5 ml trockenem THF für 1 h bei RT gerührt. Dann werden 380 mg **59b** (0,47 mmol, 1,0 Äq.) zugegeben und so lange gerührt, bis DC und MS die vollständige Umsetzung des Edukts **59b** anzeigen. Die Mischung wird mit ges- $NaHCO_3$ und DCM versetzt und in einen Scheidetrichter überführt. Es wird viermal mit DCM extrahiert, dann werden die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird per Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient). Man erhält 340 mg (83 %) **60b** als farblosen Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.09 – 5.00 (m, 1H), 4.68 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.41 (dd, J = 16.5, 7.2 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 13.8, 3.4 Hz, 1H), 4.06 (dt, J = 9.3, 5.8 Hz, 1H), 3.97 – 3.76 (m, 1H), 3.69 – 3.61 (m, J = 6.9 Hz, 2H), 3.50 (s, 1H), 3.46 – 3.38 (m, J = 12.9, 6.3 Hz, 2H), 3.32 (d, J = 3.7 Hz, 3H), 3.29 – 3.24 (m, J = 9.2 Hz, 1H), 3.07 – 3.00 (m, 3H), 2.92 (s, 2H), 2.82 – 2.72 (m, J = 8.3 Hz, 3H), 2.59 – 2.51 (m, 2H), 2.48 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 2.35 (bs, 3H), 2.33 – 2.30 (m, J = 5.0 Hz, 1H), 2.30 – 2.27 (m, J = 5.7 Hz, 2H), 2.24 (s, 2H), 2.01 (d, J = 18.7 Hz, 2H), 1.88 (ddd, J = 14.2, 7.6, 2.1 Hz, 1H), 1.82 – 1.72 (m, J = 16.3, 10.2 Hz, 3H), 1.69 – 1.62 (m, 1H), 1.57 (dd, J = 15.1, 4.8 Hz, 1H), 1.53 – 1.45 (m, 1H), 1.42 (s, 6H), 1.32 – 1.29 (m, J = 6.6 Hz, 7H), 1.24 (s, 3H), 1.22 – 1.19 (m, J = 7.7, 4.3 Hz, 7H), 1.11 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 1.08 (s, 3H), 1.02 (dd, J = 12.2, 7.5 Hz, 3H), 0.93 – 0.87 (m, J = 14.7, 7.3 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.3, 164.6, 151.9, 134.4, 129.3, 124.9, 121.1, 116.2, 94.5, 77.4, 76.9, 73.5, 72.4, 65.6, 65.0, 54.1, 53.5, 48.7, 47.3, 45.8, 44.9, 41.6, 37.0, 36.1, 35.3, 34.5, 33.2, 30.4, 29.9, 25.0, 24.5, 21.7, 20.9, 20.7, 18.4, 17.4, 14.8, 10.9, 8.7, 8.5, 7.3. MS (ESI) m/z : 873.80 $[M + H]^+$; HPLC t_{ret} = 11.9 min (Gradient B).

2-Cyano-N-(4-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)butyl)-N-methylacetamid (60c)



Man löst 26 mg Cyanessigsäure (0,31 mmol, 1,05 Äq.), 117 mg HATU (0,31 mmol, 1,05 Äq.) und 43 μ l Et_3N (0,31 mmol, 1,05 Äq.) in 5 ml trockenem THF und rührt für 30 min bei RT. Anschließend gibt man 240 mg **59c** (0,29 mmol, 1,0 Äq.) hinzu und rührt bei RT, bis DC- und MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung anzeigen. Sollte die Reaktion ins Stocken geraten, wird gegebenenfalls weitere Cyanessigsäure nach obiger Methode aktiviert und zum Ansatz gegeben. Nach vollständiger Umsetzung wird die Lösung aufkonzentriert, in einen Scheidetrichter überführt und mit ges. $NaHCO_3$ und DCM versetzt. Man extrahiert viermal mit DCM, trocknet über Na_2SO_4 und rotiert ein. Das Rohprodukt wird per Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 235 mg (90 %) **60c** als beigen Feststoff. 1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.22 (bs, 1H), 4.99 – 4.90 (m, 2H), 4.63 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 4.31 – 4.24 (m, 1H), 4.12 – 4.04 (m, 1H), 3.99 – 3.92 (m, 1H), 3.90 – 3.84 (m, 1H), 3.60 – 3.56 (m, 1H), 3.52 (d, J = 8.3 Hz, 3H), 3.46 – 3.41 (m, J = 9.6, 7.0, 3.5 Hz, 2H), 3.27 (s, 3H), 3.03 – 2.97 (m, 3H), 2.93 – 2.90 (m, 1H), 2.83 – 2.67 (m, 6H), 2.58 – 2.53 (m, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.29 (s, 4H), 2.09 – 1.74 (m, 6H), 1.64 – 1.37 (m, J = 65.4, 17.3 Hz, 8H), 1.33 – 1.25 (m, 7H), 1.18 – 1.13 (m, 11H), 1.03 (s, 6H), 0.90 – 0.81 (m, J = 14.5 Hz, 9H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.6, 161.8, 114.4, 114.3, 100.5, 100.4, 95.3, 85.7, 85.5, 78.6, 78.1, 77.5, 77.5, 74.9, 74.4, 73.7, 73.7, 73.0, 70.5, 70.1, 66.2, 65.8, 65.7, 63.8, 63.4, 62.2, 56.9, 56.6, 50.7, 49.4, 48.5, 45.5, 43.0, 41.6, 40.4, 40.3, 38.6, 37.0, 36.8, 36.5, 35.9, 35.0, 33.8, 27.7, 26.7, 25.9, 25.5, 25.3, 24.7, 24.5, 22.2, 22.1, 21.7, 21.6, 21.1, 18.4, 16.4, 15.5, 15.3, 11.2, 9.5, 7.5. MS (ESI) m/z : 887.60 [$M + H$] $^+$; HPLC t_{ret} = 14.3 min (Gradient B)

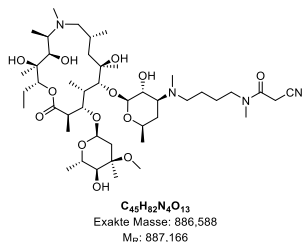
2-Cyano-N-(2-(((2S,3R,4S,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-3-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)(methyl)amino)ethyl)-N-methylacetamid (60d)



36 mg Cyanessigsäure (0,42 mmol, 1,05 Äq.) und 161 mg HATU (0,42 mmol, 1,05 Äq.) werden in 7 ml trockenem THF und 59 μ l Et_3N (0,42 mmol, 1,05 Äq.) suspendiert und für 30 min bei RT gerührt. 320 mg **59d** werden nun hinzugegeben und man rührt über Nacht bei RT, bis DC- und MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung von **59d** anzeigen. Gegebenenfalls werden zu diesem Zweck weitere 0,5 Äq. Hinzugegeben, sollte die Reaktion ins Stocken geraten. Man konzentriert die Lösung auf und überführt in einen Scheidetrichter. Nach Zugabe von DCM und ges. $NaHCO_3$ wird viermal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen

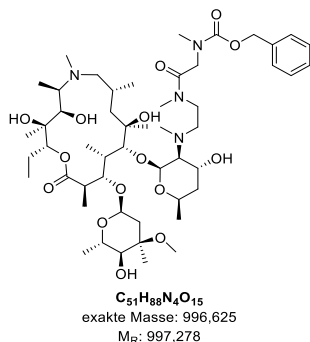
Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und das Rohprodukt per Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 167 mg (48 %) **60d** als weißgelben Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.10 (bs, 1H), 4.97 – 4.86 (m, 1H), 4.58 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 4.38 – 4.27 (m, 1H), 4.20 – 4.13 (m, $J = 15.9$ Hz, 1H), 4.04 – 3.97 (m, 1H), 3.94 – 3.85 (m, 1H), 3.59 – 3.54 (m, 2H), 3.51 (s, 1H), 3.46 – 3.40 (m, 4H), 3.31 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 3.21 – 3.14 (m, 1H), 3.04 – 3.00 (m, 1H), 2.90 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 2.85 (s, 1H), 2.78 – 2.60 (m, 3H), 2.51 – 2.39 (m, 3H), 2.26 (s, 6H), 2.01 – 1.71 (m, $J = 35.2, 29.3, 13.3$ Hz, 5H), 1.58 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 1.49 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H), 1.45 – 1.36 (m, $J = 3.6$ Hz, 1H), 1.25 – 1.22 (m, 6H), 1.16 (d, $J = 12.5$ Hz, 9H), 1.08 – 1.05 (m, 5H), 1.02 – 0.99 (m, 5H), 0.98 – 0.91 (m, 3H), 0.86 – 0.79 (m, $J = 12.5, 4.5$ Hz, 6H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.3, 178.1, 162.8, 162.1, 114.9, 114.0, 103.4, 103.1, 95.5, 95.3, 85.3, 84.5, 79.3, 78.9, 78.1, 78.0, 77.7, 77.6, 77.3, 76.8, 76.0, 75.9, 74.9, 74.8, 74.4, 74.3, 73.6, 73.5, 73.0, 72.2, 71.4, 70.1, 68.5, 68.5, 65.6, 65.6, 65.4, 62.0, 62.0, 59.0, 56.6, 56.5, 52.2, 50.8, 50.1, 49.4, 47.2, 45.1, 42.6, 42.5, 41.2, 40.9, 37.9, 37.4, 36.7, 36.5, 35.0, 34.2, 32.4, 31.0, 27.3, 27.2, 26.7, 25.1, 24.8, 21.9, 21.9, 21.6, 21.3, 21.1, 18.4, 17.1, 16.9, 16.4, 16.2, 15.5, 15.3, 11.1, 9.7, 9.4, 7.5. MS (ESI) m/z : 859.60 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 14.5$ min (Gradient B)

2-Cyano-N-(4-(((2S,3R,4S,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-3-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)(methyl)amino)butyl)-N-methylacetamid (60e)



61 mg Cyanessigsäure (0,72 mmol, 1,05 Äq.) und 274 mg HATU (0,72 mmol, 1,05 Äq.) werden in 11 ml trockenem THF und 100 μ l Et₃N (0,72 mmol, 1,05 Äq.) suspendiert und für 30 min bei RT gerührt. 560 mg **59e** werden nun hinzugegeben und man rührt für 3 Tage bei RT, bis DC- und MS-Kontrollen die vollständige Umsetzung von **59e** anzeigen. Man konzentriert die Lösung auf und überführt in einen Scheidetrichter. Nach Zugabe von DCM und ges. NaHCO₃ wird viermal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, einrotiert und das Rohprodukt per Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 123 mg (20 %) **60e** als weißen Feststoff. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (bs, 1H), 5.00 – 4.95 (m, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.43 – 4.38 (m, 1H), 4.26 – 4.21 (m, 1H), 4.07 – 3.90 (m, 2H), 3.61 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.55 (s, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.43 (dd, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 3H), 3.38 – 3.35 (m, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.23 – 3.18 (m, 1H), 3.01 – 2.98 (m, 2H), 2.91 (s, 1H), 2.77 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.70 – 2.62 (m, *J* = 6.5 Hz, 1H), 2.58 – 2.49 (m, 1H), 2.47 – 2.41 (m, *J* = 11.5 Hz, 2H), 2.32 (s, 1H), 2.29 (s, 4H), 2.21 (d, *J* = 10.8 Hz, 3H), 2.05 – 1.90 (m, *J* = 26.6, 15.0 Hz, 3H), 1.87 – 1.80 (m, *J* = 13.6, 7.3 Hz, 1H), 1.77 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 1.65 – 1.37 (m, 8H), 1.30 – 1.25 (m, 7H), 1.20 – 1.15 (m, *J* = 14.3, 8.1 Hz, 11H), 1.07 – 0.99 (m, *J* = 16.6, 7.9 Hz, 9H), 0.89 – 0.82 (m, *J* = 13.2, 6.5 Hz, 6H). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 178.5, 161.7, 114.3, 114.1, 103.2, 103.1, 95.4, 95.3, 84.5, 84.1, 79.0, 78.9, 78.2, 78.2, 77.8, 77.7, 74.9, 74.5, 73.7, 73.6, 73.1, 73.0, 71.2, 71.0, 70.1, 68.8, 65.8, 65.7, 65.4, 62.1, 53.0, 52.6, 50.6, 49.5, 48.4, 45.1, 42.7, 41.3, 41.2, 37.2, 37.0, 36.6, 35.9, 35.1, 33.9, 30.32, 30.1, 27.4, 26.9, 25.8, 25.5, 25.3, 24.7, 24.7, 22.0, 21.7, 21.4, 21.4, 21.2, 18.5, 16.4, 15.5, 15.4, 15.3, 11.2, 9.5, 9.4, 7.7. MS (ESI) *m/z*: 887.53 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 12.4 min (Gradient B)

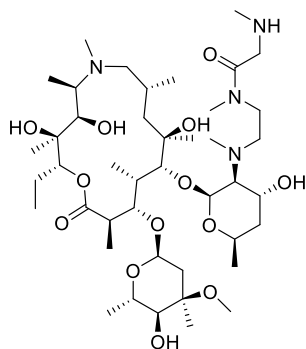
Benzyl-(2-((2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)ethyl)(methyl)amino)-2-oxoethyl)(methyl)carbamate (61)



579 mg Z-SarOH (2,59 mmol, 1,05 Äq.), 986 mg HATU (2,59 mmol, 1,05 Äq.) und 361 μ l Et₃N (2,59 mmol, 1,05 Äq.) werden in 13 ml trockenem THF gelöst und für 1 h bei RT gerührt. Dann werden 1,96 g **59a** (2,47 mmol, 1,0 Äq.) zugegeben und über Nacht bei RT weitergerührt. Die Lösung wird aufkonzentriert, in einen Scheidetrichter überführt, mit ges. NaHCO₃ und DCM versetzt und mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, einrotiert und das Rohprodukt per Flash-Chromatographie aufgereinigt (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient). Man erhält 1,81 g (73 %) **61** als beigen Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33 – 7.25 (m, 5H), 5.11 – 5.04 (m, J = 4.7 Hz, 3H), 4.96 – 4.88 (m, J = 15.1, 4.4 Hz, 1H), 4.67 (dd, J = 9.9, 2.1 Hz, 1H), 4.32 – 4.27 (m, J = 1.4 Hz, 1H), 4.09 – 4.04 (m, J = 9.9, 4.6 Hz, 2H), 4.02 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 3.94 – 3.82 (m, J = 12.5, 9.1 Hz, 2H), 3.80 – 3.72 (m, 1H), 3.64 – 3.56 (m, 2H), 3.31 – 3.26 (m, 3H), 3.22 (s, 1H), 3.16 – 3.01 (m, 2H), 2.99 – 2.95 (m, J = 7.4 Hz, 5H), 2.91 (s, 1H), 2.89 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 2.71 – 2.61 (m, J = 6.9, 4.1 Hz, 3H), 2.55 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 2.53 – 2.49 (m, J = 12.7 Hz, 1H), 2.47 – 2.41 (m, J = 9.3 Hz, 1H), 2.31 (s, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.03 – 1.97 (m, J = 9.7 Hz, 2H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.76 (dd, J = 14.6, 6.8 Hz, 1H), 1.58 – 1.51 (m, J = 6.2 Hz, 2H), 1.50 – 1.38 (m, 2H), 1.33 – 1.27 (m, 6H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.17 (d, J = 2.9 Hz, 3H), 1.14 (d, J = 5.8 Hz, 5H), 1.07 – 1.02 (m, J = 9.0 Hz, 6H), 0.92 – 0.82 (m, J = 14.9, 7.5 Hz, 9H). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 178.7, 168.4, 168.1, 157.0, 136.7, 128.5, 128.0, 127.7, 100.4, 95.0, 94.9, 78.2, 77.9, 74.3, 74.1, 74.0, 73.8, 72.9, 72.8, 71.1, 70.6, 70.1, 67.4, 67.2, 66.3, 65.7, 64.5, 62.6, 60.4, 54.9, 51.0, 50.5, 49.3, 48.5, 47.0, 45.6, 42.9, 42.2, 42.1, 41.8, 40.8, 38.6, 37.0, 36.3, 35.7, 35.5, 35.2, 34.8, 34.0, 27.7, 26.7, 22.2, 21.7, 21.6, 21.3, 21.0, 18.3, 16.3, 15.0, 14.9, 14.2, 11.2, 9.2, 9.0, 7.4. MS (ESI) m/z : 997.87 [M + H]⁺; HPLC t_{ret} = 14.3 min (Gradient B).

N-(2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)ethyl)-N-methyl-2-(methylamino)acetamid (62**)**

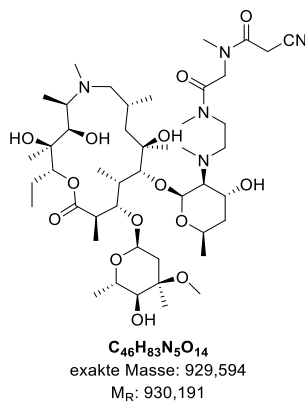


$C_{43}H_{82}N_4O_{13}$
exakte Masse: 862,588
 M_R : 863,144

1,5 g **61** (1,5 mmol, 1,0 Äq.) werden in 45 ml EtOAc gelöst und bei RT gerührt. Der Rundkolben wird mit einem Septum verschlossen und der Ansatz wird mit Argon aufgesättigt und 150 mg Palladium auf Kohle (3 %) zugefügt. Nach erneuter Sättigung mit Argon wird Wasserstoff zugegeben und über Nacht gerührt. Verbliebener Wasserstoff wird durch erneutes Einleiten von Argon ersetzt, dann wird die Reaktionsmischung über Celite filtriert. Nach Detektion von Verunreinigungen im Filtrat wird dieses per Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 630 mg (49 %) **62** als weißen Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.98 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.95 – 4.92 (m, 1H), 4.65 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.12 – 3.95 (m, 2H), 3.92 – 3.83 (m, 2H), 3.66 – 3.56 (m, 3H), 3.41 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.39 (s, 1H), 3.33 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 3.28 (d, $J = 3.5$ Hz, 3H), 3.25 – 3.11 (m, 3H), 2.96 (dd, $J = 9.3, 4.2$ Hz, 1H), 2.92 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H), 2.87 – 2.79 (m, 1H), 2.72 (dd, $J = 14.4, 7.2$ Hz, 3H), 2.67 – 2.59 (m, 2H), 2.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H), 2.48 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 2.39 (d, $J = 4.2$ Hz, 3H), 2.30 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.03 – 1.94 (m, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.76 (dd, $J = 14.5, 5.9$ Hz, 1H), 1.60 – 1.39 (m, 4H), 1.30 (s, 3H), 1.26 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.24 – 1.19 (m, 1H), 1.17 (s, 3H), 1.15 (s, 2H), 1.14 (s, 3H), 1.13 – 1.11 (m, 2H), 1.07 – 1.00 (m, 6H), 0.91 – 0.82 (m, 9H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.6, 178.5, 170.8, 170.6, 100.5, 100.4, 95.4, 95.3, 85.8, 85.3, 78.6, 78.4, 78.2, 78.1, 74.4, 73.7, 73.6, 73.0, 72.9, 70.7, 70.5, 70.2, 66.4, 66.3, 65.8, 65.7, 64.8, 64.1, 63.4, 62.4, 54.6, 54.5, 52.3, 51.7, 49.4, 48.4, 46.7, 46.2, 45.5, 43.1, 42.0, 41.7, 41.6, 41.0, 36.8, 36.6, 36.5, 35.1, 34.9, 34.0, 27.7, 26.8, 25.5, 25.3, 22.3, 22.2, 21.8, 21.6, 21.3, 21.2, 18.4, 18.4, 16.4, 15.4, 15.3, 11.2, 10.5, 9.5, 9.4, 7.6. MS (ESI) m/z : 863.62 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 10.1$ min (Gradient B).

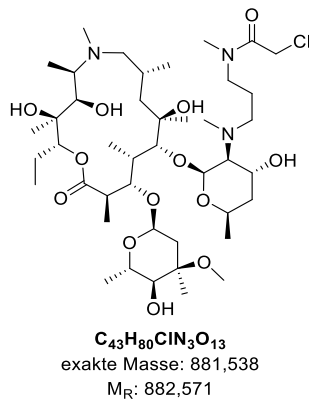
2-Cyano-N-(2-((2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)ethyl)(methyl)amino)-2-oxoethyl)-N-methylacetamid (63)



53 mg Cyanessigsäure (0,62 mmol, 1,0 Äq.), 247 mg HATU (0,65 mmol, 1,05 Äq.) und 91 μ l Et_3N (0,65 mmol, 1,05 Äq.) werden in 8 ml trockenem THF gelöst und für 20 min bei RT gerührt. Dann werden 535 mg **62** (0,62 mmol, 1,0 Äq.) in einem geringen Volumen trockenem THF gelöst, dem Ansatz zugefügt und es wird über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wird aufkonzentriert, in einen Scheidetrichter überführt und mit halbges. $NaHCO_3$ und DCM versetzt. Man extrahiert viermal mit DCM und trocknet die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 . Nach Einrotieren des Lösemittels ist keine weitere Aufreinigung mehr nötig. Man erhält 460 mg (80 %) **63** als weißen Feststoff. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ

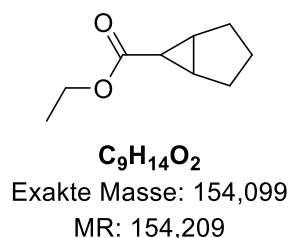
5.06 – 4.99 (m, 1H), 4.93 (dd, $J = 10.9, 2.3$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 4.31 – 4.25 (m, 1H), 4.15 – 4.01 (m, $J = 15.3, 14.0, 7.2$ Hz, 2H), 3.94 – 3.84 (m, 2H), 3.67 – 3.54 (m, 4H), 3.51 – 3.43 (m, 1H), 3.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 3.25 – 3.11 (m, $J = 18.5, 16.3, 4.8$ Hz, 2H), 3.07 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 3.01 – 2.96 (m, 3H), 2.95 – 2.90 (m, 3H), 2.73 – 2.66 (m, $J = 12.5, 7.0$ Hz, 2H), 2.65 – 2.60 (m, $J = 8.7$ Hz, 1H), 2.59 – 2.56 (m, $J = 5.8$ Hz, 1H), 2.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.37 – 2.32 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.10 – 1.93 (m, $J = 26.0, 13.9$ Hz, 2H), 1.91 – 1.80 (m, 2H), 1.78 – 1.70 (m, $J = 14.2, 7.0$ Hz, 1H), 1.60 – 1.40 (m, 4H), 1.31 (s, 3H), 1.27 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.23 – 1.20 (m, 1H), 1.18 – 1.11 (m, 9H), 1.09 – 1.02 (m, 6H), 0.92 – 0.81 (m, $J = 11.6, 7.4$ Hz, 9H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.7, 167.3, 166.9, 165.8, 163.4, 162.9, 125.5, 114.0, 113.9, 100.6, 100.4, 95.3, 95.1, 85.6, 84.8, 78.2, 78.1, 74.4, 73.8, 73.7, 72.9, 72.8, 71.0, 70.5, 70.0, 66.5, 66.4, 65.8, 65.7, 64.9, 63.5, 62.5, 54.9, 54.5, 50.1, 49.7, 49.4, 49.4, 48.7, 47.2, 45.5, 43.0, 42.0, 41.9, 41.7, 40.7, 38.65, 37.49, 37.44, 36.87, 36.54, 35.48, 34.96, 34.18, 31.29, 30.41, 27.66, 26.68, 25.1, 22.3, 22.2, 21.7, 21.6, 21.2, 18.4, 18.3, 16.4, 15.3, 15.2, 11.2, 9.4, 9.3, 7.6. MS (ESI) m/z : 930.73 $[M + H]^+$; HPLC $t_{ret} = 12.1$ min (Gradient B).

2-Chloro-N-(3-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)propyl)-N-methylacetamid (64)

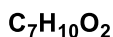
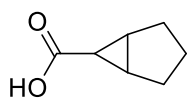


1,0 g **59b** (1,24 mmol, 1,0 Äq.) und 173 μ l Et₃N (1,24 mmol, 1,0 Äq.) werden in 25 ml DCM gelöst und im Eisbad gekühlt. Man gibt 99 μ l Chloressigsäurechlorid (1,24 mmol, 1,0 Äq.) hinzu und rührt, während der Ansatz langsam RT erreicht. Nach Anzeige der vollständigen Umsetzung von **59b** durch Reaktionskontrollen wird mit DCM verdünnt, in einen Scheidetrichter überführt und mit ges. NaCl gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird per Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 835 mg (76 %) **64** als Feststoff. ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 5.40 (s, 1H), 5.07 – 5.03 (m, 1H), 4.96 – 4.84 (m, 2H), 4.72 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 14.1, 3.1 Hz, 1H), 4.26 – 4.23 (m, 1H), 4.06 (dt, *J* = 11.0, 5.5 Hz, 3H), 4.01 – 3.95 (m, *J* = 13.8, 6.8 Hz, 1H), 3.72 – 3.68 (m, 1H), 3.60 – 3.54 (m, 2H), 3.38 (s, 1H), 3.33 – 3.31 (m, *J* = 3.4 Hz, 2H), 3.29 (s, 2H), 3.05 – 3.02 (m, *J* = 6.7 Hz, 3H), 3.00 (s, 1H), 2.69 – 2.61 (m, *J* = 7.2, 4.3 Hz, 3H), 2.55 – 2.47 (m, 2H), 2.31 (s, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.04 – 2.02 (m, *J* = 4.5 Hz, 1H), 2.00 (s, 2H), 1.89 – 1.83 (m, *J* = 8.3, 5.8 Hz, 2H), 1.77 – 1.63 (m, 2H), 1.58 – 1.37 (m, 5H), 1.31 – 1.26 (m, 7H), 1.23 – 1.19 (m, *J* = 8.5, 2.7 Hz, 6H), 1.18 – 1.14 (m, 6H), 1.09 – 1.05 (m, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.04 – 1.00 (m, 3H), 0.94 – 0.87 (m, *J* = 18.0, 7.1 Hz, 6H), 0.87 – 0.81 (m, *J* = 7.3 Hz, 5H). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 178.5, 163.3, 98.5, 95.1, 87.8, 78.2, 77.7, 74.5, 73.1, 72.5, 69.9, 68.1, 66.5, 63.2, 62.5, 60.4, 51.1, 49.5, 48.6, 47.7, 45.6, 43.7, 41.7, 36.6, 36.3, 36.2, 35.8, 34.9, 28.2, 28.1, 26.8, 22.4, 21.7, 21.5, 21.2, 21.0, 18.4, 16.6, 15.1, 14.2, 11.2, 9.9, 7.9. MS (ESI) *m/z*: 882.67 [*M* + *H*]⁺; HPLC *t*_{ret} = 12.6 min (Gradient B)

Ethyl bicyclo[3.1.0]hexan-6-carboxylat (67)



In einem mit Septum verschlossenen Dreihalskolben werden 7,54 ml Cyclopenten (82,4 mmol, 1,2 Äq.) und 30 mg Rhodium(II)acetat (69 μ mol, 0,001 Äq.) in 66 ml trockenem DCM gelöst und der Kolben unter gelindem Gasfluss mit Argon gesättigt. 8,3 ml Ethyldiazoacetat (Lösung mit 13 % DCM, 69 mmol, 1,0 Äq.) werden 1:2 mit trockenem DCM verdünnt und über mehrere Stunden bei RT zugetropft. Der Farbton der Lösung verfärbt sich dabei zunehmend von grün nach gelb. Nach Zugabe von ca. der Hälfte des Volumens werden ggf. erneut 10 mg Rhodium(II)acetat zugeführt. Nach vollständiger Zugabe wird über Nacht gerührt. Man filtriert über Celite und wäscht mit Pentan, dann wird das Filtrat vorsichtig aufkonzentriert. Das Rohprodukt wird im Kugelrohr destilliert. Man erhält 9,5 g (90 %) **67** (cis/trans Gemisch) als klares, schwach gefärbtes Öl mit charakteristischem Geruch.

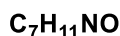
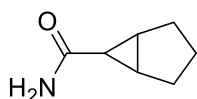
Bicyclo[3.1.0]hexan-6-carbonsäure (68)

Exakte Masse: 126,068

MR: 126,155

7,64 g **67** (49,5 mmol, 1,0 Äq.) werden in 79 ml 7 %iger ethanolischer KOH (99 mmol, 2,0 Äq.) gelöst und unter Refluxbedingungen über Nacht gerührt. Man rotiert das Lösemittel ab und nimmt den öligen Rückstand in Wasser auf. Die wässrige Lösung wird in einen Scheidetrichter überführt und zweimal mit Ether gereinigt. Anschließend wird die Wasserphase mit 4 N HCl angesäuert, es kommt zur Trübung und Ausbildung eines feinen Niederschlags. Man extrahiert viermal mit Ether und wäscht die vereinten Etherphasen einmal mit angesäuerter ges. NaCl. Anschließend wird ggf. filtriert und der Ether einrotiert. Man erhält 5,74 g (91 %) **68**

als braunes, unangenehm riechendes Öl.

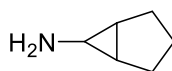
Bicyclo[3.1.0]hexan-6-carboxamid (69)

Exakte Masse: 125,084

MR: 125,171

1,54 g **68** (12,2 mmol, 1,0 Äq.) und 2,18 g Carbonyldiimidazol (13,4 mmol, 1,1 Äq.) werden mit 15 ml DMF versetzt und für ca. 1,5 h bei RT gerührt, wobei Gasentwicklung beobachtet wird. Der Ansatz wird im Eisbad auf ca. 0 °C gekühlt und man gibt 3,55 ml konz. NH₃ hinzu, dann wird über Nacht gerührt. Anschließend wird die Lösung in einen Scheidetrichter überführt und mit EtOAc sowie 10 % Zitronensäurelösung versetzt. Die organische Phase wird mit H₂O gewaschen, dann über Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Das braun gefärbte Rohprodukt wird mit Ether verrieben und der Ether abdekantiert. Dann wird in Wasser und wenig EtOH

umkristallisiert. Man erhält 530 mg (35 %) **69** als farblose Nadeln. ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 3.56 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 1.76 – 1.61 (m, *J* = 10.5 Hz, 5H), 1.57 – 1.43 (m, *J* = 12.7, 6.9 Hz, 1H), 1.16 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 1.06 – 0.89 (m, 1H). ¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 176.9, 27.9, 27.2, 22.5, 20.3. MS (ESI) *m/z*: 126.27 [M + H]⁺; (*trans*-konfigurierte Kristalle aus EtOH/H₂O)

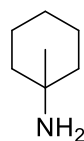
Bicyclo[3.1.0]hexan-6-amin (70)

Exakte Masse: 97,089

MR: 97,161

Vorschrift A (Hofmann-Umlagerung aus 69): 280 mg **69** (2,2 mmol, 1,0 Äq.) werden in 3 ml H₂O gelöst und bei 0-5 °C gerührt. 358 µl 50 % NaOH (4,4 mmol, 2,0 Äq.) werden portionsweise zugeführt und die Temperatur auf ca. 15 °C eingestellt. Unter Einbehaltung der Temperatur werden nun 2,38 ml NaClO (7,3 % in H₂O, 2,2 mmol, 1,0 Äq.) tropfenweise zugegeben und man rührt für 20 min. Das Reaktionsgefäß wird mit einem Rückflusskühler versetzt und für ca. 5 min auf 60 °C erhitzt, woraufhin MS-Kontrollen die Umsetzung zum Produkt anzeigen. Das Rohprodukt wird durch Wasserdampfdestillation aufgereinigt, die Vorlage wird hierbei mit HCl angesäuert. Nach Einrotieren der Vorlage erhält man 92 mg (31 %) **70**-HCl als Feststoff.

Vorschrift B (Curtius-Umlagerung aus 68): 5,74 g **68** (45,5 mmol, 1,0 Äq.) werden im Eisbad in 9,4 ml H₂O und 18 ml Aceton gelöst. Man löst 7,6 ml Et₃N (54,6 mmol, 1,2 Äq.) in 83 ml Aceton und gibt die Lösung portionsweise zum gekühlten Ansatz. Anschließend löst man 4,23 ml Chlorameisensäuremethylester (54,6 mmol, 1,2 Äq.) in 32 ml Aceton und gibt diese Lösung ebenfalls portionsweise dazu. Es wird für ca. 30 min bei 0 °C gerührt. Zum Ansatz gibt man nun langsam eine Lösung aus 4,44 g Natriumazid (68,3 mmol, 1,5 Äq.) in 18 ml H₂O und rührt nach vollständiger Zugabe noch weitere 60 min im Eisbad. Der Ansatz wird in einen Scheidetrichter überführt, mit H₂O und Toluol versetzt und viermal mit Toluol extrahiert. Man wäscht die vereinten organischen Phasen mit H₂O, trocknet über Na₂SO₄ und konzentriert die Lösung auf ein kleines Restvolumen auf. Diese wird vorsichtig in einen auf 100 °C vorgeheizten, mit Rückflusskühler versehenen Dreihalskolben eingetropft und nach vollständiger Zugabe für 30 min in der Hitze gerührt. Man lässt die Lösung wieder abkühlen, gibt portionsweise 14,5 ml konz. HCl hinzu und rührt über Nacht. Die Wasserphase wird abgetrennt, einmal mit Pentan gewaschen und zur Trockne eingeeengt. Den entstandenen Feststoff versetzt man mit 10 % KOH, überführt in einen Scheidetrichter und extrahiert viermal mit n-Pentan. Die vereinten organischen Phasen werden mit ges. NaCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vorsichtig aufkonzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wird im Kugelrohr destillativ aufgereinigt. Man erhält 2,1 g (47 %) **70** als farbloses Öl mit charakteristischem Geruch. MS (ESI) m/z: 98.2 [M + H]⁺

1-Methylcyclohexan-1-amin (71)**C₇H₁₅N**

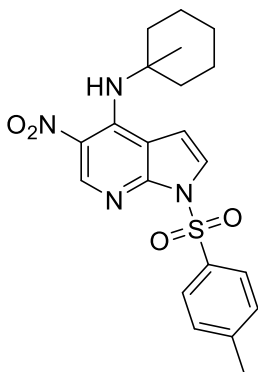
exakte Masse: 113,120

M_R: 113,204

Generierung des NCl₃: 270,4 g (1,89 mol) Calciumhypochlorit werden in einem mit KPG-Rührer, Innenthermometer und Tropftrichter ausgestatteten Dreihalskolben in 600 ml H₂O und 900 ml DCM gerührt. Über ein Trockeneis-Acetonbad wird die Innentemperatur bei 0-10 °C gehalten. 66,1 g NH₄Cl (1,23 mol) werden in 450 ml Wasser und 150 ml konz. HCl gelöst und über den Tropftrichter im Verlauf einer Stunde zugegeben. Man beobachtet schwache Gasentwicklung und eine Gelbfärbung des Ansatzes. Nach vollendeter Zugabe wird für 20 min weiter gerührt, dann werden beide Phasen in einen Scheidetrichter überführt, die organische Phase dreimal mit kaltem H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Aminierung: 197 g Methylcyclohexan (2,0 mol) und 106,2 g AlCl₃ (0,8 mol) werden in einem mit KPG-Rührer, Anschütz-Aufsatz mit Innenthermometer und Kühlwendel sowie einem Tropftrichter ausgestatteten Dreihalskolben vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wird mit Argon gesättigt und die Innentemperatur bei -5 bis 5 °C gehalten. 300 ml der im vorigen Schritt erhaltenen NCl₃-Lösung werden 1:1 mit DCM verdünnt und über den Verlauf von 2 h langsam zugetropft, wobei es zur Braunfärbung des Reaktionsansatzes kommt. Nach vollständiger Zugabe wird für 20 min unter Einhaltung der Temperatur weiter gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf ca. 900 g Eis und 50 ml konz. HCl gegossen und kräftig gerührt. Es kommt zur Verdunklung zu Blau- bis Schwarztönen. Der Ansatz kann nun über Nacht gelagert werden. Die Phasen werden in einen Scheidetrichter überführt und die organische Phase abgetrennt. Diese wird nun dreimal mit je 100 ml 5 %iger HCl extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zur Entfernung nicht-basischer organischer Verunreinigungen mit Ether gewaschen, bis die verworfene Etherphase farblos wird. Anschließend wird die wässrige Phase unter Kühlung (!) mit 50 % NaOH Lösung versetzt. Es wird in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit je 125 ml Ether ausgeschüttelt, dann werden die vereinten Etherphasen über Na₂SO₄ getrocknet und der Ether vorsichtig in gelindem Vakuum einrotiert. Zurück bleibt eine bernsteinfarbene, klare Flüssigkeit, die per Vakuumdestillation aufgereinigt wird. Man erhält 18,75 g **71** als farbloses Öl. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.45 – 1.18 (m, 10H), 0.95 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 48.5, 40.7, 29.5, 25.8, 22.7. MS (ESI) m/z: 114.20 [M + H]⁺; HPLC t_{ret} = 2.3 min (Gradient A)

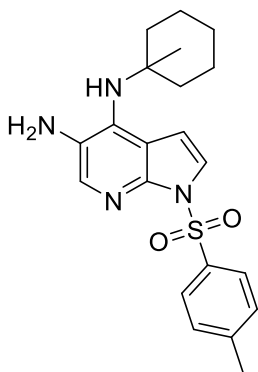
N-(1-Methylcyclohexyl)-5-nitro-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-amin (72)



C₂₁H₂₄N₄O₄S
exakte Masse: 428,152
M_R: 428,507

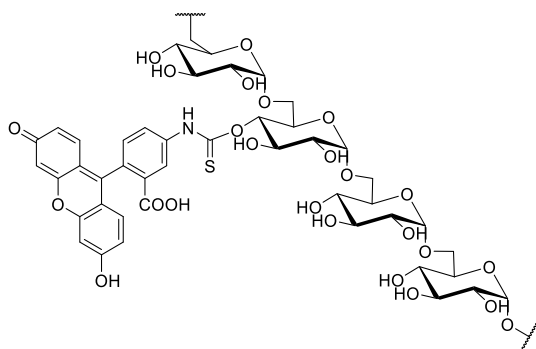
Die Synthese von **72** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **A** aus 5,15 g **2** und 2,43 ml **71**. Man erhält 5,1 g (81 %) **72** als gelben Feststoff. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.62 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.54 – 1.46 (m, *J* = 13.8 Hz, 6H), 1.39 – 1.32 (m, *J* = 13.8 Hz, 7H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 149.2, 146.6, 145.9, 142.2, 134.9, 129.8, 128.7, 127.9, 122.8, 109.4, 107.2, 55.4, 39.1, 27.0, 25.3, 22.2, 21.8. MS (ESI) *m/z*: 429.20 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 23.0 min (Gradient A)

N⁴-(1-Methylcyclohexyl)-1-tosyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-4,5-diamin (73)



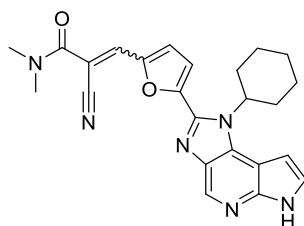
C₂₁H₂₆N₄O₂S
exakte Masse: 398,178
M_R: 398,525

Die Synthese von **73** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **B** aus 5,0 g **72**. Man erhält 4,4 g (96 %) **73** als violetten, festen Schaum. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.96 – 7.89 (m, *J* = 7.3 Hz, 3H), 7.80 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 2.97 (bs, *J* = 62.9, 7.2 Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.79 – 1.71 (m, *J* = 10.0, 5.8 Hz, 2H), 1.52 – 1.30 (m, 8H), 1.24 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 145.6, 145.1, 138.8, 137.5, 136.2, 134.8, 130.1, 129.9, 128.4, 124.0, 106.7, 55.3, 39.8, 27.3, 26.0, 23.1, 22.1. MS (ESI) *m/z*: 399.33 [M + H]⁺; HPLC *t*_{ret} = 17.1 min (Gradient A)

FITC-Dextran 6000 (75)

1 g Dextran (durchschnittliches Molekulargewicht von 6000 Dalton) wird in einem Rundkolben mit Rückflusskühler in 10 ml DMSO und wenigen Tropfen Pyridin gelöst. Es werden 100 mg Isothiocyanatofluoreszin und 20 mg Dibutylzinndilaurat zugefügt und der Ansatz für 2 h auf 95 % erhitzt. Nach Abkühlen wird ein Überschuss EtOH zugegeben, woraufhin es zur Ausfällung des Produktes kommt. Lösliche Bestandteile werden über Filtration

entfernt. Zur Aufreinigung wird der übrige Feststoff erneut in EtOH suspendiert, dann wird wieder abgesaugt. Dies wird so lange wiederholt, bis das Filtrat farblos ist. Man erhält 915 mg **75** als blassgelben Feststoff.

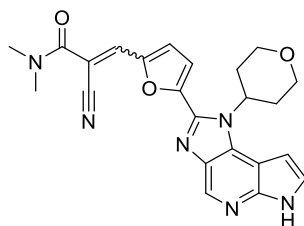
2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N,N-dimethylacrylamid (FM-381)

$C_{24}H_{24}N_6O_2$
exakte Masse: 428,196
 M_R : 428,496

Die Synthese von **FM-381** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 620 mg **7a** und 229 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (2,63 mmol, 1,1 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 460 mg (58 %) **FM-381** als gelben Feststoff. Smp: 207 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.08 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.52 (d, J = 28.3 Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.03 – 4.86 (m, 1H), 3.35 (s, 6H), 2.38 – 2.32 (m, 2H), 2.15 – 1.98 (m, J = 17.8 Hz, 2H), 1.96 – 1.87 (m, 2H), 1.83 – 1.69 (m, 1H), 1.63 – 1.43 (m, J = 37.3 Hz, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ

162.7, 149.5, 148.4, 144.6, 140.5, 136.3, 135.3, 135.0, 132.8, 124.0, 121.7, 116.3, 116.2, 104.1, 100.3, 100.2, 56.1, 30.0, 30.0, 24.9, 24.2. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{24}N_6O_2$: 429.20335, gemessen 429.20374; IR $[cm^{-1}]$ 3327, 2933, 2957, 2208, 1629, 1379, 1321, 1147, 974, 810, 731; HPLC t_{ret} = 21.1 min (Gradient A).

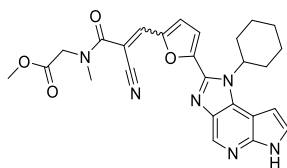
2-Cyano-N,N-dimethyl-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (**8**)



$C_{23}H_{22}N_6O_3$
exakte Masse: 430,175
 M_R : 430,468

Die Synthese von **8** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesvorschrift **G** aus 680 mg **7b** und 249 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (2,86 mmol, 1,1 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 350 mg (40 %) **8** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 195 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.95 (s, 1H), 8.60 – 8.47 (m, J = 5.4 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.48 – 7.39 (m, 1H), 7.29 (dd, J = 9.2, 3.7 Hz, 2H), 6.75 – 6.61 (m, J = 20.2 Hz, 1H), 5.27 (q, 1H), 3.98 – 3.88 (m, 2H), 3.57 – 3.43 (m, J = 11.4 Hz, 2H), 3.26 (s, 3H), 3.06 – 2.95 (m, 1H), 2.88 – 2.76 (m, J = 11.0 Hz, 2H), 2.32 (s, 1H), 1.98 – 1.64 (m, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.6, 149.4, 148.5, 144.4, 140.2, 136.1, 135.2, 135.0, 132.4, 124.0, 122.2, 116.1, 115.9, 104.1, 101.4, 100.5, 66.0, 51.8, 30.3, 29.4. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{23}H_{22}N_6O_3$: 431.18262, gemessen 431.18322; $[M + H]^+$; IR [cm^{-1}] 3331, 2966, 2841, 2208, 1629, 1558, 1466, 1378, 1321, 1262, 1147, 1086, 1030, 974, 739; HPLC t_{ret} = 19.1 min (Gradient A).

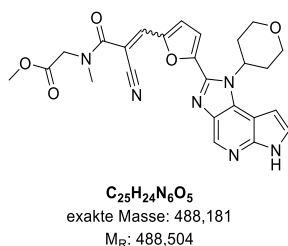
Methyl N-(2-cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acryloyl)-N-methylglycinat (**9**)



$C_{26}H_{26}N_6O_4$
exakte Masse: 486,202
 M_R : 486,532

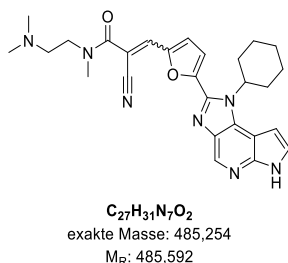
Die Synthese von **9** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesvorschrift **G** aus 700 mg **7a** und 425 mg **57** (2,5 mmol, 1,2 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 9:1) aufgereinigt. Man erhält 470 mg (46 %) **9** als roten Feststoff. Smp: 117 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.08 (s, 1H), 8.67 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.87 – 7.73 (m, 1H), 7.58 – 7.53 (m, J = 6.0, 3.0 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 26.1, 3.8 Hz, 1H), 6.88 – 6.80 (m, J = 9.0, 3.2, 1.8 Hz, 1H), 5.01 – 4.87 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.09 (s, 1H), 1.98 (s, 1H), 1.92 – 1.89 (m, 2H), 1.80 – 1.71 (m, 2H), 1.65 – 1.41 (m, 4H), 1.25 – 1.06 (m, J = 9.7, 6.5, 3.0 Hz, 2H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.8, 163.5, 162.2, 149.4, 148.8, 144.5, 140.4, 136.2, 134.9, 132.7, 124.1, 119.8, 116.4, 115.7, 115.5, 104.1, 100.3, 69.7, 56.0, 51.8, 36.5, 29.9, 24.8, 24.2. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{26}N_6O_4$: 487.20883, gemessen 487.20970; IR [cm^{-1}] 2923, 2204, 1741, 1636, 1388, 1210, 1173, 1025, 885, 705; HPLC t_{ret} = 19.8 und 20.7 min (E/Z Gemisch, Gradient A).

Methyl N-(2-cyano-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acryloyl)-N-methylglycinat (10)



Die Synthese von **10** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 980 mg **7b** und 595 mg **57** (3,5 mmol, 1,2 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 796 mg (56 %) **10** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 224 °C (Zersetzung); 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.08 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.88 – 7.70 (m, J = 24.6, 13.4 Hz, 1H), 7.61 – 7.56 (m, J = 2.7 Hz, 1H), 7.53 – 7.43 (m, J = 13.7 Hz, 1H), 7.43 – 7.32 (m, 1H), 6.92 – 6.81 (m, 1H), 5.46 – 5.05 (m, 1H), 4.36 – 4.19 (m, 1H), 4.17 – 4.03 (m, J = 16.2, 11.4, 4.7 Hz, 2H), 3.73 – 3.62 (m, 3H), 3.59 – 3.55 (m, J = 6.4 Hz, 3H), 3.28 – 3.23 (m, 1H), 3.09 (t, J = 28.2 Hz, 1H), 2.74 – 2.58 (m, 2H), 2.54 – 2.49 (m, 1H), 2.06 – 1.86 (m, J = 15.7 Hz, 2H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.8, 163.8, 152.8, 149.7, 144.7, 140.5, 136.4, 135.3, 132.8, 124.4, 116.6, 115.9, 114.9, 104.5, 100.9, 100.4, 66.6, 66.3, 52.2, 48.7, 36.8, 30.2, 29.74. ESI-HRMS: $[M + Na]^+$ berechnet für $C_{25}H_{24}N_6O_5$: 511.17004, gemessen 511.17050; IR $[cm^{-1}]$ 2880, 2232, 1752, 1654, 1602, 1560, 1174, 1016, 809; HPLC t_{ret} = 16.7 und 18.5 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

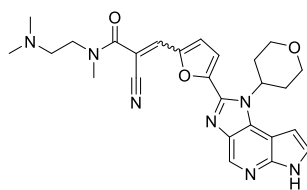
2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N-(2-(dimethylamino)ethyl)-N-methylacrylamid (11)



Die Synthese von **11** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 1,0 g **7a** und 506 mg **56** (3,0 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 6:1) aufgereinigt. Man erhält 225 mg (15 %) **11** als orangefarbenen Feststoff. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.10 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.89 (d, J = 7.9, 0.9 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.7, 1.7 Hz, 2H), 7.17 – 7.08 (m, 1H), 4.98 – 4.88 (m, 1H), 3.46 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.33 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.92 (s, 3H), 2.64 – 2.56 (m, J = 12.0, 5.4 Hz, 2H), 2.34 (s, 6H), 2.13 – 2.03 (m, 2H), 1.24 – 1.12 (m, 6H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO)

δ 163.4, 149.6, 144.7, 144.1, 140.7, 139.9, 136.4, 135.1, 132.9, 131.0, 129.3, 127.9, 124.3, 116.5, 104.3, 100.4, 93.7, 56.3, 55.0, 45.6, 44.3, 35.3, 30.1, 25.0. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{27}H_{31}N_7O_2$: 486.26120, gefunden 486.26138; IR $[cm^{-1}]$ 2932, 2856, 1653, 1577, 1457, 1369, 1011, 828, 749, 681; HPLC t_{ret} = 15.5 und 16.2 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

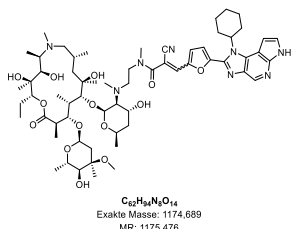
2-Cyano-N-(2-(dimethylamino)ethyl)-N-methyl-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (12)



$C_{26}H_{29}N_7O_3$
exakte Masse: 487,233
 M_R : 487,564

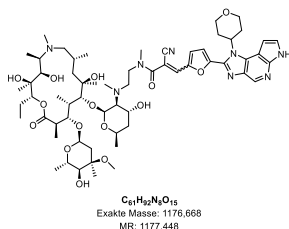
Die Synthese von **12** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 105 mg **7b** und 53 mg **56** (0,31 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffs aufgereinigt. Man erhält 70 mg (46 %) **12** als orangeroten Feststoff. Smp: 124 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 12.25 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.53 – 7.45 (m, 1H), 7.38 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.10 – 7.05 (m, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.53 – 5.40 (m, 1H), 4.22 (dd, $J = 11.5, 4.7$ Hz, 2H), 3.74 (t, $J = 11.6$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.89 (qd, $J = 12.5, 5.1$ Hz, 2H), 2.58 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.28 (s, 6H), 2.02 (dd, $J = 12.6, 4.6$ Hz, 2H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 149.7, 148.5, 144.6, 140.4, 136.3, 135.2, 132.6, 124.3, 122.2, 116.4, 116.2, 104.4, 102.0, 100.7, 66.2, 56.1, 52.1, 45.3, 44.9, 35.5, 29.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{29}N_7O_3$: 488.24046, gemessen 488.24070; IR [cm^{-1}] 2934, 2206, 1636, 1605, 1457, 1340, 1175, 1087, 1016, 882, 734; HPLC $t_{ret} = 14.2$ and 15.4 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N-(2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)ethyl)-N-methylacrylamid (13**)**



Die Synthese von **13** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 100 mg **7a** und 257 mg **60a** (0,3 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 4:1) aufgereinigt. Man erhält 255 mg (73 %) **13** als gelben Feststoff. Smp: 159 °C (teilweise Zersetzung ab 150 °C); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 12.08 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.57 – 7.52 (m, $J = 9.1, 6.3$ Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.96 – 4.82 (m, $J = 20.8$ Hz, 4H), 4.77 – 4.72 (m, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.34 – 4.25 (m, 3H), 4.11 – 4.03 (m, 2H), 4.01 – 3.90 (m, $J = 3.4$ Hz, 2H), 3.78 (s, 1H), 3.62 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.42 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.23 (t, $J = 4.7$ Hz, 3H), 3.06 – 3.03 (m, 1H), 2.94 – 2.89 (m, 2H), 2.69 (s, 1H), 2.41 – 2.30 (m, 6H), 2.26 – 2.17 (m, 6H), 2.11 (s, 1H), 2.04 – 2.00 (m, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.94 – 1.87 (m, 5H), 1.79 – 1.72 (m, 4H), 1.60 – 1.45 (m, 9H), 1.22 (s, 3H), 1.17 – 1.16 (m, 3H), 1.14 (s, 1H), 1.11 – 1.10 (m, $J = 3.2$ Hz, 2H), 1.05 (d, $J = 5.0$ Hz, 4H), 1.01 – 0.99 (m, 3H), 0.95 – 0.93 (m, 2H), 0.87 – 0.82 (m, 6H), 0.79 – 0.75 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ 177.3, 149.6, 148.4, 144.7, 140.6, 136.3, 135.1, 132.9, 124.2, 121.7, 116.4, 104.2, 100.4, 99.6, 94.7, 77.4, 77.1, 76.2, 73.7, 73.6, 72.8, 72.3, 69.8, 68.6, 67.1, 65.7, 64.9, 56.2, 55.8, 48.8, 48.7, 45.8, 45.0, 41.7, 41.0, 38.3, 35.8, 34.6, 30.7, 30.3, 30.1, 29.6, 29.0, 25.0, 24.3, 22.0, 21.7, 21.4, 21.0, 18.4, 17.5, 14.8, 14.7, 10.9, 10.9, 9.12, 8.7, 6.8. ESI-HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $C_{62}H_{94}N_8O_{14}$: 1175.69623, gemessen 1175.69397; IR $[\text{cm}^{-1}]$ 2928, 2873, 1636, 1457, 1374, 1119, 1028, 798, 731; HPLC t_{ret} = 21.4 und 22.1 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B).

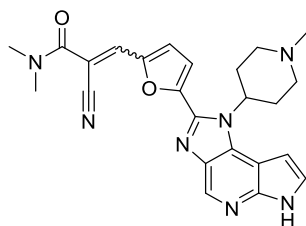
2-Cyano-N-(2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methylamino)ethyl)-N-methyl-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (14)



Die Synthese von **14** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 98 mg **7b** und 220 mg **60a** (0,26 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffs aufgereinigt. Man erhält 144 mg (42 %) **14** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 177 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.07 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.58 (dd, 1H), 7.48 – 7.44 (m, 2H), 6.91 – 6.87 (m, 1H), 5.47 – 5.36 (m, $J = 11.5, 5.8$ Hz, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.85 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.32 – 4.24 (m, $J = 8.3$ Hz, 3H), 4.13 – 4.05 (m, 4H), 3.99 – 3.90 (m, 2H), 3.82 – 3.78 (m, 1H), 3.68 – 3.64

(m, $J = 8.8, 4.3$ Hz, 3H), 3.22 (s, 6H), 3.04 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 2.94 – 2.86 (m, $J = 15.7, 6.7$ Hz, 2H), 2.71 – 2.61 (m, $J = 11.9, 7.4$ Hz, 5H), 2.49 – 2.47 (m, 2H), 2.40 (s, 1H), 2.36 – 2.31 (m, 1H), 2.27 – 2.15 (m, 5H), 2.00 (dd, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.92 – 1.80 (m, 3H), 1.79 – 1.62 (m, 3H), 1.53 – 1.43 (m, $J = 15.5$ Hz, 4H), 1.20 (s, 3H), 1.18 – 1.14 (m, $J = 5.8$ Hz, 4H), 1.12 – 1.09 (m, 4H), 1.07 – 1.03 (m, $J = 5.6$ Hz, 5H), 1.00 – 0.98 (m, 3H), 0.95 – 0.91 (m, $J = 6.3$ Hz, 4H), 0.86 – 0.75 (m, $J = 19.0, 9.0$ Hz, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.3, 149.7, 148.6, 144.6, 140.4, 136.3, 135.2, 132.7, 124.3, 122.3, 116.4, 104.4, 102.1, 100.8, 99.6, 94.7, 83.6, 77.4, 77.1, 76.3, 74.9, 73.7, 72.7, 72.4, 69.3, 68.6, 66.3, 64.9, 61.6, 52.1, 48.7, 48.6, 44.9, 41.7, 41.0, 36.6, 35.7, 34.6, 29.7, 27.6, 26.0, 22.1, 21.7, 21.0, 20.9, 18.4, 17.6, 14.8, 10.9, 8.7, 6.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{61}H_{92}N_8O_{15}$: 1177.67549, gemessen 1177.67436; IR $[cm^{-1}]$ 2965, 2931, 1636, 1457, 1340, 1167, 1026, 856, 804, 738; HPLC $t_{ret} = 17.7$ min (Gradient A).

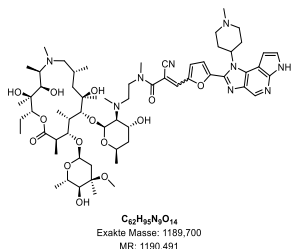
2-Cyano-N,N-dimethyl-3-(5-(1-(1-methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (15)



$C_{24}H_{25}N_7O_2$
exakte Masse: 443,207
 M_R : 443,511

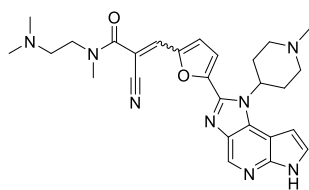
Die Synthese von **15** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 83 mg **7c** und 29 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (0,26 mmol, 1,1 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 70 mg (66 %) **15** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 195 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.05 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.60 – 7.53 (m, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.08 – 7.02 (m, $J = 3.1, 1.9$ Hz, 1H), 5.12 – 4.96 (m, 1H), 3.10 – 2.90 (m, 6H), 2.76 – 2.60 (m, $J = 24.7, 12.4, 4.1$ Hz, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.24 – 2.12 (m, $J = 10.8$ Hz, 3H), 2.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.8, 149.6, 148.4, 144.6, 140.6, 136.3, 135.3, 135.2, 132.7, 124.2, 122.1, 116.3, 116.0, 104.5, 101.9, 101.0, 54.5, 53.3, 46.2, 34.4, 29.1. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{25}N_7O_2$: 444.21425, gemessen 444.21472; IR $[cm^{-1}]$ 2938, 1647, 1602, 1559, 1374, 1137, 1027, 884, 795, 708; HPLC $t_{ret} = 14.7$ min (Gradient A).

2-Cyano-N-(2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methylamino)ethyl)-N-methyl-3-(5-(1-(1-methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (16**)**



Die Synthese von **16** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 83 mg **7c** und 204 mg **60a** (0,24 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (EtOAc → EtOAc/MeOH 6:1) aufgereinigt. Man erhält 183 mg (65 %) **16** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 159 °C (Zersetzung ab 200 °C); 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.07 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.58 – 7.55 (m, 1H), 7.45 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.09 – 7.06 (m, 1H), 5.00 (d, $J = 3.8$ Hz, 3H), 4.91 – 4.90 (m, 1H), 4.88 – 4.84 (m, 1H), 4.79 – 4.71 (m, 1H), 4.63 – 4.55 (m, $J = 17.7$ Hz, 1H), 4.10 – 4.02 (m, 2H), 3.99 – 3.93 (m, 1H), 3.76 – 3.70 (m, $J = 7.7, 3.8$ Hz, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.25 – 3.21 (m, $J = 5.2$ Hz, 4H), 3.19 – 3.12 (m, 7H), 3.05 – 2.99 (m, 3H), 2.95 – 2.87 (m, $J = 12.5, 8.8, 3.6$ Hz, 7H), 2.73 – 2.65 (m, 4H), 2.36 – 2.29 (m, 4H), 2.08 – 1.97 (m, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.88 – 1.81 (m, $J = 13.6, 7.2, 3.5$ Hz, 6H), 1.61 – 1.50 (m, 7H), 1.23 (s, 4H), 1.19 (s, 1H), 1.17 (s, 2H), 1.14 (s, 1H), 1.12 – 1.09 (m, 3H), 1.05 (d, $J = 5.4$ Hz, 4H), 1.01 – 0.98 (m, $J = 7.3$ Hz, 2H), 0.96 – 0.90 (m, $J = 6.7$ Hz, 2H), 0.88 – 0.83 (m, 4H), 0.81 – 0.75 (m, $J = 14.8, 7.4$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.4, 149.8, 148.4, 144.7, 136.3, 135.2, 132.7, 124.4, 122.2, 116.6, 104.5, 102.3, 101.2, 99.7, 94.7, 82.6, 77.5, 77.1, 75.9, 73.8, 72.9, 72.4, 69.9, 68.7, 67.1, 65.0, 62.7, 55.9, 54.3, 48.8, 45.6, 45.1, 41.7, 41.2, 40.7, 36.1, 34.6, 33.5, 32.2, 30.5, 29.7, 29.1, 28.9, 25.4, 22.0, 21.8, 21.0, 20.9, 18.5, 17.6, 14.9, 14.8, 11.0, 9.16, 8.7, 7.4. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{62}H_{95}N_9O_{14}$: 1190.70713, gemessen 1190.70519; IR [cm^{-1}] 3328, 2929, 1718, 1636, 1457, 1374, 1166, 1030, 795; HPLC $t_{ret} = 15.6$ und 16.0 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

2-Cyano-N-(2-(dimethylamino)ethyl)-N-methyl-3-(5-(1-(1-methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (17)

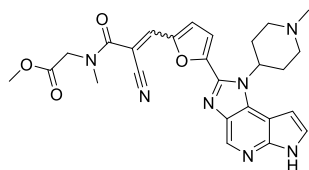


$C_{27}H_{32}N_8O_2$
exakte Masse: 500,265
 M_R : 500,607

Die Synthese von **17** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 78 mg **7c** und 38 mg **56** (0,22 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 35 mg (32 %) **17** als roten Feststoff. Smp: 250 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.17 – 11.98 (m, J = 18.4 Hz, 1H), 8.81 – 8.60 (m, 1H), 7.72 – 6.98 (m, 5H), 5.33 – 5.01 (m, J = 55.6, 17.6 Hz, 1H), 4.28 – 3.85 (m, 6H), 3.23 – 2.09 (m, 18H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 163.6, 150.1, 149.4, 145.0, 141.3, 137.2, 136.8, 135.9, 133.8, 123.4, 121.0, 116.3, 116.0, 105.3, 102.8, 102.3, 56.5, 55.2,

54.4, 46.6, 45.7, 29.8, 29.7, 29.3. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{27}H_{32}N_8O_2$: 501.27210, gemessen 501.27228; IR $[cm^{-1}]$ 2929, 2204, 1635, 1606, 1457, 1318, 1148, 1028, 856, 737; HPLC t_{ret} = 9,6 und 10,0 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B)

Methyl-N-(2-cyano-3-(5-(1-(1-methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acryloyl)-N-methylglycinat (18)

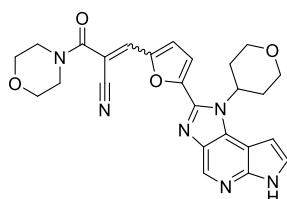


$C_{26}H_{27}N_7O_4$
exakte Masse: 501,212
 M_R : 501,547

Die Synthese von **18** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 225 mg **7c** und 110 mg **57** (0,65 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 177 mg (55 %) **18** als orangeroten Feststoff. Smp: 167 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.71 (s, 1H), 7.80 – 7.72 (m, 1H), 7.45 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.38 – 7.35 (m, 1H), 7.29 – 7.23 (m, 1H), 5.12 – 4.99 (m, 1H), 4.23 – 4.12 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.36 – 3.30 (m, 2H), 3.18 – 3.11 (m, 2H), 2.90 – 2.83 (m, J = 9.5 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.12 – 2.05 (m, J = 12.3 Hz, 2H). ^{13}C -

NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0, 160.2, 155.5, 141.2, 139.9, 135.3, 132.4, 128.7, 126.7, 126.0, 124.7, 115.1, 113.4, 108.0, 106.4, 96.3, 92.5, 46.0, 43.3, 41.3, 36.9, 29.3, 20.7, 20.5. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{27}N_7O_4$: 502.21973, gemessen 502.22012; IR $[cm^{-1}]$ 2920, 2850, 2207, 1746, 1636, 1595, 1457, 1320, 1209, 1141, 1022, 869, 741; HPLC t_{ret} = 14.4 min (Gradient A).

2-(Morpholino-4-carbonyl)-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylonitril (19)

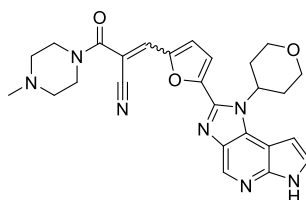


$C_{25}H_{24}N_6O_4$
exakte Masse: 472,186
 M_R : 472,505

Die Synthese von **19** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 105 mg **7b** und 49 mg N-Cyanoacetylmorpholin (0,32 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 109 mg (74 %) **19** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 270 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.12 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.60 (t, J = 3.0 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 12.8, 3.8 Hz, 2H), 6.90 – 6.88 (m, J = 3.3, 1.9 Hz, 1H), 5.48 – 5.38 (m, 1H), 3.71 – 3.58 (m, J = 20.0, 9.8 Hz, 12H), 2.70 – 2.63 (m, 2H), 2.04 – 1.97 (m, J = 12.6, 4.9 Hz, 2H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.1,

149.6, 148.8, 144.6, 140.4, 136.4, 135.7, 135.2, 132.6, 124.3, 122.8, 116.4, 116.2, 104.4, 100.9, 100.8, 66.2, 65.9, 52.1, 46.6, 29.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{25}H_{24}N_6O_4$: 473.19318, gemessen 473.19354; IR $[cm^{-1}]$ 3110, 2203, 1643, 1593, 1420, 1319, 1113, 1019, 806, 712; HPLC t_{ret} = 19.7 min (Gradient A)

2-(4-Methylpiperazin-1-carbonyl)-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylonitril (20)

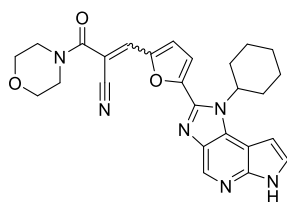


$C_{26}H_{27}N_7O_3$
exakte Masse: 485,218
 M_R : 485,548

Die Synthese von **20** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 84 mg **7c** und 43 mg **54** (0,26 mmol, 1,05 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 70 mg (58 %) **20** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 256 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.23 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 11.2, 3.6 Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 5.61 – 5.49 (m, 1H), 4.27 – 4.18 (m, 2H), 3.76 – 3.69 (m, 4H), 2.86 – 2.74 (m, 2H), 2.63 (s, 6H), 2.34 (s, 3H), 2.15 – 2.11 (m, 2H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.0, 149.7, 148.7,

144.6, 140.4, 136.3, 135.5, 135.2, 132.7, 124.3, 122.6, 116.4, 116.2, 104.4, 101.3, 100.8, 66.2, 54.2, 52.11, 45.4, 45.2, 29.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{27}N_7O_3$: 486.22481, gemessen 486.22558; IR $[cm^{-1}]$ 3124, 2941, 2792, 2198, 1636, 1420, 1262, 1148, 999, 856, 799, 711; HPLC t_{ret} = 16.4 min (Gradient A).

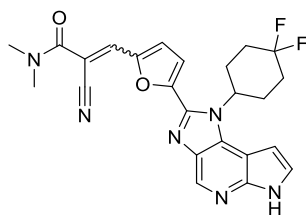
3-(5-(1-Cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(morpholin-4-carbonyl)acrylonitril (**21**)



$C_{26}H_{26}N_6O_3$
exakte Masse: 470,207
MR: 470,533

Die Synthese von **21** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 94 mg **7a** und 43 mg N-Cyanoacetylmorpholin (0,28 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 60 mg (46 %) **21** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 225 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.10 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.04 – 4.85 (m, $J = 12.0$ Hz, 1H), 3.69 – 3.57 (m, $J = 7.8$ Hz, 8H), 2.42 – 2.30 (m, $J = 10.6$ Hz, 2H), 2.07 – 1.98 (m, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.98 – 1.85 (m, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.82 – 1.47 (m, $J = 44.4, 37.2, 11.2$ Hz, 4H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.1, 149.6, 148.6, 144.7, 140.6, 136.4, 135.8, 135.2, 132.8, 124.2, 122.3, 116.5, 116.0, 104.2, 101.1, 100.5, 65.9, 56.0, 30.0, 24.9, 24.3. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{26}N_6O_3$: 471.21392, gemessen 471.21436; IR [cm^{-1}] 3142, 2919, 2852, 2206, 1636, 1388, 1249, 1112, 1023, 800, 705; HPLC $t_{ret} = 21.2$ min (Gradient A).

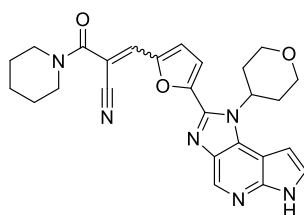
2-Cyano-3-(5-(1-(4,4-difluorocyclohexyl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N,N-dimethylacrylamid (**22**)



$C_{24}H_{22}F_2N_6O_2$
exakte Masse: 464,177
MR: 464,477

Die Synthese von **22** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 140 mg **7e** und 45 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (0,4 mmol, 1,05 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 75 mg (42 %) **22** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 263 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.97 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.27 – 7.22 (m, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.06 – 7.04 (m, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 5.29 – 5.16 (m, $J = 12.4, 6.1$ Hz, 1H), 3.10 – 2.99 (m, 2H), 2.92 – 2.81 (m, $J = 17.4$ Hz, 6H), 2.77 – 2.69 (m, $J = 12.4, 5.7$ Hz, 2H), 2.21 – 2.09 (m, $J = 15.9$ Hz, 4H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.1, 149.6, 149.6, 145.0, 140.5, 136.8, 136.5, 135.6, 133.2, 123.5, 122.1, 116.3, 115.7, 104.7, 101.8, 100.2, 100.2, 53.4, 31.8, 29.3, 26.2. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{22}F_2N_6O_2$: 465.18451, gemessen 465.18520; IR [cm^{-1}] 2919, 2207, 1642, 1597, 1558, 1372, 1158, 1094, 950, 708; HPLC $t_{ret} = 15.4$ und 17.4 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

2-(Piperidine-1-carbonyl)-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylonitril (23)

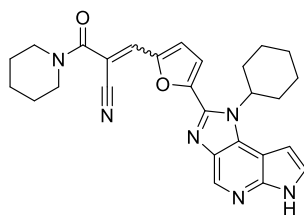


$C_{26}H_{26}N_6O_3$
exakte Masse: 470,207
 M_R : 470,533

Die Synthese von **23** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 100 mg **7b** und 45 mg 3-Oxo-3-(piperidin-1-yl)propannitril (0,3 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffs aufgereinigt. Man erhält 67 mg (48 %) **23** als gelben Feststoff. Smp: 258 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.82 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.39 (d, $J = 41.0$ Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.49 – 5.35 (m, 1H), 4.17 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.69 (t, $J = 11.9$ Hz, 2H), 3.57 (s, 4H), 2.92 – 2.79 (m, $J = 8.5$ Hz, 2H), 1.98 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 1.69 – 1.57 (m, 6H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 162.4,

150.2, 149.6, 144.9, 141.2, 136.6, 135.9, 133.9, 123.8, 121.8, 116.6, 116.1, 105.5, 103.1, 102.2, 67.2, 52.8, 30.2, 25.8, 24.4. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{26}N_6O_3$: 471.21392, gemessen 471.21473; IR [cm^{-1}] 2932, 2853, 1647, 1594, 1424, 1319, 1246, 1150, 1087, 1025, 856, 798; HPLC $t_{ret} = 20.1$ min (Gradient A).

3-(5-(1-Cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(piperidine-1-carbonyl)acrylonitril (24)

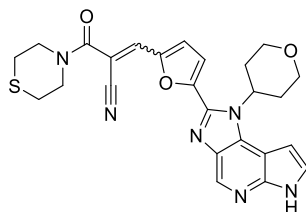


$C_{27}H_{28}N_6O_2$
exakte Masse: 468,227
 M_R : 468,561

Die Synthese von **24** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 105 mg **7a** und 45 mg 3-Oxo-3-(piperidin-1-yl)propannitril (0,32 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Aceton, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 55 mg (37 %) **24** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 158 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 12.00 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.45 – 7.36 (m, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.98 – 4.86 (m, $J = 12.1$ Hz, 1H), 3.56 (s, 4H), 2.46 – 2.39 (m, $J = 12.0$ Hz, 2H), 2.06 – 1.92 (m, 4H), 1.68 – 1.39 (m, 10H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 162.4, 150.2, 149.2,

145.0, 141.6, 137.1, 136.7, 135.8, 134.2, 123.5, 120.4, 116.3, 116.0, 105.3, 103.4, 101.3, 57.2, 53.1, 30.6, 26.1, 25.8, 24.9, 24.4. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{27}H_{28}N_6O_2$: 469.23465, gemessen 469.23521; IR [cm^{-1}] 2930, 2206, 1636, 1426, 1340, 1253, 1024, 885, 705; HPLC $t_{ret} = 21.9$ min (Gradient A).

3-(5-(1-(Tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(thiomorpholin-4-carbonyl)acrylonitril (**25**)

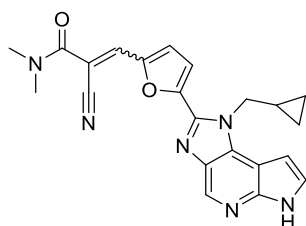


$C_{25}H_{24}N_6O_3S$
exakte Masse: 488,163
 M_R : 488,566

Die Synthese von **25** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 67 mg **7b** und 34 mg **53** (0,2 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 33 mg (34 %) **25** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 187 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.81 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.48 (d, J = 35.0 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 4.26 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 4.02 – 3.92 (m, 4H), 3.83 – 3.72 (m, J = 11.1 Hz, 2H), 3.01 – 2.87 (m, J = 8.4 Hz, 2H), 2.77 (s, 3H), 2.36 (s, 1H), 2.06 (d, J = 8.4 Hz, 2H). ^{13}C -NMR

(101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.1, 150.2, 150.0, 145.2, 140.9, 137.4, 137.1, 136.1, 133.9, 123.6, 122.5, 116.7, 116.1, 105.4, 102.3, 102.0, 67.2, 52.9, 30.2, 27.5. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{25}H_{24}N_6O_3S$: 489.17034, gemessen 489.17085; IR [cm^{-1}] 2919, 2203, 1636, 1420, 1251, 1147, 1014, 950, 800; HPLC t_{ret} = 15.1 und 16.0 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

2-Cyano-3-(5-(1-(cyclopropylmethyl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N,N-dimethylacrylamid (**26**)

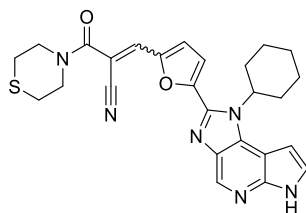


$C_{22}H_{20}N_6O_2$
exakte Masse: 400,165
 M_R : 400,442

Die Synthese von **26** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 83 mg **7d** und 30 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (0,27 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 78 mg (72 %) **26** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 211 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.62 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.42 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.85 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.34 – 2.92 (m, J = 51.1 Hz, 6H), 1.37 – 1.26 (m, J = 4.9 Hz, 1H), 0.55 – 0.25 (m, 4H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.6, 150.1, 149.6, 144.8,

141.3, 137.1, 135.9, 135.8, 135.2, 124.1, 122.2, 116.3, 115.6, 105.0, 102.2, 97.6, 50.2, 39.3, 37.0, 12.1, 3.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{20}N_6O_2$: 401.17205, gemessen 401.17250; IR [cm^{-1}] 3088, 2200, 1639, 1600, 1560, 1380, 1253, 1166, 1021, 817, 708; HPLC t_{ret} = 13.9 min (Gradient A).

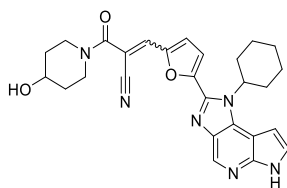
3-(5-(1-Cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(thiomorpholine-4-carbonyl)acrylonitril (**27**)



$C_{26}H_{26}N_6O_2S$
exakte Masse: 486,184
 M_R : 486,594

Die Synthese von **27** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 120 mg **7a** und 61 mg **53** (0,36 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Man erhält 80 mg (46 %) **27** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 213 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.99 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.43 (d, J = 3.5 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.81 – 6.74 (m, J = 11.4 Hz, 1H), 4.99 – 4.85 (m, J = 11.9 Hz, 1H), 3.87 – 3.70 (m, J = 14.8 Hz, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.46 (s, 1H), 2.40 – 2.30 (m, 2H), 2.02 – 1.88 (m, 4H), 1.75 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 1.63 – 1.43 (m, J = 31.3, 17.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.2, 149.5, 148.5, 144.1, 140.6, 135.7, 135.7, 135.0, 133.0, 131.5, 123.8, 121.7, 116.1, 115.6, 104.3, 101.4, 100.4, 56.0, 48.8, 29.9, 26.6, 24.9, 24.2. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{26}N_6O_2S$: 487.19107, gemessen 487.19119; IR $[cm^{-1}]$ 2920, 2200, 1647, 1560, 1388, 1251, 1180, 1024, 951, 886, 802; HPLC t_{ret} = 17.3 und 19.5 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

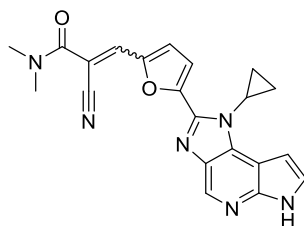
3-(5-(1-Cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(4-hydroxypiperidine-1-carbonyl)acrylonitril (**28**)



$C_{27}H_{28}N_6O_3$
exakte Masse: 484,222
 M_R : 484,560

Die Synthese von **28** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 149 mg **7a** und 75 mg **55** (0,45 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffes aufgereinigt. Das noch Produktreste enthaltende Filtrat wird aufkonzentriert, auf Kieselgel gezogen und per Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 149 mg (69 %) **28** als roten Feststoff. Smp: 190 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.10 (s, 1H), 8.77 – 8.66 (m, J = 5.8 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.05 – 4.72 (m, 2H), 3.99 – 3.72 (m, J = 35.5, 21.2 Hz, 3H), 2.53 (s, 1H), 2.44 – 2.33 (m, J = 10.3 Hz, 2H), 2.12 – 2.02 (m, 2H), 1.99 – 1.76 (m, J = 41.2, 10.1 Hz, 5H), 1.68 – 1.41 (m, J = 30.9, 16.9 Hz, 6H). ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.8, 149.6, 148.4, 144.7, 140.6, 136.4, 135.2, 135.1, 132.8, 124.2, 121.9, 116.4, 116.0, 104.2, 101.9, 100.4, 65.1, 56.1, 33.9, 30.0, 25.0, 24.3. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{27}H_{28}N_6O_3$: 485.22957, gemessen 485.22985; IR $[cm^{-1}]$ 2920, 2856, 2201, 1617, 1429, 1340, 1071, 1026, 886, 804; HPLC t_{ret} = 17.0 min (Gradient A).

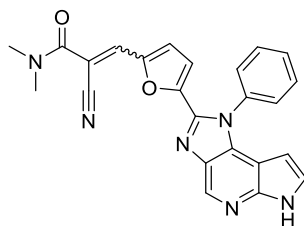
2-Cyano-3-(5-(1-cyclopropyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N,N-dimethylacrylamid (**29**)



$C_{21}H_{18}N_6O_2$
exakte Masse: 386,149
 M_R : 386,415

Die Synthese von **29** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 110 mg **7f** und 42 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (0,38 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 75 mg (52 %) **29** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 204 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.98 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.52 – 7.49 (m, 3H), 6.94 – 6.88 (m, 1H), 4.06 – 3.94 (m, 1H), 3.18 – 2.97 (m, 6H), 1.46 – 1.38 (m, 2H), 0.96 – 0.91 (m, 2H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.9, 149.4, 148.3, 144.9, 141.9, 135.9, 135.3, 135.2, 133.9, 124.1, 122.0, 116.1, 115.2, 104.5, 101.7, 98.7, 37.4, 27.4, 9.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{21}H_{18}N_6O_2$: 387.15640, gemessen 387.15668; IR $[cm^{-1}]$ 2981, 2200, 1647, 1560, 1368, 1153, 1034, 800, 709; HPLC t_{ret} = 14.0 min (Gradient A).

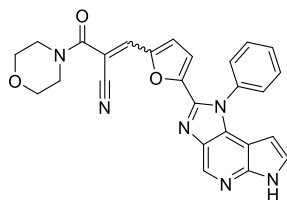
2-Cyano-N,N-dimethyl-3-(5-(1-phenyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (**30**)



$C_{24}H_{18}N_6O_2$
exakte Masse: 422,149
 M_R : 422,448

Die Synthese von **30** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 220 mg **7g** und 85 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (0,76 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Lagerung bei -20 °C und Filtration des Feststoffs aufgereinigt. Man erhält 124 mg (44 %) **30** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 210 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.97 (s, 1H), 8.79 – 8.72 (m, 1H), 7.82 – 7.63 (m, 6H), 7.57 – 7.48 (m, 1H), 7.35 – 7.27 (m, 2H), 5.65 – 5.55 (m, $J = 16.1, 3.2$ Hz, 1H), 3.34 (s, 6H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 162.6, 149.0, 147.2, 145.3, 140.4, 135.9, 135.2, 135.0, 134.0, 130.3, 130.1, 128.0, 124.3, 120.2, 115.7, 114.6, 113.6, 103.8, 102.7, 96.2, 37.4. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{18}N_6O_2$: 423.15640, gemessen 423.15676; IR $[cm^{-1}]$ 3103, 2892, 2205, 1636, 1491, 1324, 1156, 1029, 890, 690; HPLC t_{ret} = 16.5 min (Gradient A).

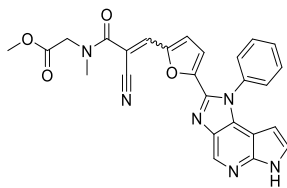
2-(Morpholino-4-carbonyl)-3-(5-(1-phenyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylonitril (**31**)



$C_{26}H_{20}N_6O_3$
exakte Masse: 464,160
 M_R : 464,485

Die Synthese von **31** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 32 mg **7g** und 16 mg N-Cyanoacetylmorpholin (0,1 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 37 mg (70 %) **31** als gelben Feststoff. Smp: 236 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.98 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.82 – 7.60 (m, 6H), 7.55 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.36 – 7.23 (m, 2H), 5.59 (d, J = 17.8, 1.8 Hz, 1H), 3.75 – 3.39 (m, 8H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 161.8, 149.0, 147.3, 145.3, 140.3, 136.2, 135.9, 135.4, 135.0, 134.0, 130.3, 130.1, 128.0, 124.3, 120.5, 114.6, 113.6, 103.8, 102.0, 96.2, 65.9, 46.5. ESI-HRMS: $[M + Na]^+$ berechnet für $C_{26}H_{20}N_6O_3$: 487.14891, gemessen 487.14961; IR [cm^{-1}] 3111, 2852, 2204, 1641, 1570, 1419, 1327, 1275, 1110, 1021, 894, 801; HPLC t_{ret} = 16.8 min (Gradient A).

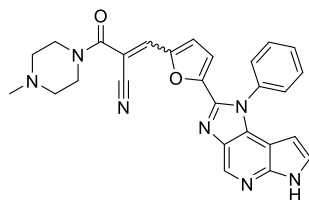
Methyl-N-(2-cyano-3-(5-(1-phenyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acryloyl)-N-methylglycinat (**32**)



$C_{26}H_{20}N_6O_4$
exakte Masse: 480,155
 M_R : 480,484

Die Synthese von **32** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 41 mg **7g** und 21 mg **57** (0,12 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 28 mg (47 %) **32** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 248 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.04 (s, 2H), 8.83 (s, 1H), 7.81 – 7.75 (m, 7H), 7.38 – 7.36 (m, 1H), 6.50 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.69 – 5.66 (m, J = 4.0, 2.2 Hz, 1H), 4.37 – 4.24 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.28 (s, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.2, 163.4, 152.3, 148.9, 145.3, 140.3, 136.2, 135.9, 135.4, 134.0, 130.1, 130.0, 128.0, 125.3, 115.4, 114.6, 112.0, 110.2, 103.8, 97.0, 96.2, 52.7, 52.0, 29.0. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{20}N_6O_4$: 481.16188, gemessen 481.16229; IR [cm^{-1}]; HPLC t_{ret} = 15.7 und 16.7 min (*E/Z*/Gemisch, Gradient A).

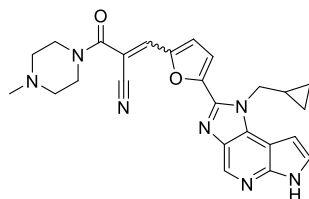
2-(4-Methylpiperazin-1-carbonyl)-3-(5-(1-phenyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylonitril (**33**)



$C_{27}H_{23}N_7O_2$
exakte Masse: 477,191
 M_R : 477,528

Die Synthese von **33** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 40 mg **7g** und 21 mg **54** (0,13 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 40 mg (70 %) **33** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 219 °C (Zersetzung); 1H -NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.98 (s, 1H), 7.99 – 7.94 (m, J = 5.0, 2.2 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.85 – 7.80 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.63 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.02 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 3.96 – 3.89 (m, 4H), 2.79 – 2.73 (m, 4H), 2.59 (s, 3H). ^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD) δ 163.3, 150.5, 148.0, 145.8, 142.1, 137.9, 137.0, 136.5, 136.2, 134.7, 131.2, 130.9, 128.6, 124.9, 120.3, 116.3, 115.9, 105.5, 103.3, 97.7, 55.0, 46.0. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{27}H_{23}N_7O_2$: 478.19860, gemessen 478.19891; IR [cm^{-1}] 3106, 2889, 1636, 1560, 1437, 1256, 1141, 890, 794; HPLC t_{ret} = 11.0 min (Gradient A).

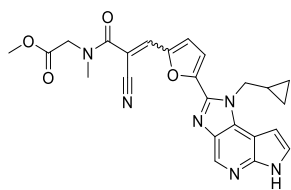
3-(5-(1-(Cyclopropylmethyl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)acrylonitril (**34**)



$C_{25}H_{25}N_7O_2$
exakte Masse: 455,207
 M_R : 455,522

Die Synthese von **34** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 80 mg **7d** und 40 mg **34** (0,24 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 91 mg (77 %) **34** als roten Feststoff. Smp: 204 °C; 1H -NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.81 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.37 – 7.26 (m, 3H), 6.73 – 6.65 (m, J = 1.5 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 3.47 – 3.21 (m, 4H), 2.31 – 2.14 (m, 4H), 1.99 (s, 3H), 0.93 – 0.89 (m, 1H), 0.25 – 0.06 (m, 4H). ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.0, 149.2, 149.2, 144.9, 140.1, 135.8, 135.3, 134.4, 134.4, 124.3, 122.9, 116.4, 115.2, 103.8, 100.8, 97.0, 54.2, 49.1, 45.5, 45.5, 12.0, 3.1. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{25}H_{25}N_7O_2$: 456.21425, gemessen 456.21429; IR [cm^{-1}] 3094, 2788, 2197, 1636, 1595, 1558, 1420, 1336, 1250, 1018, 886, 707; HPLC t_{ret} = 17.5 und 18.6 min (E/Z Gemisch, Gradient B).

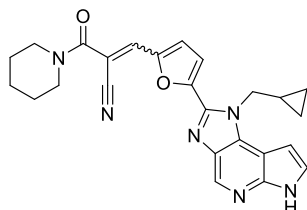
Methyl-N-(2-cyano-3-(5-(1-(cyclopropylmethyl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acryloyl)-N-methylglycinat (**35**)



$C_{24}H_{22}N_6O_4$
exakte Masse: 458,170
 M_R : 458,478

Die Synthese von **35** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 97 mg **7d** und 60 mg **57** (0,35 mmol, 1,1 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 112 mg (77 %) **35** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 164 °C; 1H -NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.03 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.60 – 7.48 (m, $J = 9.1, 6.3$ Hz, 3H), 6.95 – 6.89 (m, 1H), 4.88 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H), 4.12 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 1.03 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 0.47 – 0.33 (m, 4H). ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ 169.2, 163.7, 149.5, 149.1, 144.9, 144.8, 140.0, 135.8, 134.5, 124.3, 116.0, 115.8, 115.3, 103.8, 100.1, 97.2, 97.0, 52.7, 51.8, 49.2, 25.5, 12.0, 3.1. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{22}N_6O_4$: 459.17753, gemessen 459.17752; IR $[cm^{-1}]$ 3100, 2916, 2203, 1735, 1647, 1597, 1560, 1337, 1209, 1022, 886, 799; HPLC $t_{ret} = 15.8$ min (Gradient A).

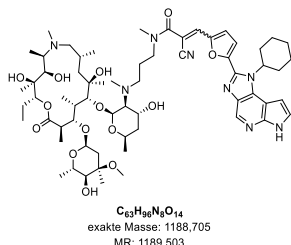
3-(5-(1-(Cyclopropylmethyl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(piperidine-1-carbonyl)acrylonitril (**36**)



$C_{25}H_{24}N_6O_2$
exakte Masse: 440,196
 M_R : 440,507

Die Synthese von **36** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 107 mg **7d** und 48 mg 3-Oxo-3-(piperidin-1-yl)propannitril (0,32 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (Cyclohexan/*i*PrOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 100 mg (71 %) **36** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 215 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 11.39 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.44 – 7.35 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.65 – 3.53 (m, $J = 18.4$ Hz, 4H), 1.64 (s, 6H), 0.86 – 0.73 (m, $J = 15.2, 8.2$ Hz, 1H), 0.49 – 0.32 (m, 4H). ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 163.0, 150.5, 150.1, 145.7, 141.6, 137.0, 137.0, 136.0, 135.7, 124.2, 122.3, 116.9, 115.8, 105.2, 103.0, 98.0, 50.6, 26.3, 25.9, 24.9, 12.5, 4.1. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{25}H_{24}N_6O_2$: 441.20335, gemessen 441.20352; IR $[cm^{-1}]$ 2921, 2849, 2200, 1629, 1594, 1560, 1420, 1337, 1225, 999, 796; HPLC $t_{ret} = 15.9$ und 18.8 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

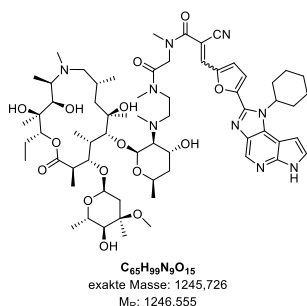
2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N-(3-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)propyl)-N-methylacrylamid (37**)**



Die Synthese von **37** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 73 mg **7a** und 211 mg **60b** (0,24 mmol, 1,1 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 129 mg (50 %) **37** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 195 °C; 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.08 (s, 1H), 8.69 – 8.67 (m, J = 2.1 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.57 – 7.53 (m, 2H), 7.47 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.01 – 4.85 (m, 4H), 4.80 – 4.73 (m, 1H), 4.60 – 4.53 (m, 1H), 4.42 – 4.17 (m, 3H), 4.11 – 4.02 (m, J = 14.9, 6.5 Hz, 2H), 3.96 – 3.60 (m, J = 74.2, 37.1, 24.6 Hz,

3H), 3.50 (s, 1H), 3.43 – 3.39 (m, 2H), 3.38 (s, 1H), 3.36 (s, 1H), 3.34 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 3.23 (t, 3H), 3.17 (s, 2H), 3.05 – 2.99 (m, 2H), 2.93 – 2.88 (m, 2H), 2.68 (s, 1H), 2.48 – 2.45 (m, 2H), 2.40 – 2.29 (m, 5H), 2.26 – 2.20 (m, J = 10.8 Hz, 2H), 2.06 – 1.99 (m, 3H), 1.96 – 1.86 (m, 6H), 1.78 – 1.69 (m, J = 10.5 Hz, 5H), 1.61 – 1.45 (m, J = 30.7, 17.5 Hz, 9H), 1.22 – 1.20 (m, 2H), 1.17 (s, 1H), 1.15 (s, 1H), 1.10 (s, 3H), 1.08 (s, 2H), 1.06 (s, 2H), 1.04 – 0.98 (m, 7H), 0.87 – 0.79 (m, 6H), 0.78 – 0.73 (m, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.5, 177.2, 149.6, 148.5, 144.7, 140.5, 136.3, 135.1, 132.8, 124.1, 121.8, 116.3, 115.9, 114.7, 104.1, 100.3, 99.61, 94.5, 77.4, 76.9, 73.5, 72.3, 65.5, 64.9, 56.1, 54.0, 48.6, 48.6, 45.7, 44.9, 41.6, 38.2, 36.9, 34.45, 30.3, 30.0, 29.0, 27.4, 25.3, 25.0, 24.3, 21.9, 21.7, 20.9, 20.8, 18.3, 17.5, 17.4, 15.1, 14.8, 10.9, 8.5. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{63}H_{96}N_8O_{14}$: 1189.71188, gemessen 1189.71202; IR $[cm^{-1}]$ 2932, 1635, 1456, 1340, 1167, 1027, 849, 730; HPLC t_{ret} = 14.9 und 15.1 min (*E/Z* Gemisch, Gradient A).

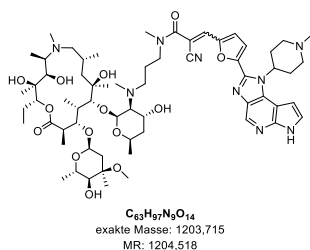
2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N-(2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)ethyl)(methyl)amino)-2-oxoethyl)-N-methylacrylamid (38)



Die Synthese von **38** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 70 mg **7a** und 195 mg **60b** (0,21 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 177 mg (68 %) **38** als gelben Feststoff. Smp: 176 °C; 1H -NMR (700 MHz, $CDCl_3$) δ 11.32 (bs, 1H), 9.07 (bs, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.40 (d, J = 21.5 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 5.07 – 4.98 (m, 2H), 4.95 – 4.88 (m, J = 21.3 Hz, 2H), 4.67 (bs, 1H), 4.34 – 4.20 (m, 2H), 4.09 – 4.03 (m, 1H), 3.95 – 3.83 (m, J = 46.4 Hz, 2H), 3.69 (bs, J = 35.1 Hz, 1H), 3.62 (s,

1H), 3.58 (bs, 1H), 3.26 (s, 6H), 3.15 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.00 – 2.91 (m, 6H), 2.66 (bs, 3H), 2.55 – 2.47 (m, J = 22.3, 12.1 Hz, 4H), 2.44 – 2.38 (m, 2H), 2.30 – 2.24 (m, 4H), 2.03 – 1.93 (m, J = 19.3, 12.6 Hz, 6H), 1.87 – 1.73 (m, 4H), 1.55 – 1.44 (m, J = 29.1, 11.9 Hz, 6H), 1.34 (s, 1H), 1.32 – 1.23 (m, J = 29.7 Hz, 9H), 1.14 – 1.09 (m, 9H), 1.02 (s, 6H), 0.89 – 0.77 (m, 10H). ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 178.8, 178.7, 167.2, 166.9, 164.3, 164.2, 150.0, 149.6, 144.8, 141.4, 138.1, 136.9, 135.8, 134.1, 123.4, 121.2, 116.4, 115.8, 105.2, 102.1, 102.0, 101.3, 100.7, 100.5, 95.1, 95.0, 85.5, 84.7, 78.2, 78.1, 77.7, 74.3, 74.1, 73.9, 73.7, 73.0, 72.8, 70.5, 70.0, 67.2, 66.6, 66.5, 65.8, 65.7, 65.0, 62.7, 62.7, 57.2, 54.7, 54.5, 50.8, 50.3, 49.4, 48.6, 46.9, 46.1, 45.5, 42.9, 42.9, 42.1, 41.9, 40.9, 38.7, 36.9, 36.8, 36.4, 34.9, 34.8, 34.1, 30.6, 29.8, 27.8, 27.0, 26.7, 25.7, 24.9, 22.3, 22.3, 21.8, 21.6, 21.3, 18.4, 18.3, 16.4, 15.2, 15.0, 11.3, 9.3, 9.1, 7.5. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{65}H_{99}N_9O_{15}$: 1246.73334, gemessen 1246.73426; IR [cm^{-1}] 2934, 1654, 1457, 1166, 1029, 1000, 898, 842; HPLC t_{ret} = 15.3 und 15.4 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B).

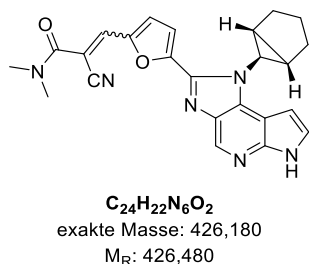
2-Cyano-N-(3-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methylamino)propyl)-N-methyl-3-(5-(1-(1-methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (39)



Die Synthese von **39** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 53 mg **7c** und 132 mg **60b** (0,15 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 145 mg (80 %) **39** als gelben Feststoff. Smp: 171 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.51 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.46 – 7.44 (m, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 7.32 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.22 – 7.18 (m, 1H), 5.05 – 4.98 (m, 2H), 4.73 – 4.69 (m, 1H), 4.47 – 4.40 (m, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.27 – 4.22 (m, 1H), 4.11 – 3.98 (m, $J = 18.3, 13.3, 6.6$ Hz, 2H), 3.72 – 3.65 (m, $J = 7.0$ Hz, 4H),

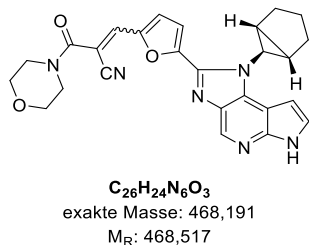
3.64 – 3.61 (m, 1H), 3.53 – 3.46 (m, 3H), 3.32 – 3.27 (m, $J = 9.0$ Hz, 4H), 3.24 – 3.19 (m, 2H), 3.11 – 3.07 (m, $J = 10.0$ Hz, 2H), 3.04 – 2.98 (m, 3H), 2.92 – 2.85 (m, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.74 – 2.67 (m, 2H), 2.48 – 2.43 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.30 – 2.27 (m, $J = 9.8$ Hz, 6H), 2.04 – 1.94 (m, $J = 16.0, 9.5$ Hz, 5H), 1.86 (dd, $J = 12.2, 7.7$ Hz, 2H), 1.67 – 1.61 (m, 1H), 1.54 – 1.41 (m, 3H), 1.32 – 1.29 (m, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.28 – 1.24 (m, 4H), 1.22 – 1.20 (m, $J = 1.9$ Hz, 3H), 1.19 – 1.18 (m, 4H), 1.18 – 1.17 (m, 2H), 1.16 – 1.14 (m, $J = 6.4$ Hz, 4H), 1.08 – 1.05 (m, 6H), 1.03 – 0.99 (m, $J = 4.3$ Hz, 3H), 0.90 – 0.80 (m, $J = 7.4$ Hz, 9H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.3, 163.3, 161.9, 150.1, 149.6, 144.9, 141.3, 137.4, 136.8, 135.9, 133.9, 123.7, 121.3, 116.4, 116.0, 105.4, 103.1, 102.3, 95.1, 84.0, 78.5, 78.2, 74.5, 74.2, 73.8, 73.1, 71.0, 70.0, 68.7, 65.6, 65.5, 62.5, 58.1, 55.2, 54.3, 51.0, 49.5, 46.6, 45.9, 45.3, 42.7, 41.9, 37.0, 36.5, 35.0, 30.4, 30.1, 29.8, 29.7, 27.5, 26.8, 25.5, 22.1, 21.7, 21.4, 18.4, 16.6, 15.1, 11.3, 9.4, 8.8, 7.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{63}H_{97}N_9O_{14}$: 1204.72278, gemessen 1204.72277; IR [cm^{-1}] 2966, 2934, 1643, 1457, 1375, 1278, 1166, 1054, 996; HPLC $t_{ret} = 17.0$ und 19.0 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B).

3-(5-(1-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-cyano-N,N-dimethylacrylamid (40)



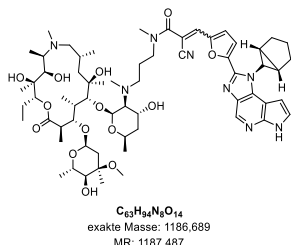
Die Synthese von **40** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 82 mg **7h** und 28 mg 2-Cyano-N,N-dimethylacetamid (0,25 mmol, 1,0 Äq.) in abs. EtOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 55 mg (52 %) **40** als orangefelben Feststoff. Smp: 139 °C; 1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.79 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.47 (bs, 1H), 7.36 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.80 – 3.76 (m, 1H), 3.34 – 3.19 (m, 3H), 3.15 – 3.00 (m, 3H), 2.21 (dd, $J = 12.6, 7.9$ Hz, 2H), 1.93 (ddd, 2H), 1.80 – 1.75 (m, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.62 – 1.49 (m, $J = 16.3, 11.5, 6.3$ Hz, 1H), 1.30 – 1.22 (m, $J = 16.3, 7.9$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.6, 150.2, 149.5, 145.3, 143.0, 137.4, 137.0, 136.0, 134.9, 123.3, 121.4, 116.3, 114.8, 105.4, 102.7, 99.5, 34.3, 29.8, 28.7, 27.9, 21.3. ESI-HRMS: $[M + Na]^+$ berechnet für $C_{24}H_{22}N_6O_2$: 449.16964, gemessen 449.16983; IR [cm^{-1}] 2923, 1646, 1568, 1393, 1329, 1155, 1031; HPLC $t_{ret} = 20.4$ min (Gradient B)

3-(5-(1-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-(morpholine-4-carbonyl)acrylonitril (41)



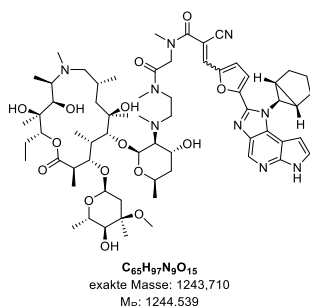
Die Synthese von **41** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 80 mg **7h** und 37 mg N-Cyanoacetylmorpholin (0,24 mmol, 1,0 Äq.) in abs. EtOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 56 mg (50 %) **41** als orangefarbenen Feststoff. Smp: 245 °C (Zersetzung); 1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.02 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 2H), 6.89 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.79 – 3.64 (m, $J = 13.5, 12.1$ Hz, 9H), 2.15 (dd, $J = 12.2, 8.2$ Hz, 2H), 1.87 (ddd, $J = 19.6, 9.8$ Hz, 2H), 1.72 (bs, 2H), 1.57 – 1.45 (m, $J = 19.1, 10.9$ Hz, 1H), 1.30 – 1.16 (m, 1H). ^{13}C NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 162.9, 150.1, 149.3, 144.6, 142.9, 137.7, 136.2, 136.0, 134.3, 123.6, 122.0, 116.2, 115.1, 105.5, 101.7, 99.2, 66.6, 34.2, 28.5, 27.8, 21.2. ESI-HRMS: $[M + Na]^+$ berechnet für $C_{26}H_{24}N_6O_3$: 491.18021, gemessen 491.18064; IR [cm^{-1}] 2917, 1636, 1570, 1497, 1420, 1320, 1244, 1112, 840, 804; HPLC $t_{ret} = 20.2$ min (Gradient B)

3-(5-(1-(Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-cyano-N-(3-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)propyl)-N-methylacrylamid (42)



Die Synthese von **42** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 57 mg **7h** und 150 mg **60b** (0,17 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 122 mg (61 %) **42** als gelben Feststoff. Smp: 198 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 11.42 (bs, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.32 (d, $J = 17.6$ Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 5.03 – 4.96 (m, 2H), 4.72 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.35 – 4.28 (m, 1H), 4.14 – 4.01 (m, 2H), 3.98 – 3.91 (m, 1H), 3.75 – 3.59 (m, 4H), 3.45 (dd, $J = 13.9, 6.9$ Hz, 4H), 3.33 – 3.26 (m, 4H), 3.24 – 3.19 (m, 2H), 3.08 – 2.98 (m, 3H), 2.70 (bs, 3H), 2.58 – 2.47 (m, $J = 16.5$ Hz, 4H), 2.33 – 2.26 (m, $J = 12.8$ Hz, 5H), 2.21 – 2.15 (m, 2H), 1.92 – 1.80 (m, 8H), 1.78 – 1.72 (m, 4H), 1.50 (d, $J = 11.4$ Hz, 3H), 1.35 – 1.29 (m, $J = 16.0$ Hz, 7H), 1.20 – 1.15 (m, 12H), 1.09 – 1.05 (m, 7H), 0.91 – 0.82 (m, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, CDCl_3) δ 178.5, 163.4, 150.2, 149.4, 149.3, 145.1, 142.8, 137.0, 136.5, 135.9, 134.7, 123.7, 116.3, 114.8, 105.4, 102.9, 100.5, 99.1, 95.2, 85.6, 78.2, 74.4, 73.8, 73.0, 71.1, 70.0, 68.8, 66.4, 65.9, 65.8, 63.5, 62.5, 54.6, 49.5, 49.4, 45.5, 43.1, 41.9, 40.4, 37.2, 36.5, 35.0, 34.3, 29.7, 28.6, 27.8, 27.8, 27.6, 26.9, 26.8, 22.2, 22.1, 21.7, 21.6, 21.3, 18.4, 16.5, 15.3, 15.2, 11.3, 11.2, 9.4, 7.6. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{63}H_{94}N_8O_{14}$: 1187.69623, gemessen 1187.69593. IR $[\text{cm}^{-1}]$ 2928, 1635, 1457, 1374, 1328, 1165, 1030, 998, 796, 729; HPLC $t_{\text{ret}} = 18.0$ und 18.8 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B).

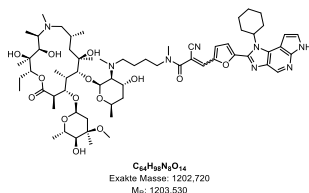
3-(5-(1-((1R,5S,6r)-Bicyclo[3.1.0]hexan-6-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-2-cyano-N-(2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methylamino)ethyl)(methylamino)-2-oxoethyl)-N-methylacrylamid (43**)**



Die Synthese von **43** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 98 mg **7h** und 274 mg **63** (0,29 mmol, 1,0 Äq.) in abs. EtOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 191 mg (53 %) **43** als gelben Feststoff. Smp: 182 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.34 (bs, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.33 – 7.23 (m, 2H), 6.90 (s, 1H), 5.08 – 4.96 (m, 2H), 4.73 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.36 – 4.24 (m, J = 31.2 Hz, 2H), 4.11 (s, 1H), 4.03 – 3.93 (m, 2H), 3.76 (s, 1H), 3.69 – 3.62 (m, J = 20.9 Hz, 2H), 3.46 (dd, J = 13.4, 6.4 Hz, 4H), 3.32 (s, 6H),

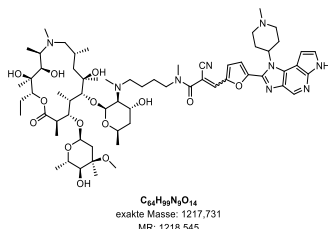
3.26 – 3.18 (m, 2H), 3.06 – 2.96 (m, 6H), 2.79 – 2.68 (m, 3H), 2.62 – 2.53 (m, 4H), 2.37 – 2.29 (m, J = 15.7 Hz, 4H), 2.21 – 2.14 (m, 2H), 1.92 – 1.83 (m, J = 8.3 Hz, 4H), 1.72 (s, 3H), 1.63 – 1.41 (m, 6H), 1.38 – 1.30 (m, J = 18.7 Hz, 8H), 1.21 – 1.19 (m, J = 1.8 Hz, 2H), 1.19 – 1.16 (m, J = 6.0 Hz, 9H), 1.11 – 1.06 (m, 6H), 0.96 – 0.83 (m, 10H). ^{13}C -NMR (176 MHz, $CDCl_3$) δ 178.84, 178.7, 167.3, 167.1, 164.3, 164.2, 145.0, 149.3, 144.9, 142.8, 142.7, 137.7, 136.3, 135.9, 134.5, 123.7, 121.7, 116.1, 114.8, 105.4, 101.7, 101.6, 100.6, 100.4, 99.1, 95.0, 94.9, 85.1, 84.4, 78.2, 78.1, 77.9, 77.5, 74.3, 73.9, 73.7, 73.6, 72.9, 72.7, 70.4, 69.8, 66.5, 66.4, 65.9, 65.7, 64.9, 62.9, 62.8, 62.6, 54.8, 54.5, 50.7, 50.3, 49.4, 48.5, 46.8, 45.9, 45.6, 42.7, 42.3, 42.2, 42.0, 40.9, 38.7, 36.9, 36.8, 36.3, 35.2, 34.8, 34.7, 34.2, 34.1, 29.7, 28.5, 27.7, 26.6, 22.3, 22.2, 21.8, 21.6, 21.3, 21.2, 18.3, 18.3, 16.4, 15.0, 14.9, 11.2, 9.0, 8.8, 7.4. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{65}H_{97}N_9O_{15}$: 1244.71769, gemessen 1244.71656; IR [cm^{-1}] 2961, 1636, 1457, 1374, 1167, 1029, 842, 803; HPLC t_{ret} = 16.3 min (Gradient B).

2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N-(4-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methyl)amino)butyl)-N-methylacrylamid (44**)**



Die Synthese von **44** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 37 mg **7a** und 98 mg **60c** (0,11 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 130 mg (97 %) **44** als gelben Feststoff. Smp: 172 °C (Zersetzung); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 11.55 (bs, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.51 – 7.41 (m, 2H), 7.29 – 7.23 (m, 1H), 6.89 – 6.82 (m, 1H), 5.04 – 4.92 (m, $J = 21.6$ Hz, 3H), 4.73 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.17 – 4.09 (m, 1H), 4.03 – 3.91 (m, $J = 30.5$ Hz, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.59 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.48 – 3.39 (m, $J = 12.2, 7.8$ Hz, 3H), 3.25 (d, $J = 29.6$ Hz, 4H), 3.06 – 2.98 (m, $J = 10.7$ Hz, 3H), 2.85 – 2.66 (m, $J = 22.3$ Hz, 6H), 2.64 – 2.61 (m, 1H), 2.55 – 2.44 (m, 6H), 2.29 (s, 4H), 2.03 (s, 6H), 1.91 – 1.82 (m, $J = 15.6$ Hz, 4H), 1.63 (s, 3H), 1.55 – 1.43 (m, $J = 22.5$ Hz, 8H), 1.36 – 1.29 (m, 7H), 1.18 – 1.12 (m, 11H), 1.07 (s, 6H), 0.93 – 0.81 (m, $J = 21.2, 11.7$ Hz, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 178.6, 163.2, 150.1, 149.3, 144.9, 141.4, 137.3, 136.8, 135.8, 134.1, 123.6, 120.6, 116.2, 115.9, 105.2, 103.2, 101.1, 100.6, 95.2, 85.4, 78.4, 78.1, 77.4, 74.4, 73.9, 73.0, 70.6, 70.1, 66.3, 65.8, 65.7, 62.5, 57.2, 56.9, 50.4, 49.4, 45.6, 43.0, 41.9, 40.5, 38.7, 37.0, 36.4, 34.9, 30.9, 30.7, 27.8, 26.7, 25.8, 25.6, 24.9, 22.2, 21.7, 21.6, 21.2, 18.4, 16.6, 15.3, 11.2, 9.4, 7.5. ESI-HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{64}\text{H}_{98}\text{N}_8\text{O}_{14}$: 1203.72753, gemessen 1203.72736; IR $[\text{cm}^{-1}]$ 2934, 1456, 1429, 1340, 1167, 1024, 1001, 798, 724; HPLC $t_{\text{ret}} = 19.8$ min (Gradient B)

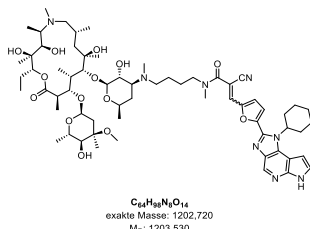
2-Cyano-N-(4-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methylamino)butyl)-N-methyl-3-(5-(1-(1-methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (45)



Die Synthese von **45** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 40 mg **7c** und 101 mg **60c** (0,11 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 110 mg (79 %) **45** als orangefelben Feststoff. Smp: 177 °C (Zersetzung); 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.54 (bs, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.43 (d, $J = 27.9$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 5.03 (d, $J = 18.7$ Hz, 3H), 4.75 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.34 (s, 1H), 4.18 – 4.12 (m, 1H), 4.06 – 3.94 (m, $J = 31.5$ Hz, 2H), 3.72 – 3.60 (m, $J = 28.4$ Hz, 2H), 3.50 – 3.44

(m, $J = 6.7$ Hz, 3H), 3.36 – 3.21 (m, $J = 31.6$ Hz, 4H), 3.06 (s, 3H), 2.89 – 2.65 (m, $J = 57.9, 25.8$ Hz, 8H), 2.54 (s, 4H), 2.40 – 2.21 (m, 8H), 2.08 – 1.82 (m, $J = 42.7$ Hz, 10H), 1.66 (s, 3H), 1.57 – 1.41 (m, 6H), 1.35 (d, $J = 11.5$ Hz, 7H), 1.22 – 1.15 (m, 11H), 1.11 – 1.06 (m, 6H), 0.96 – 0.80 (m, 9H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.7, 163.3, 150.2, 149.4, 144.9, 141.3, 137.2, 136.8, 135.9, 133.9, 123.6, 120.9, 116.3, 116.0, 105.4, 103.1, 102.2, 100.6, 95.1, 85.4, 78.1, 77.4, 74.4, 73.9, 73.0, 70.7, 70.1, 66.3, 65.9, 65.8, 62.5, 56.9, 55.4, 54.6, 49.4, 46.7, 45.6, 43.0, 42.0, 40.5, 37.0, 36.4, 34.9, 30.4, 30.2, 29.9, 29.7, 27.8, 26.8, 25.6, 22.2, 21.8, 21.6, 21.3, 18.3, 16.6, 15.3, 15.2, 11.2, 9.4, 7.5. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{64}H_{100}N_9O_{14}$: 1218.73843, gemessen 1218.73942; IR [cm^{-1}] 2936, 1636, 1457, 1374, 1320, 1116, 1025, 843, 793; HPLC $t_{ret} = 14.7$ und 14.9 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B)

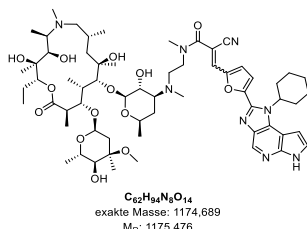
2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N-(4-(((2S,3R,4S,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-3-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)(methyl)amino)butyl)-N-methylacrylamid (46**)**



Die Synthese von **46** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 43 mg **7a** und 114 mg **60e** (0,13 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 105 mg (69 %) **46** als gelben Feststoff. Smp: 169 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.74 (bs, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 2H), 7.29 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 6.88 – 6.81 (m, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.02 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.99 – 4.85 (m, 2H), 4.76 – 4.71 (m, 1H), 4.46 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.13 – 4.01 (m, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.67 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H),

3.53 – 3.48 (m, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.45 (dd, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.28 – 3.22 (m, 2H), 3.07 – 2.99 (m, $J = 17.5, 7.8$ Hz, 2H), 2.81 – 2.67 (m, 2H), 2.64 – 2.57 (m, $J = 12.4, 6.4$ Hz, 1H), 2.53 – 2.43 (m, $J = 10.6$ Hz, 4H), 2.38 – 2.33 (m, 2H), 2.31 (s, 4H), 2.24 (s, 3H), 2.07 – 1.96 (m, $J = 14.3, 8.5$ Hz, 7H), 1.91 – 1.79 (m, 3H), 1.69 – 1.40 (m, 11H), 1.33 (s, 3H), 1.30 (d, $J = 5.9$ Hz, 4H), 1.22 – 1.16 (m, $J = 13.7, 6.7$ Hz, 11H), 1.10 – 1.04 (m, 9H), 0.90 – 0.83 (m, 6H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.4, 163.2, 150.1, 149.4, 144.8, 141.3, 137.6, 136.7, 135.8, 134.1, 123.5, 120.7, 116.2, 115.9, 105.1, 103.0, 102.9, 101.1, 95.1, 83.9, 78.5, 78.2, 77.6, 77.4, 74.5, 73.8, 73.0, 70.9, 70.0, 68.8, 65.9, 65.9, 65.6, 62.2, 57.1, 52.8, 49.5, 45.1, 42.6, 41.7, 37.0, 36.4, 34.9, 30.6, 29.9, 27.6, 26.8, 25.7, 25.5, 24.9, 22.0, 21.6, 21.4, 21.3, 18.4, 16.5, 15.3, 15.2, 11.3, 9.3, 7.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{64}H_{98}N_8O_{14}$: 1203.72753, gemessen 1203.72690; IR $[cm^{-1}]$ 2931, 1636, 1457, 1374, 1341, 1166, 1026, 898, 797; HPLC $t_{ret} = 20.4$ und 20.6 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B)

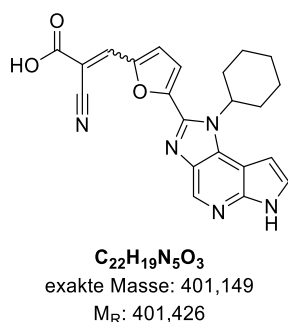
2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N-(2-(((2S,3R,4S,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-3-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)(methylamino)ethyl)-N-methylacrylamid (47)



Die Synthese von **47** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 62 mg **7a** und 160 mg **60d** (0,19 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 153 mg (70 %) **47** als gelben Feststoff. Smp: 182 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.87 (bs, 1H), 8.85 – 8.79 (m, J = 4.6 Hz, 1H), 7.72 (bs, J = 28.4 Hz, 1H), 7.51 – 7.41 (m, J = 21.6 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.05 – 4.93 (m, 2H), 4.74 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.44 (s, 1H), 4.28 (s, 1H), 4.15 – 4.02 (m, 1H), 3.78 – 3.62 (m, J = 27.3 Hz, 3H), 3.58 – 3.50 (m, 2H), 3.48 – 3.41 (m, 2H),

3.37 – 3.22 (m, 7H), 3.08 – 2.97 (m, 2H), 2.85 (bs, 1H), 2.79 – 2.66 (m, 3H), 2.60 – 2.41 (m, 6H), 2.38 – 2.26 (m, 6H), 2.10 – 1.95 (m, J = 6.9 Hz, 7H), 1.90 – 1.77 (m, 3H), 1.70 – 1.44 (m, J = 39.7 Hz, 7H), 1.31 (d, J = 13.7 Hz, 6H), 1.22 – 1.16 (m, 11H), 1.10 – 1.01 (m, J = 14.4 Hz, 9H), 0.91 – 0.82 (m, 6H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.2, 163.5, 150.1, 149.5, 144.9, 141.3, 137.5, 136.8, 135.8, 134.1, 123.5, 120.7, 116.2, 116.0, 105.1, 103.2, 102.7, 101.0, 95.2, 84.3, 78.7, 78.2, 77.6, 77.4, 74.5, 73.8, 73.0, 71.5, 70.0, 68.6, 65.8, 65.7, 62.2, 57.1, 49.5, 45.2, 42.6, 41.6, 37.4, 36.4, 35.0, 30.8, 30.6, 27.5, 26.8, 25.7, 24.9, 22.0, 21.6, 21.3, 18.4, 16.5, 15.3, 15.1, 11.2, 9.5, 7.6. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{62}H_{95}N_8O_{14}$: 1175.69623, gemessen 1175.69618; IR $[cm^{-1}]$ 2965, 2932, 1636, 1457, 1374, 1340, 1166, 1053, 998, 797, 728; HPLC t_{ret} = 19.8 und 20.4 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B)

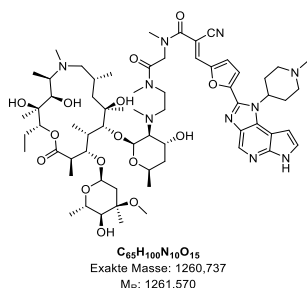
2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylsäure (48)



Die Synthese von **48** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 100 mg **7a** und 25,4 mg Cyanessigsäure (0,3 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 83 mg (69 %) **48** als gelben Feststoff. Smp: 162 °C (Zersetzung); 1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.81 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.36 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 6.81 – 6.73 (m, 1H), 4.97 – 4.86 (m, J = 12.1 Hz, 1H), 3.19 (s, 1H), 2.40 (dd, J = 23.0, 11.1 Hz, 2H), 2.05 – 1.90 (m, 4H), 1.78 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 1.51 (td, J = 25.2,

12.3 Hz, 3H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, DMSO) δ 164.1, 149.6, 146.7, 143.9, 140.1, 135.4, 134.2, 133.2, 132.2, 122.4, 117.2, 116.9, 114.5, 107.9, 103.4, 99.3, 55.6, 44.3, 29.3, 24.4. ESI-HRMS: $[M - H]^-$ berechnet für $C_{22}H_{18}N_5O_3$: 400.14151, gemessen 400.14072; IR $[cm^{-1}]$ 2932, 2850, 1615, 1339, 1295, 1052, 868, 736; HPLC t_{ret} = 22,0 min (Gradient B)

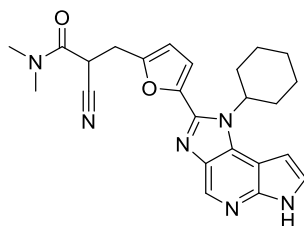
/(E)-2-Cyano-N-(2-((2-(((2S,3S,4R,6R)-2-(((2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-(((2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-15-oxo-1-oxa-6-azacyclopentadecan-11-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-3-yl)(methylamino)ethyl)(methylamino)-2-oxoethyl)-N-methyl-3-(5-(1-(1-methylpiperidin-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)acrylamid (49)



Die Synthese von **49** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **G** aus 47 mg **7c** und 125 mg **63** (0,134 mmol, 1,0 Äq.) in MeOH. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (EtOAc/MeOH, automatischer Gradient) aufgereinigt. Man erhält 77 mg (46 %) **49** als gelben Feststoff. Smp: 169 °C (Zersetzung); 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.33 (bs, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.45 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 5.04 – 4.94 (m, $J = 10.9$ Hz, 3H), 4.73 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.33 – 4.19 (m, 2H), 4.13 – 4.05 (m, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 1H), 4.01 – 3.89 (m, 2H), 3.66 (s, 1H), 3.63 – 3.59 (m, $J = 5.8$ Hz, 1H),

3.44 (q, $J = 7.0$ Hz, 3H), 3.35 – 3.26 (m, 5H), 3.10 – 2.95 (m, 10H), 2.84 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.76 – 2.66 (m, $J = 4.4$ Hz, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.49 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.30 (s, 4H), 2.25 – 2.17 (m, 2H), 2.03 – 1.96 (m, $J = 10.6$ Hz, 3H), 1.93 – 1.85 (m, $J = 17.8, 10.6$ Hz, 2H), 1.82 – 1.75 (m, 3H), 1.65 – 1.58 (m, 2H), 1.55 – 1.46 (m, $J = 15.1, 4.7$ Hz, 2H), 1.36 – 1.28 (m, 7H), 1.19 – 1.14 (m, $J = 8.2, 5.7$ Hz, 11H), 1.11 – 1.05 (m, $J = 10.8$ Hz, 6H), 0.93 – 0.82 (m, 9H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 178.6, 167.2, 166.8, 150.1, 144.8, 141.3, 137.8, 136.7, 135.9, 134.0, 123.7, 116.4, 105.5, 102.3, 100.8, 100.6, 95.4, 95.2, 85.3, 78.2, 78.1, 77.6, 77.4, 74.7, 74.5, 73.8, 73.7, 72.9, 70.5, 70.2, 66.6, 66.4, 65.9, 65.1, 62.5, 55.4, 54.6, 49.4, 46.7, 45.5, 45.3, 43.1, 41.8, 41.6, 41.0, 36.5, 35.0, 34.2, 29.9, 27.8, 27.0, 26.8, 23.7, 23.1, 22.3, 21.8, 21.6, 21.2, 18.4, 16.6, 15.3, 11.2, 9.5, 9.4, 7.7. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{65}H_{101}N_{10}O_{15}$: 1261.74424, gemessen 1261.74296; IR $[cm^{-1}]$ 2930, 1636, 1457, 1374, 1341, 1166, 1027, 997, 795; HPLC $t_{ret} = 15.8$ und 17.3 min (*E/Z* Gemisch, Gradient B)

2-Cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)-N,N-dimethylpropanamid (50)

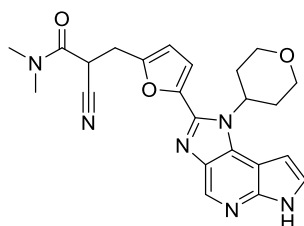


$C_{24}H_{26}N_6O_2$
exakte Masse: 430,212
 M_R : 430,512

Die Synthese von **50** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **H** aus 100 mg **FM-381**. Nach extraktiver Aufarbeitung ist keine weitere Aufreinigung nötig. Man erhält 89 mg (89 %) **50** als gelben Feststoff. Smp: 117 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.93 (s, 1H), 8.94 – 8.83 (m, 1H), 7.49 (s, 1H), 6.87 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H), 6.51 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.83 (t, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.10 (dd, $J = 8.0, 6.9$ Hz, 1H), 3.45 (qd, $J = 15.3, 7.6$ Hz, 2H), 3.12 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.58 – 2.44 (m, $J = 9.5$ Hz, 2H), 2.12 – 1.97 (m, $J = 13.0$ Hz, 4H), 1.89 (s, 1H), 1.61 – 1.47 (m, $J = 7.0$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.2, 152.2, 145.1, 144.6, 143.1, 136.7,

135.5, 133.8, 123.3, 116.3, 113.8, 110.7, 105.2, 100.9, 57.1, 37.6, 36.6, 34.2, 30.9, 28.7, 25.90, 25.04. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{26}N_6O_2$: 431.21900, gefunden 431.21942; IR $[cm^{-1}]$ 2929, 2854, 1654, 1497, 1388, 1340, 1186, 1019, 882, 794, 718; HPLC $t_{ret} = 16.4$ min (Gradient A).

2-Cyano-N,N-dimethyl-3-(5-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)propanamid (51)

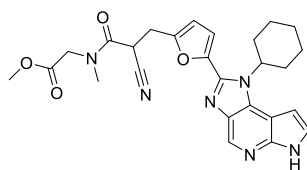


$C_{23}H_{24}N_6O_3$
exakte Masse: 432,191
 M_R : 432,484

Die Synthese von **51** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **H** aus 50 mg **8**. Nach extraktiver Aufarbeitung ist keine weitere Aufreinigung nötig. Man erhält 50 mg (quant.) **51** als beigen Feststoff. Smp: 228 °C; 1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 12.01 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.02 – 6.92 (m, $J = 9.3, 3.1$ Hz, 2H), 6.50 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.22 – 5.12 (m, 1H), 4.25 (dd, $J = 11.7, 4.6$ Hz, 2H), 4.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.66 (td, $J = 11.6, 6.0$ Hz, 2H), 3.44 – 3.40 (m, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.12 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 2.94 – 2.76 (m, 2H), 2.00 – 1.88 (m, 2H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.1, 152.3, 145.2, 144.7, 142.6, 136.7,

135.4, 133.6, 123.6, 116.4, 114.1, 110.9, 105.2, 100.9, 67.4, 53.4, 37.6, 36.7, 34.4, 30.9, 30.6, 28.6. ESI-HRMS: $[M + Na]^+$ berechnet für $C_{23}H_{24}N_6NaO_3$: 455.18021, gemessen 455.18105; IR $[cm^{-1}]$ 2964, 2932, 1636, 1396, 1320, 1163, 1123, 1055, 997, 806; HPLC $t_{ret} = 17.0$ min (Gradient B)

Methyl-N-(2-cyano-3-(5-(1-cyclohexyl-1,6-dihydroimidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)furan-2-yl)propanoyl)-N-methylglycinat (52)



$C_{26}H_{28}N_6O_4$
exakte Masse: 488,217
 M_R : 488,548

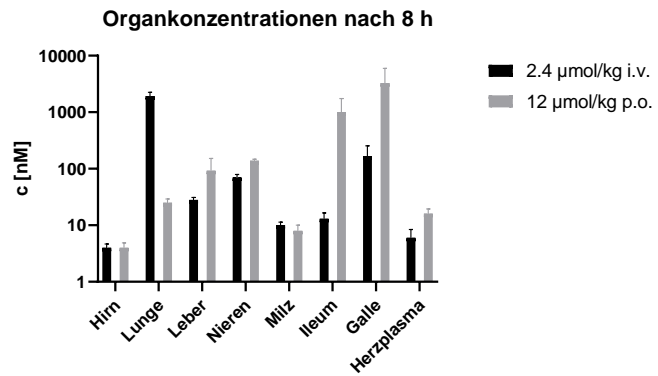
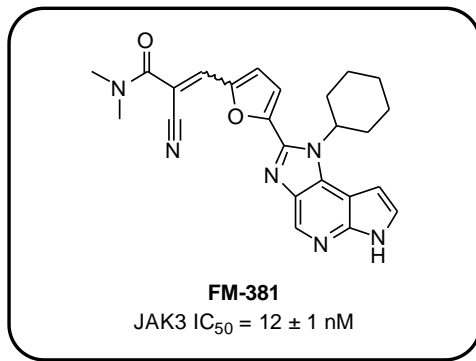
Die Synthese von **52** erfolgt gemäß allgemeiner Synthesevorschrift **H** aus 72 mg **9**. Nach extraktiver Aufarbeitung ist keine weitere Aufreinigung nötig. Man erhält 34 mg (47 %) **52** als blassgelben Feststoff. Smp: 159 °C (Zersetzung); 1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.46 (bs, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.50 – 7.43 (m, 1H), 6.84 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 6.54 – 6.49 (m, 1H), 4.84 – 4.78 (m, $J = 13.7$ Hz, 1H), 4.22 – 4.13 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 3.49 – 3.43 (m, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.47 (s, 2H), 2.06 – 1.99 (m, 4H), 1.91 – 1.85 (m, 1H), 1.58 – 1.49 (m, 3H). ^{13}C -NMR: (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.8, 164.3, 151.9, 145.0, 144.7, 143.1, 136.9,

135.6, 133.8, 123.2, 115.9, 113.9, 110.8, 105.2, 101.1, 70.7, 57.1, 52.5, 50.4, 37.1, 34.3, 30.9, 29.8, 28.6, 25.9, 25.1. ESI-HRMS: $[M + H]^+$ berechnet für $C_{26}H_{29}N_6O_4$: 489.22448, gemessen 489.22470; IR $[cm^{-1}]$ 2919, 2854, 1653, 1388, 1320, 1186, 1018, 797, 716; HPLC $t_{ret} = 21.9$ min (Gradient B)

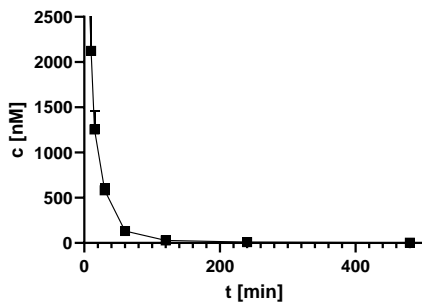
7 Anhänge

7.1 Liste der Testverbindungen nach Serie

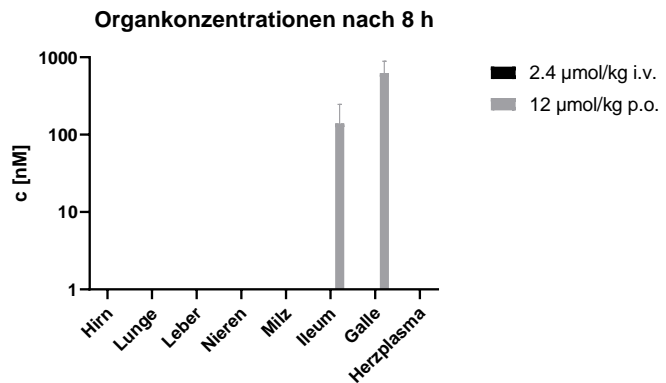
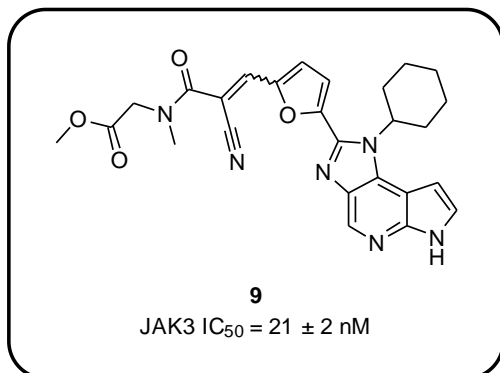
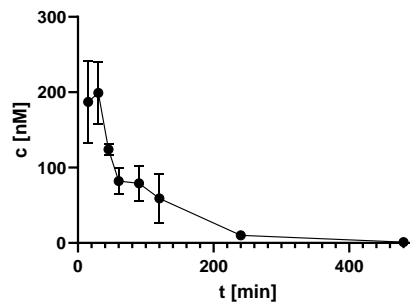
Anmerkung: Bei einigen der PK-Studien wurden in den i.v. behandelten Gruppen keine Gallenproben entnommen. Stoffe, bei denen dies zutrifft, sind mit „Galle*“ gekennzeichnet.



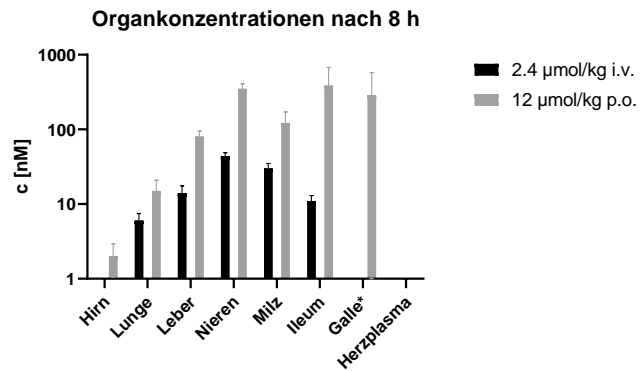
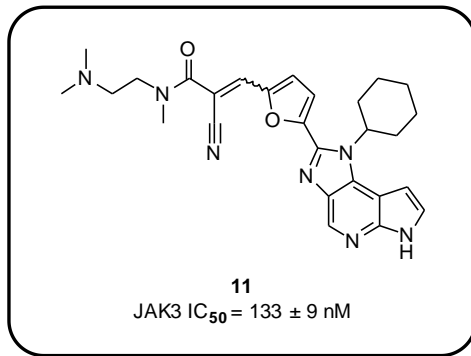
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



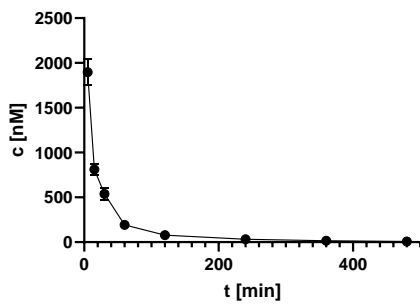
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.



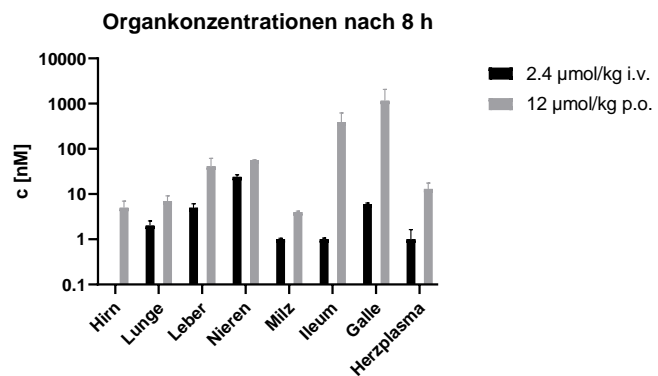
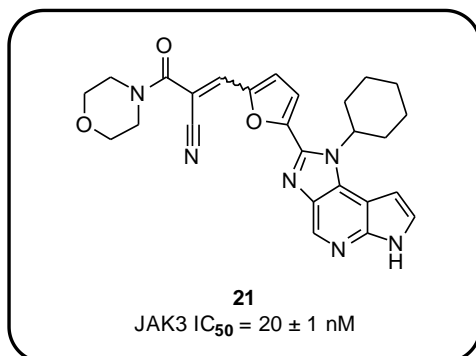
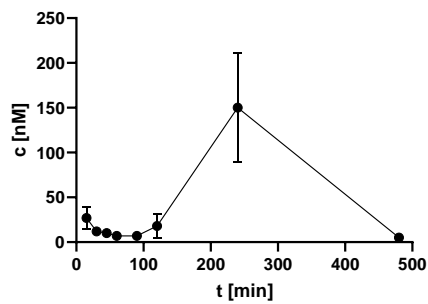
Plasmakonzentrationen der unveränderten Substanz lagen sowohl nach i.v. als auch nach p.o. Behandlung unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze



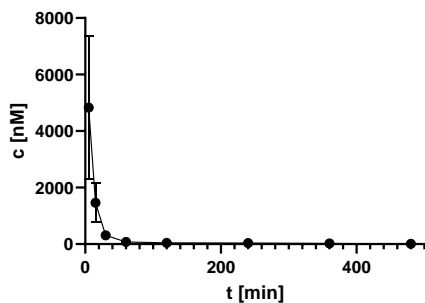
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



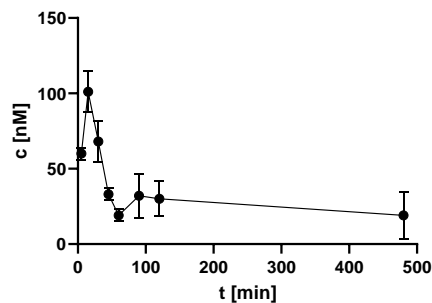
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

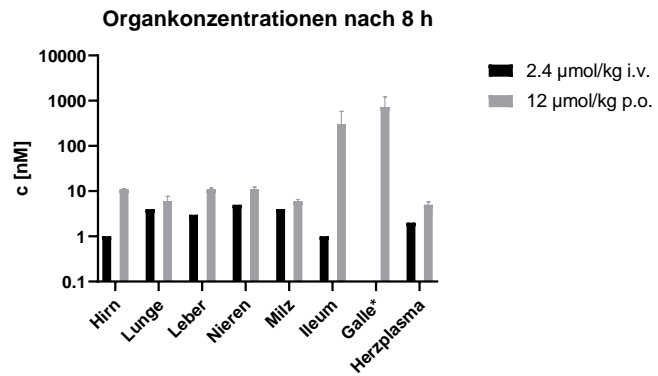
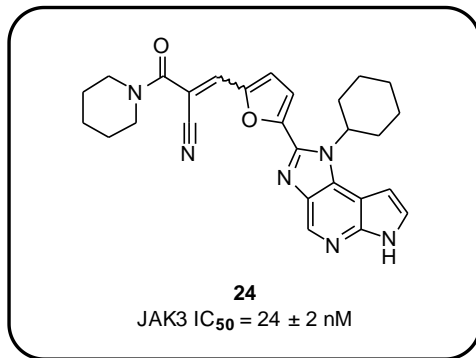


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

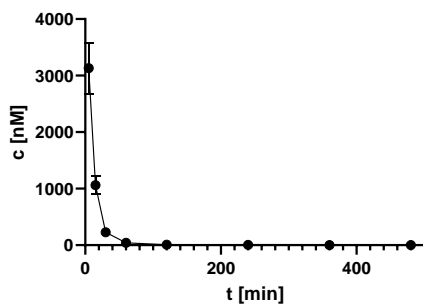


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

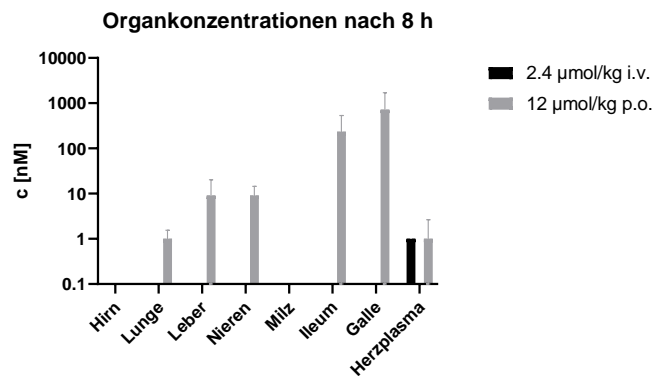
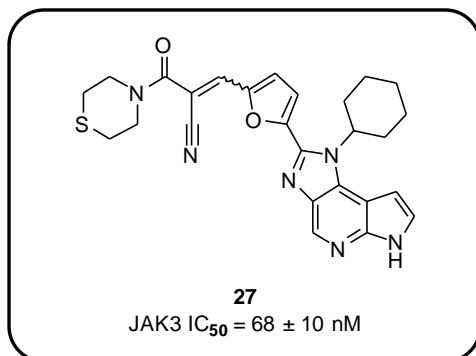
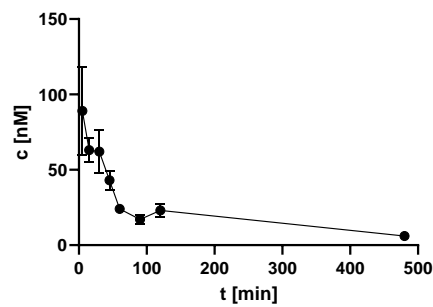




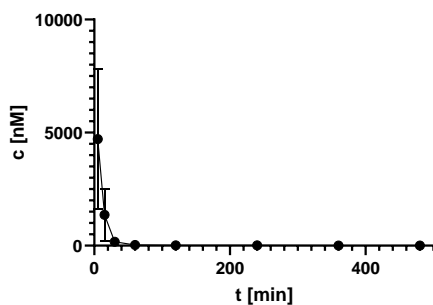
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



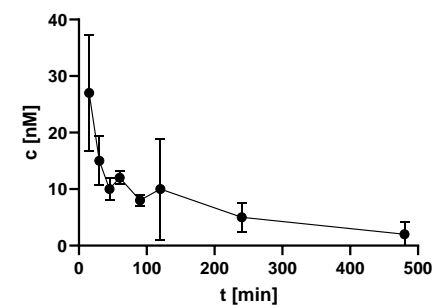
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

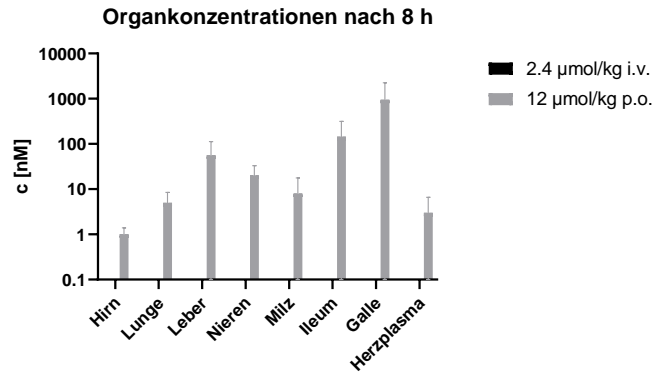
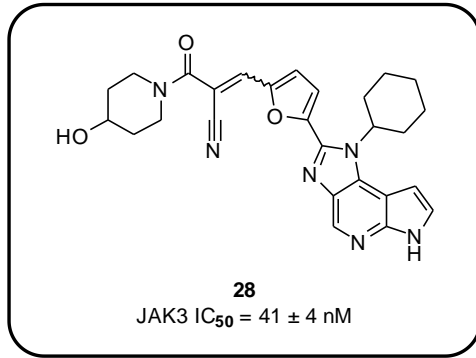


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

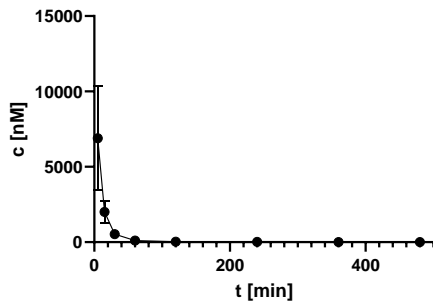


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

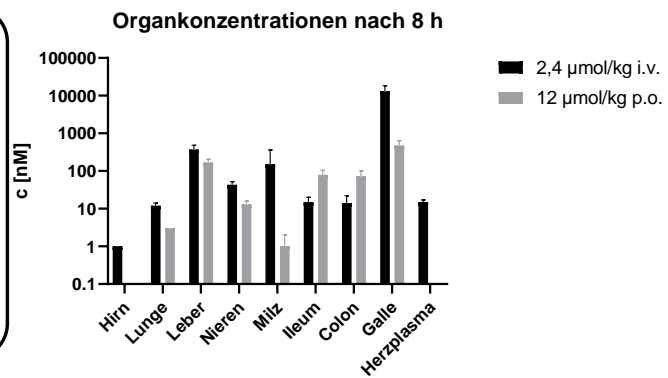
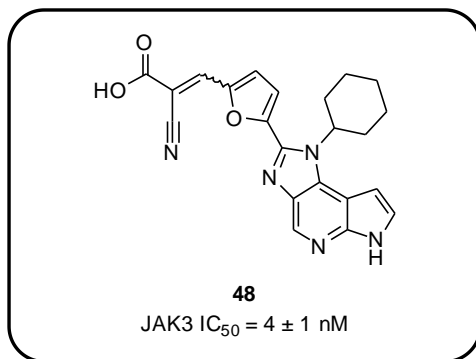
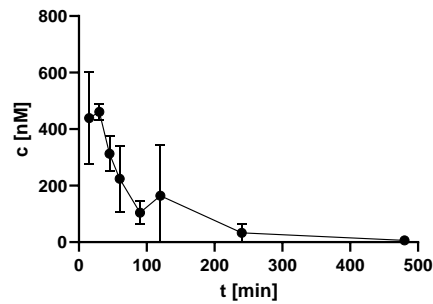




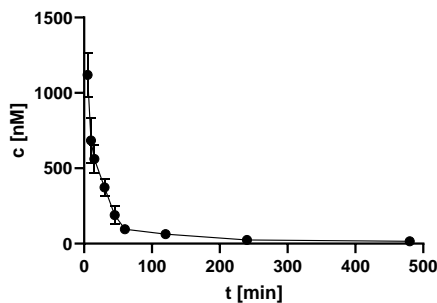
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



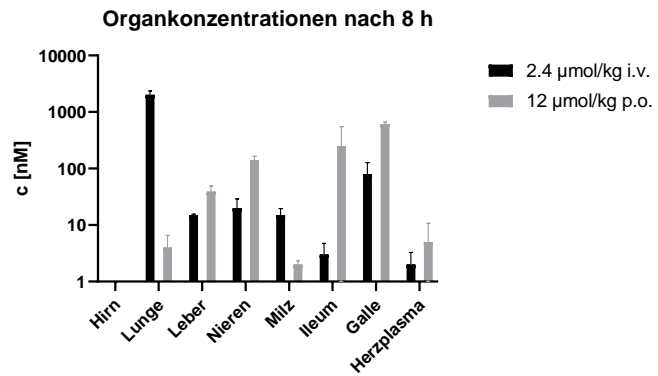
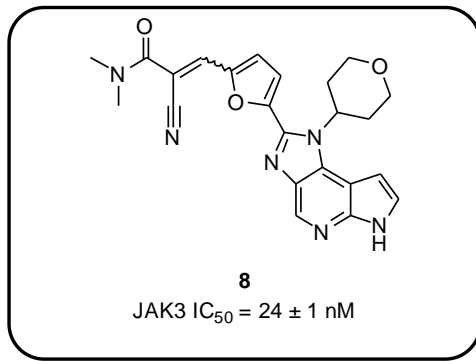
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.



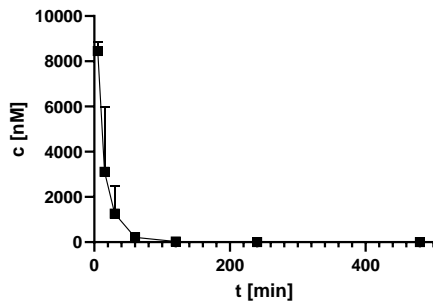
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



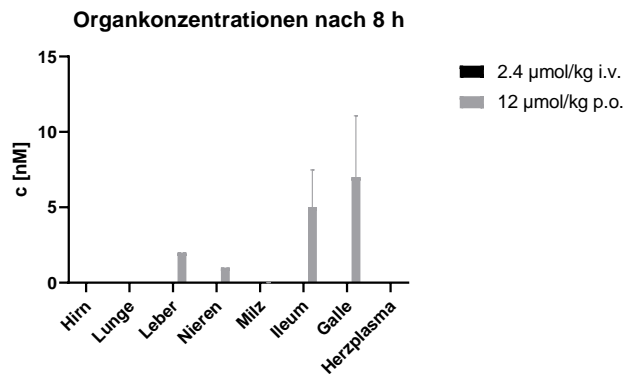
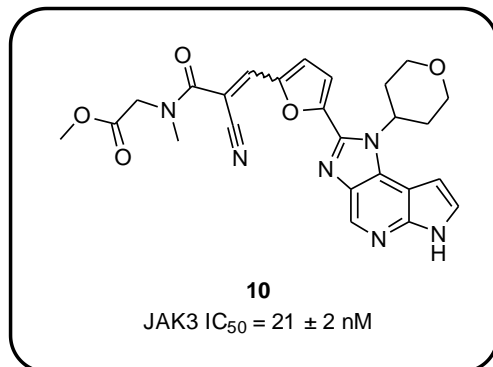
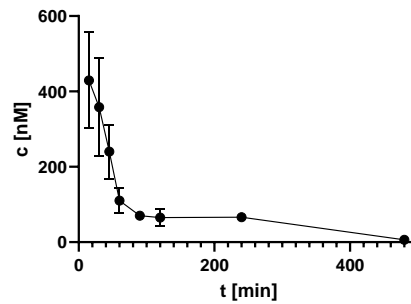
Plasmakonzentrationen der unveränderten Substanz lagen nach p.o. Behandlung unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze



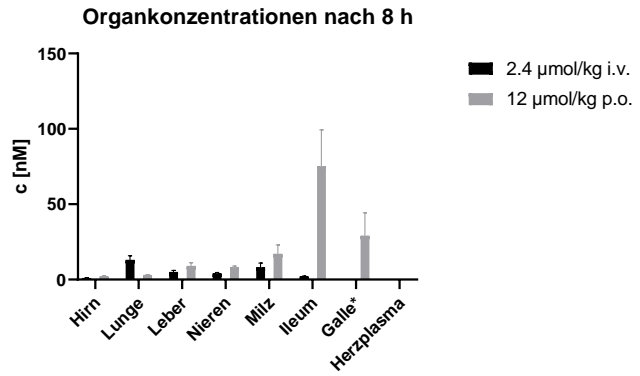
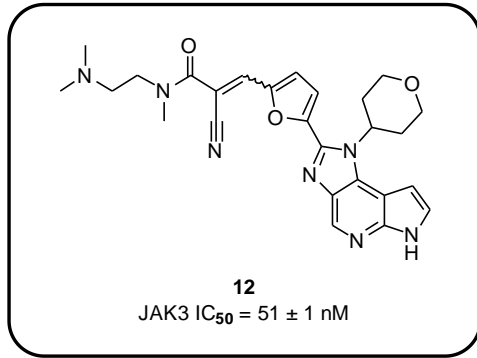
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



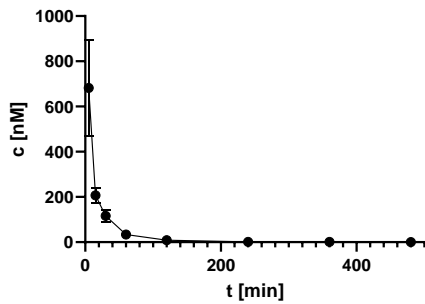
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.



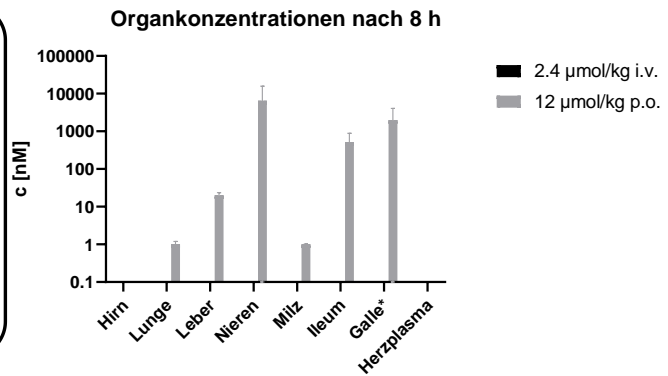
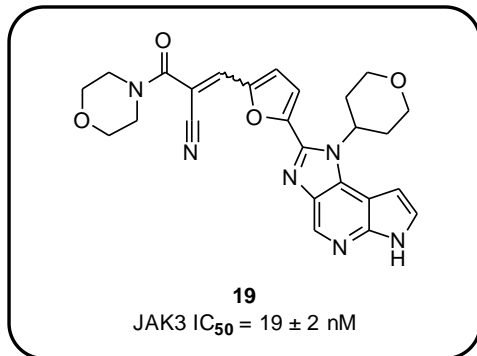
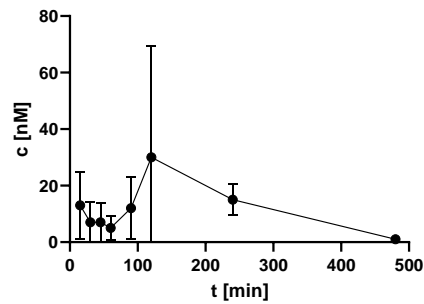
Plasmakonzentrationen der unveränderten Substanz lagen sowohl nach i.v. als auch nach p.o. Behandlung unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze



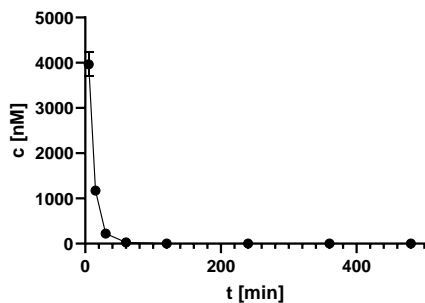
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



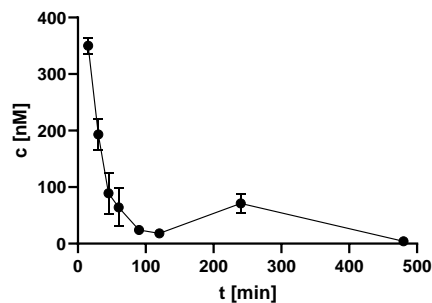
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

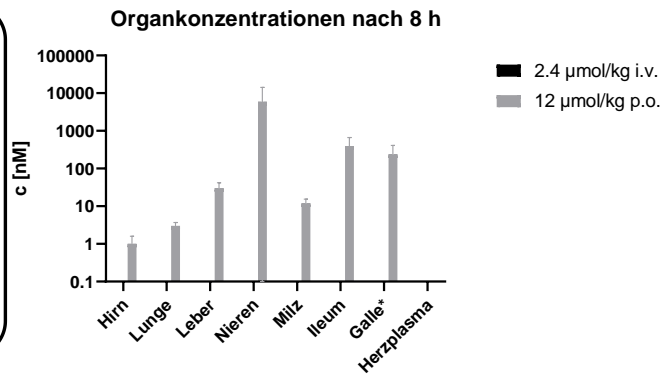
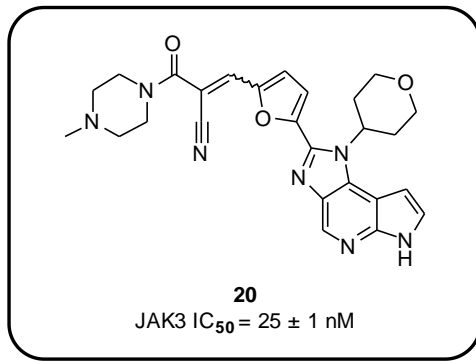


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

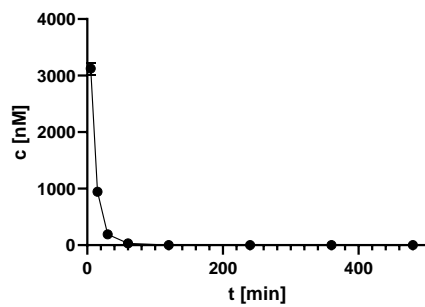


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

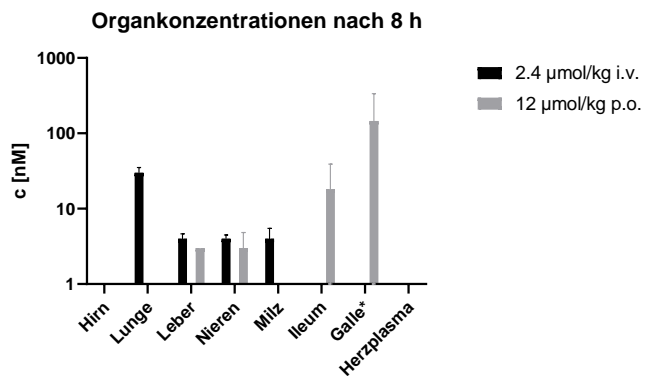
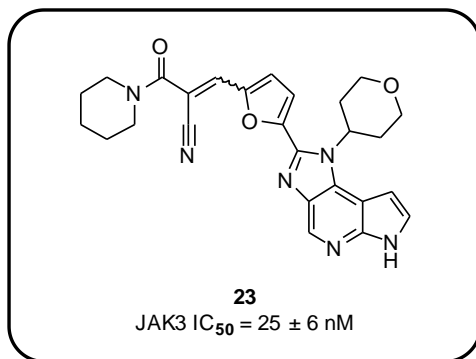
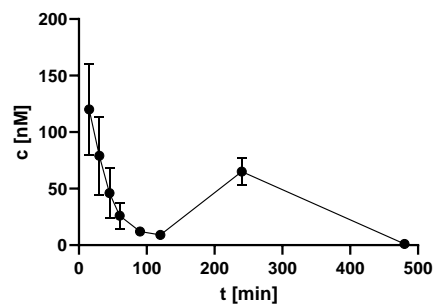




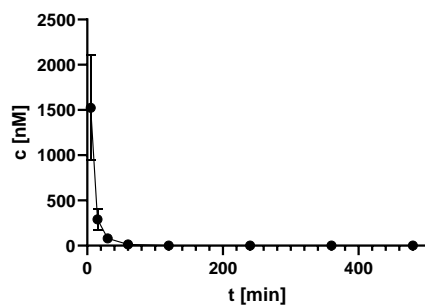
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



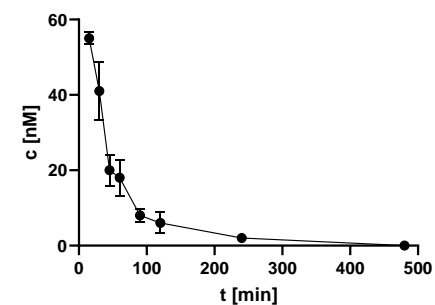
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

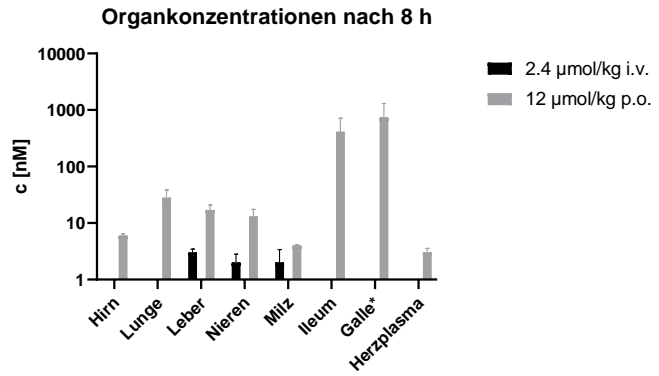
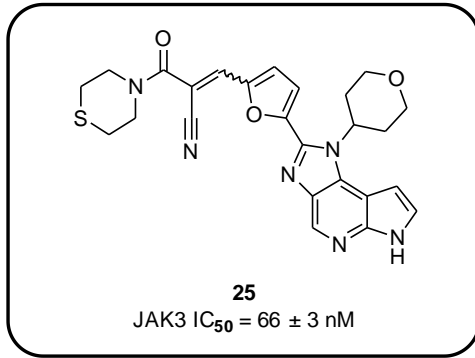


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

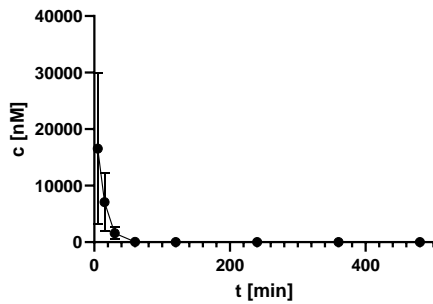


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

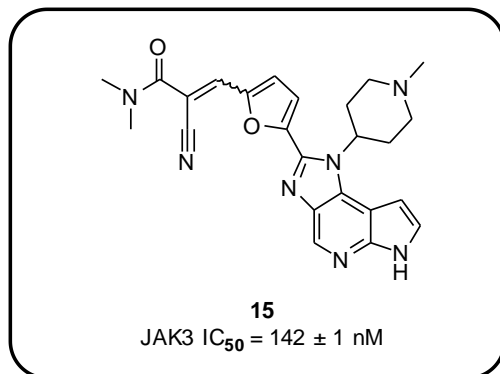
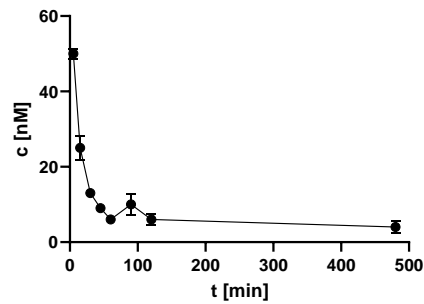




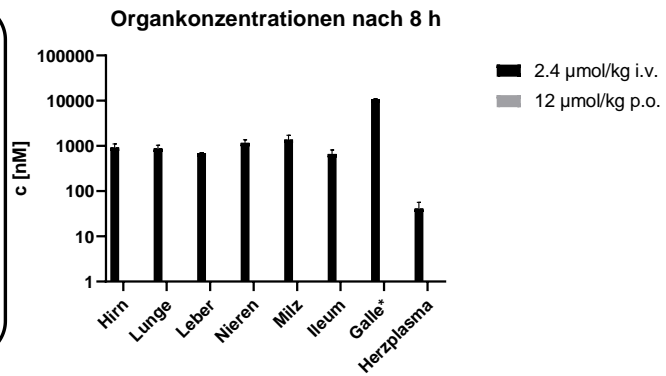
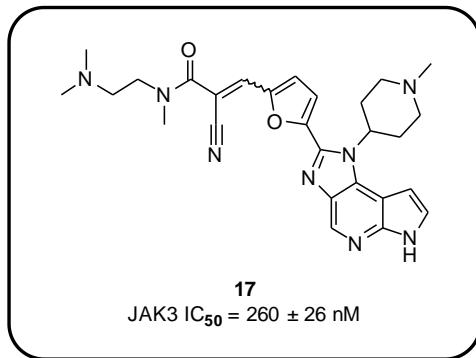
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



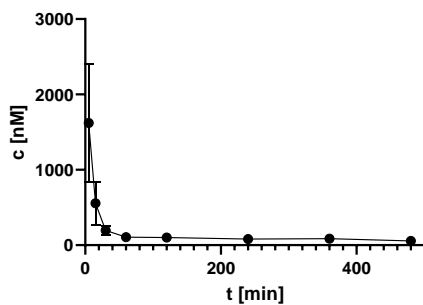
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.



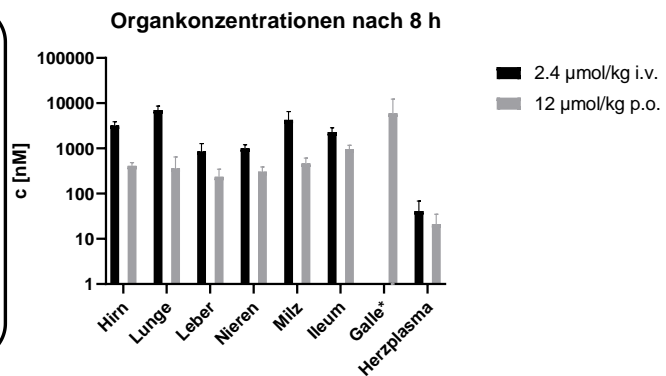
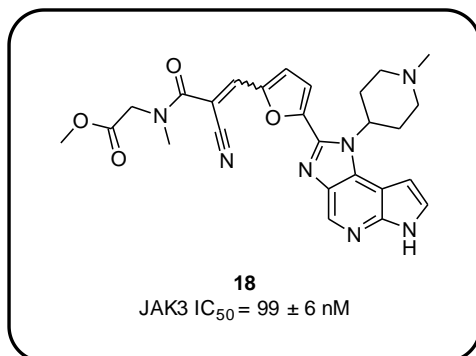
Plasma- und Organkonzentrationen der unveränderten Substanz lagen sowohl nach i.v. als auch nach p.o. Behandlung unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze



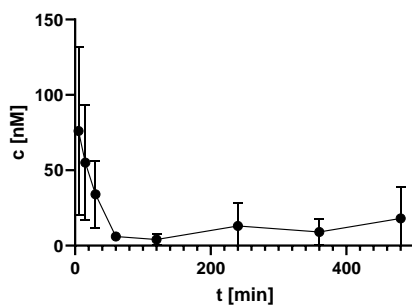
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



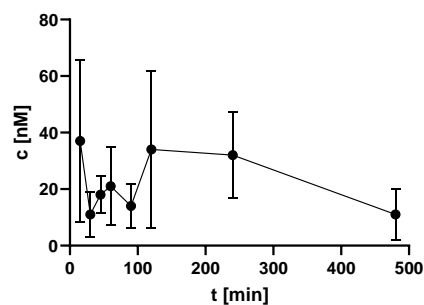
Plasma- und Organkonzentrationen der unveränderten Substanz lagen nach p.o. Behandlung unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze

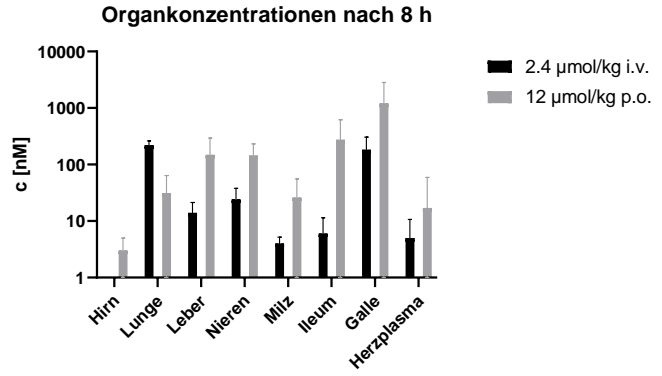
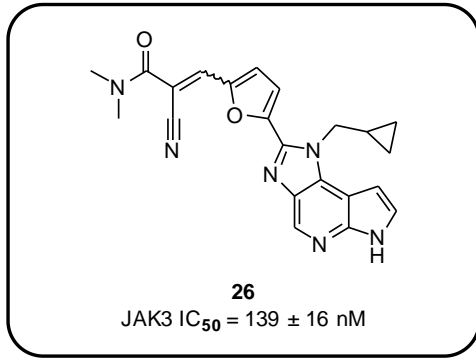


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

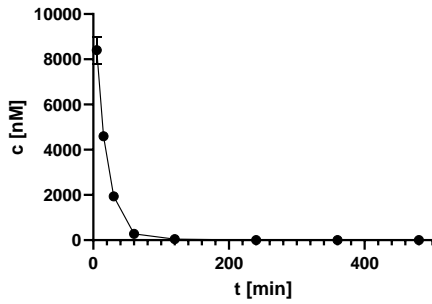


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

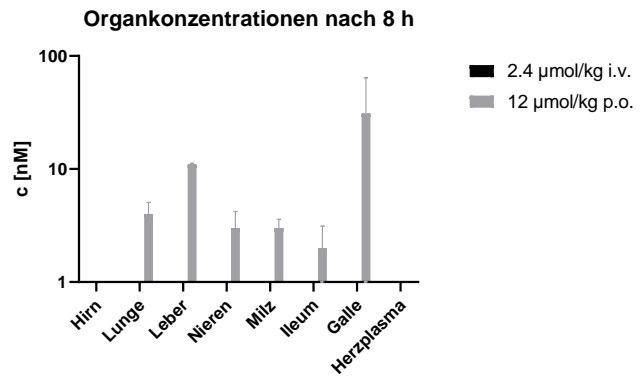
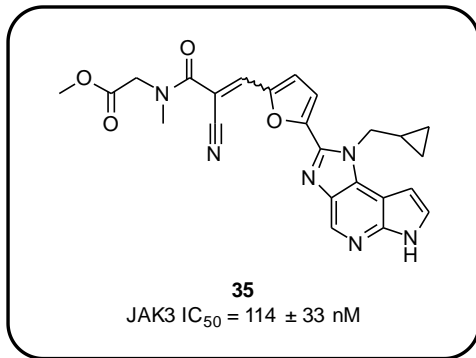
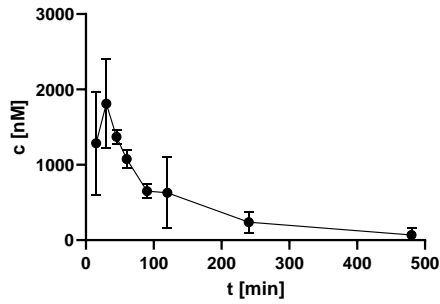




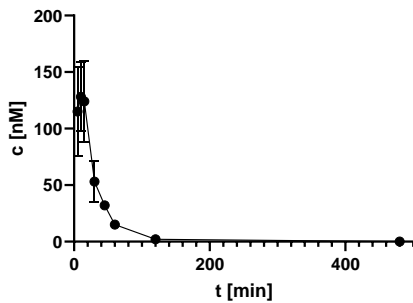
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



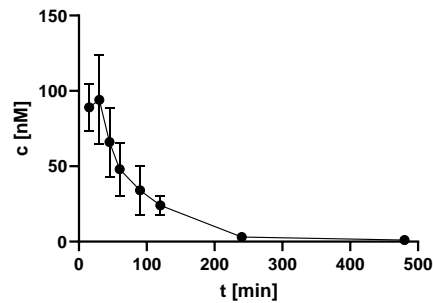
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

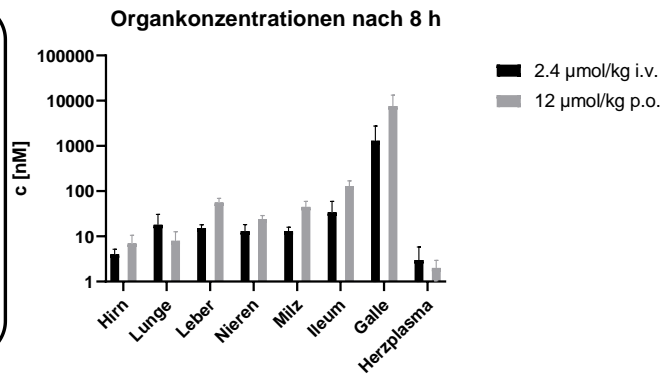
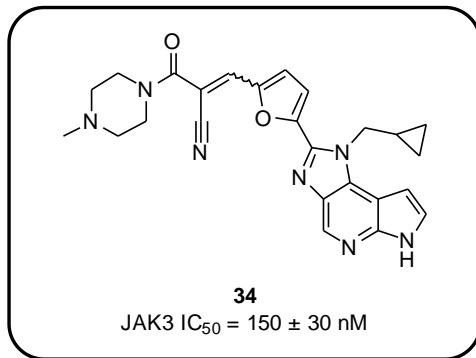


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

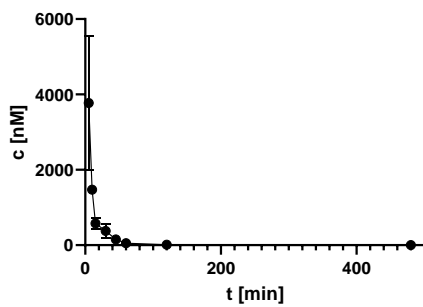


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

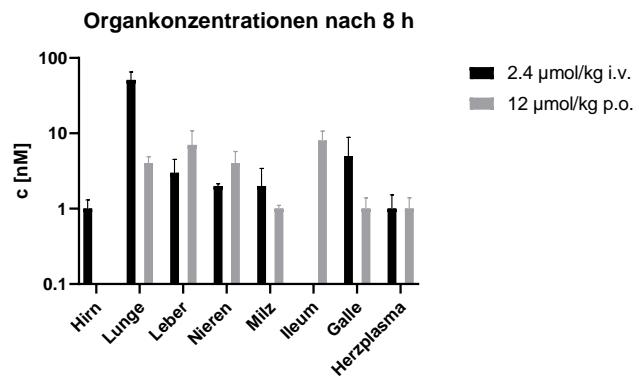
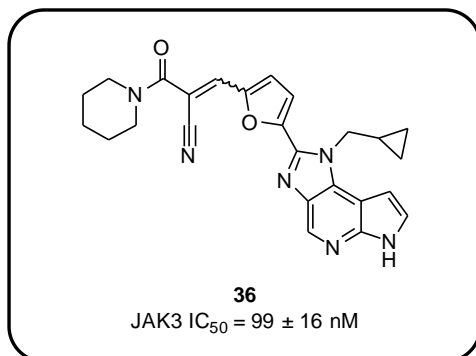
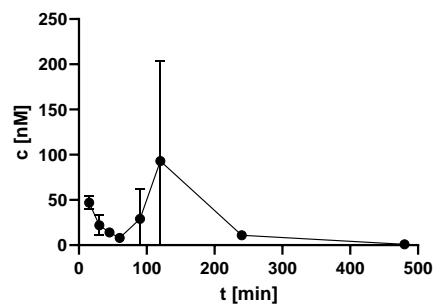




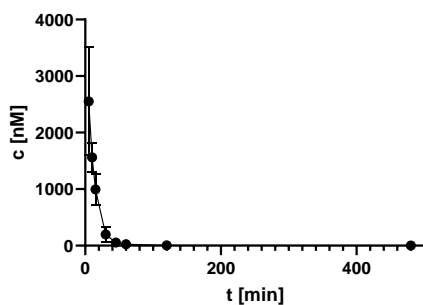
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



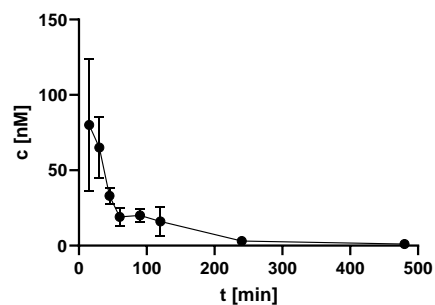
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

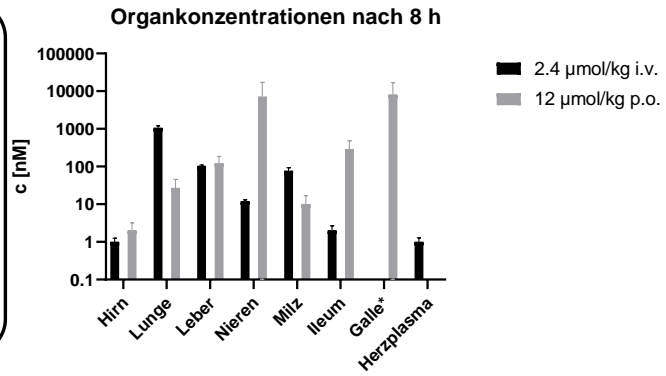
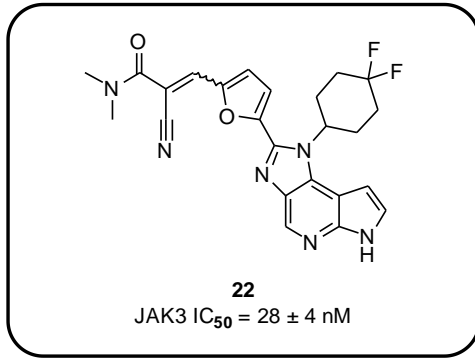


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

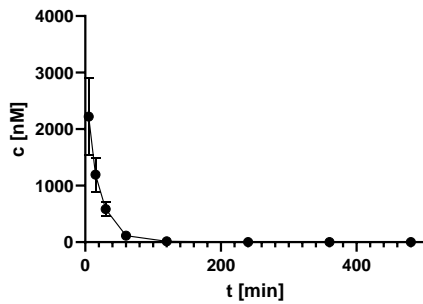


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

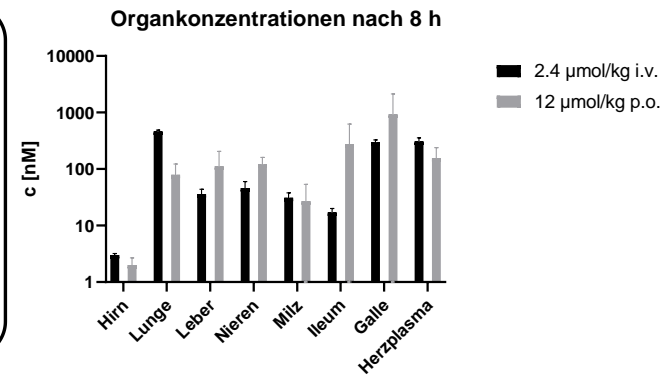
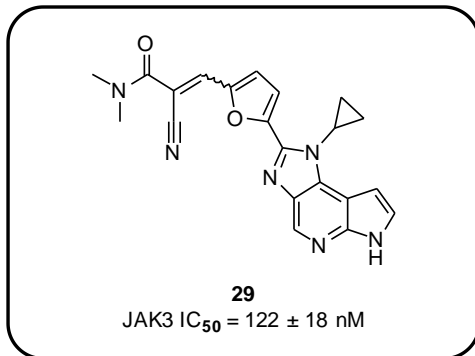
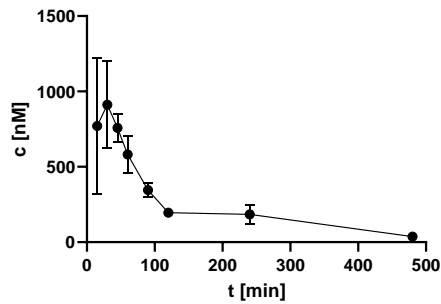




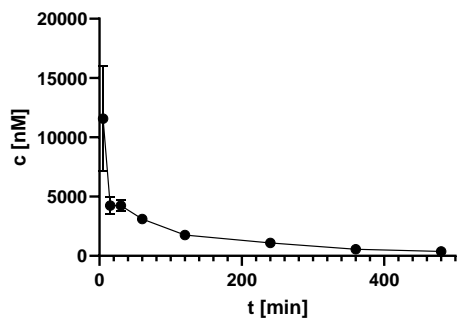
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



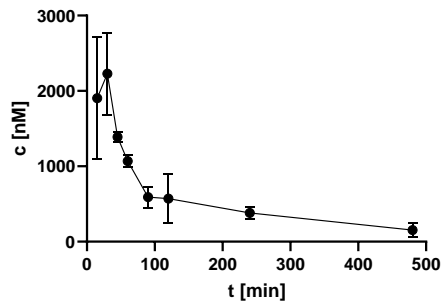
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

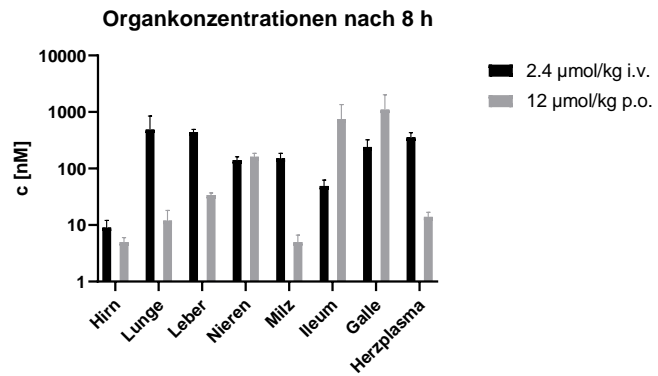
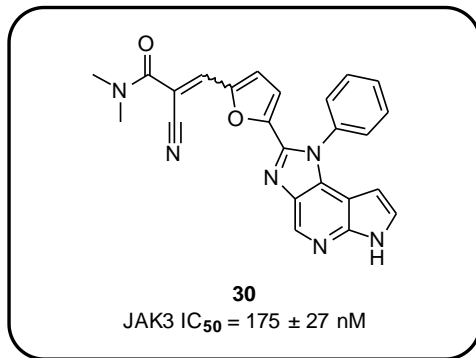


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

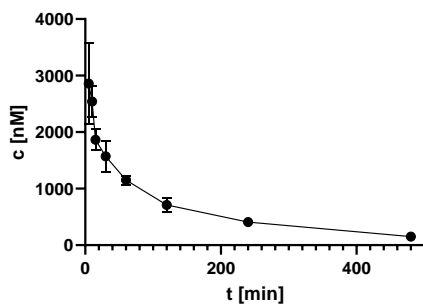


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

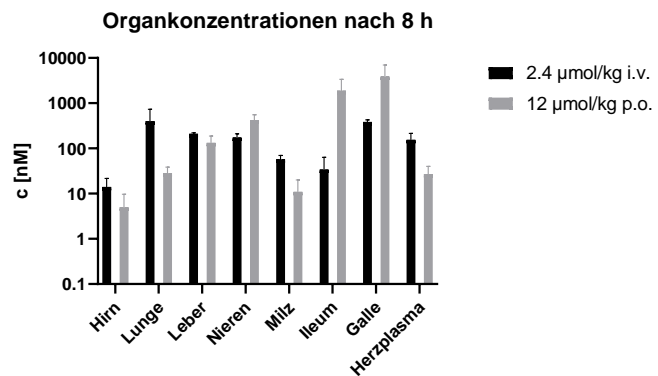
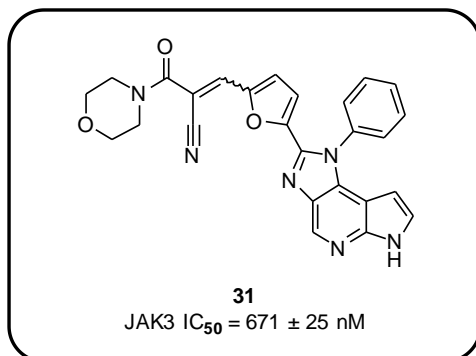
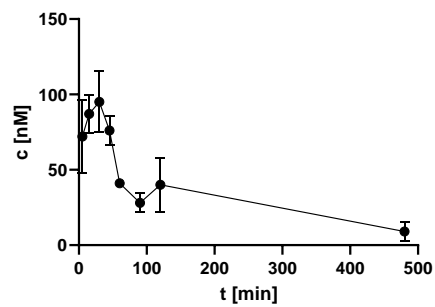




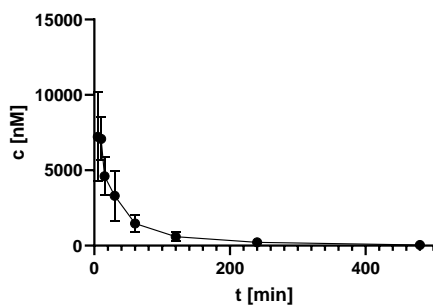
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



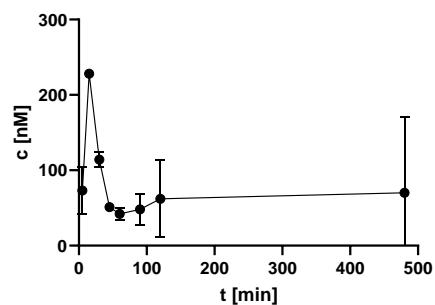
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

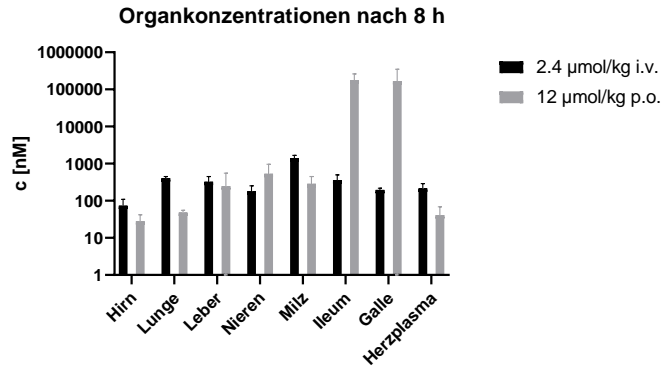
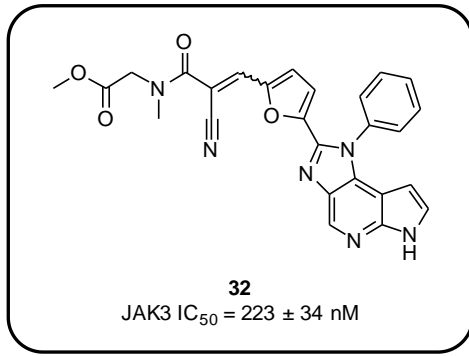


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

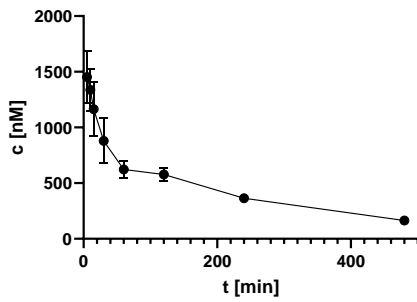


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

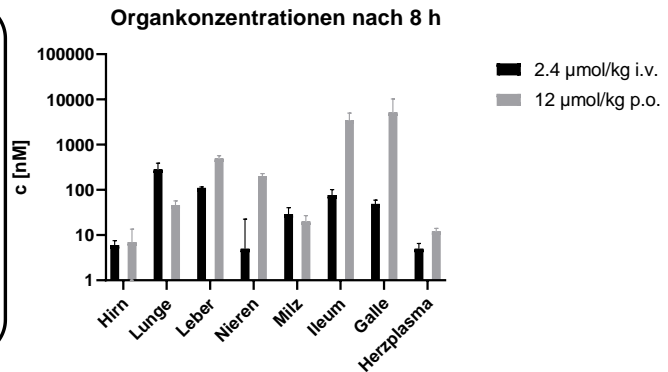
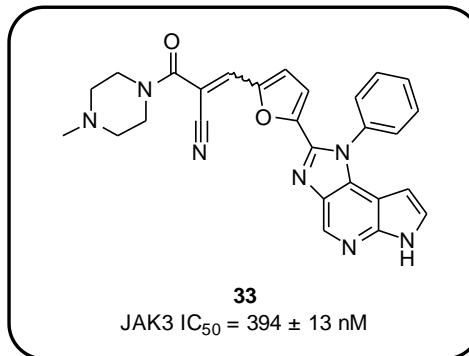
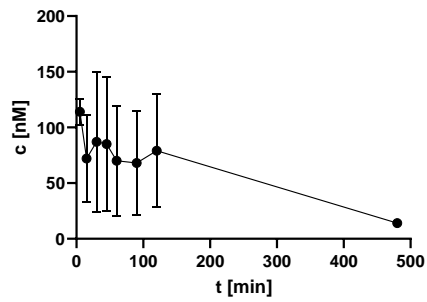




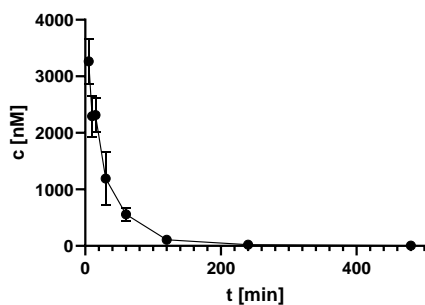
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



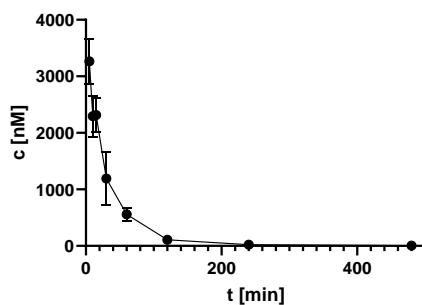
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

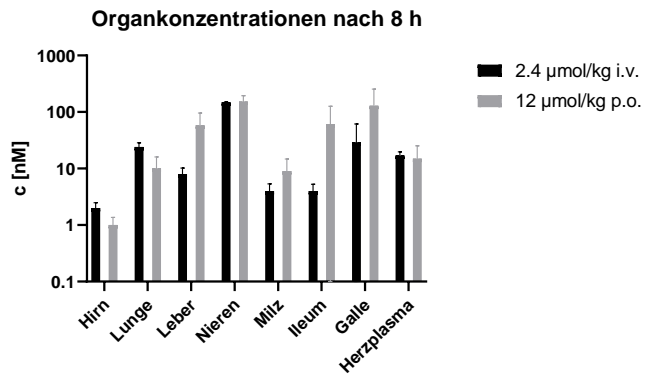
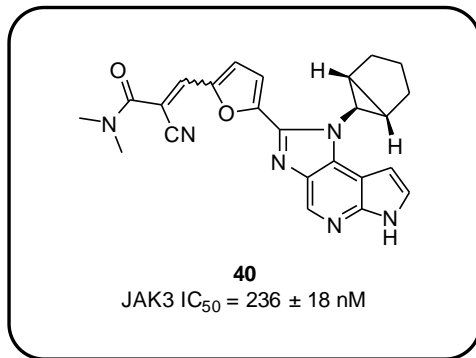


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

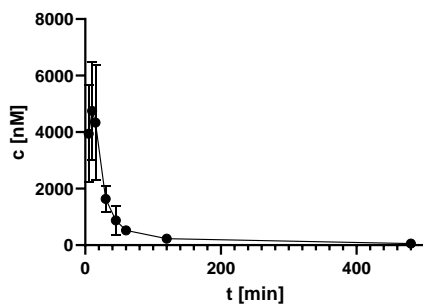


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

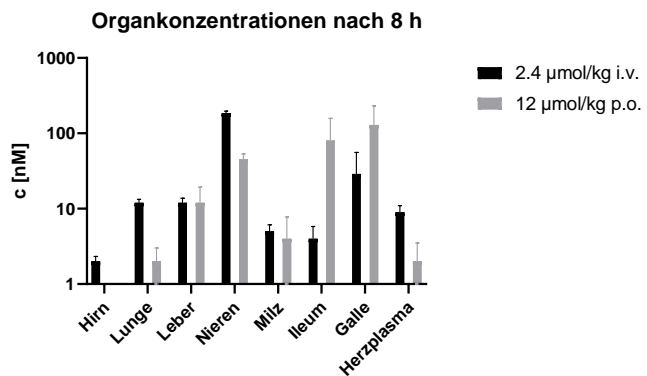
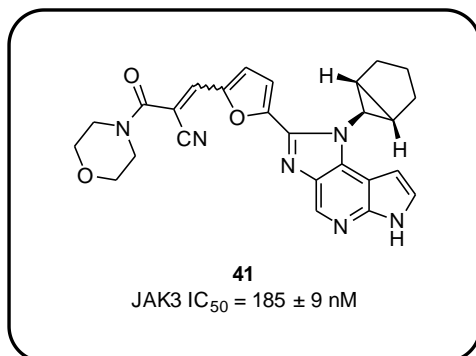
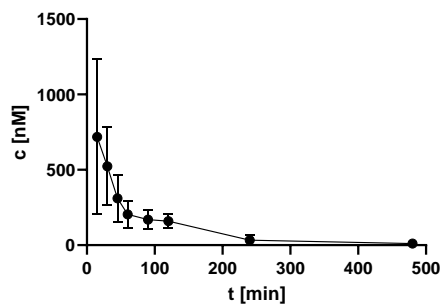




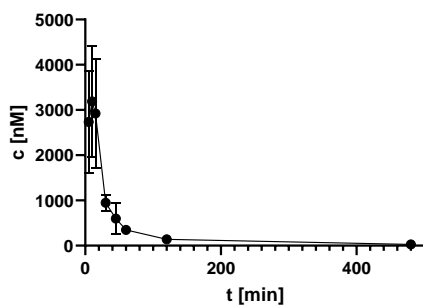
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



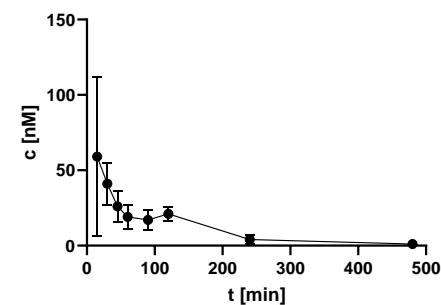
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

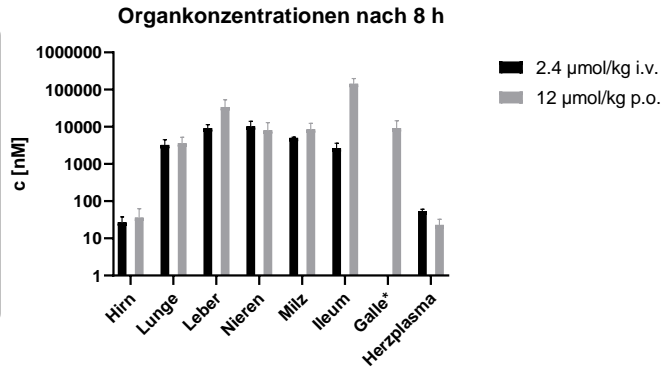
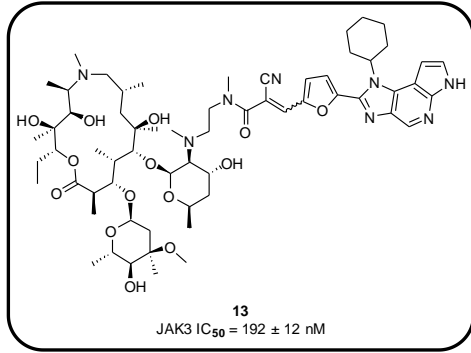


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

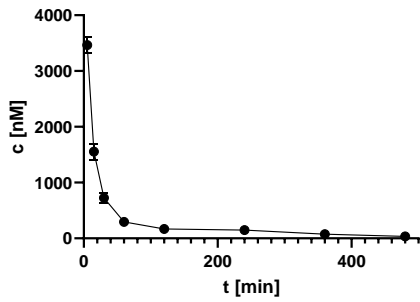


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

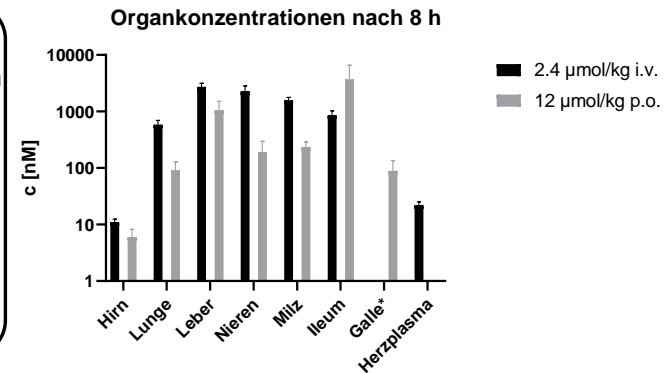
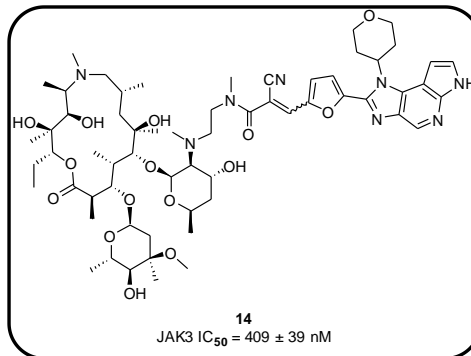
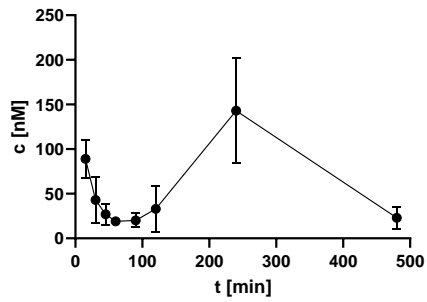




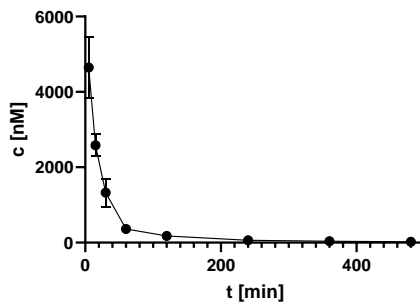
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



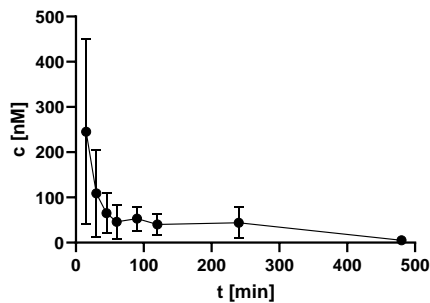
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

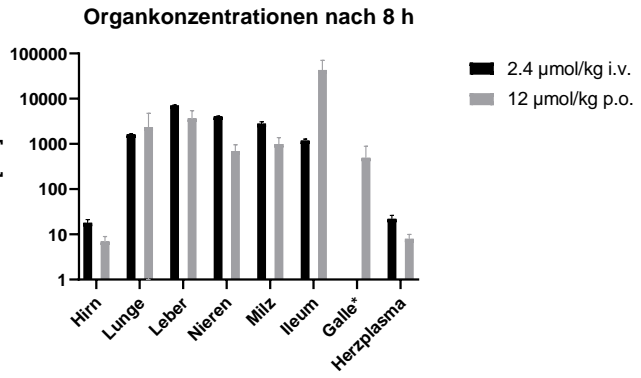
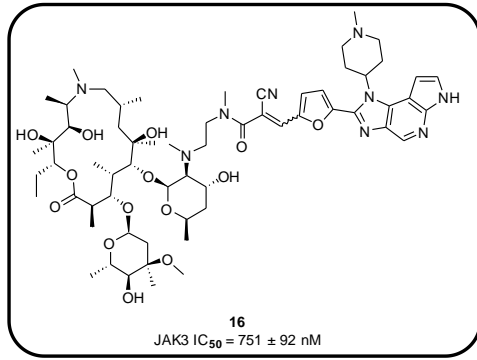


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

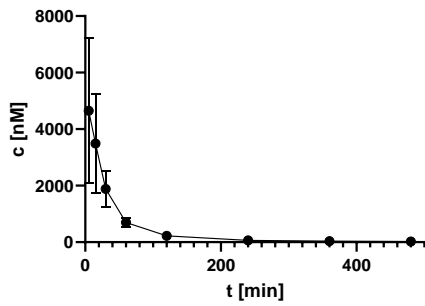


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

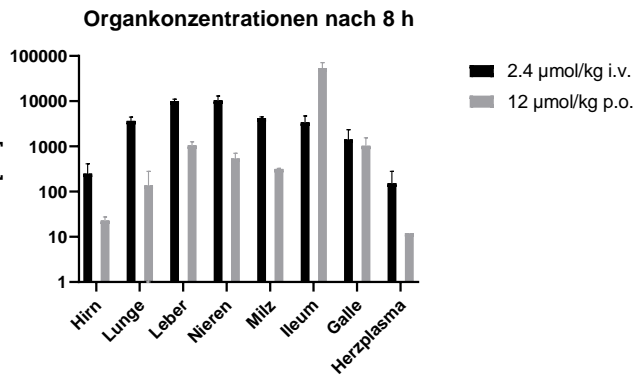
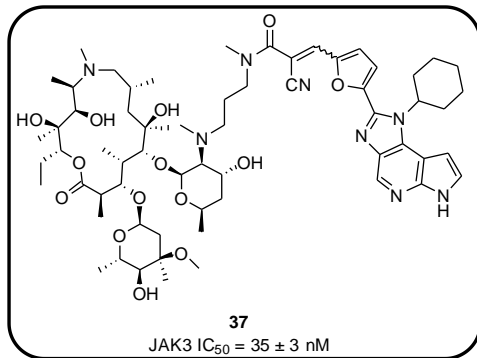
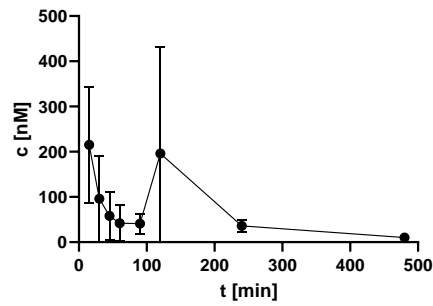




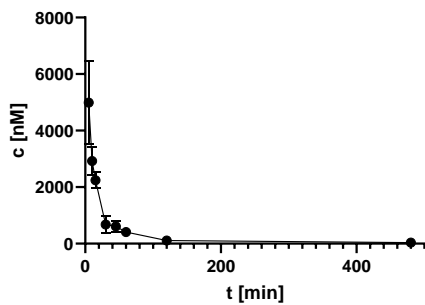
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



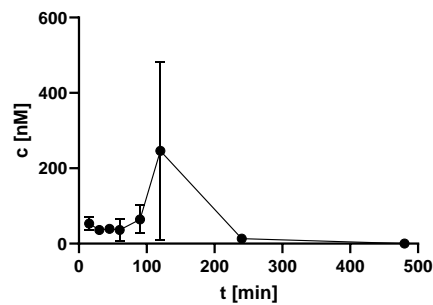
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

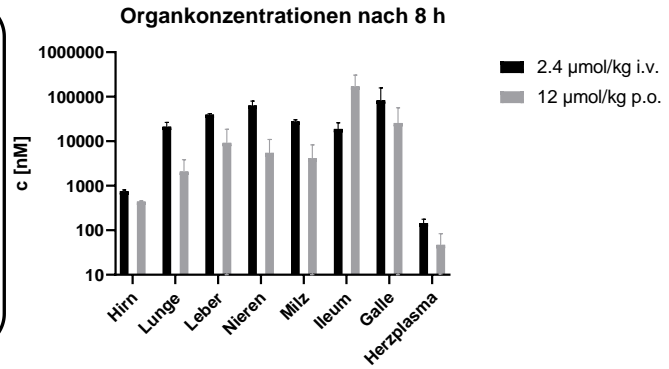
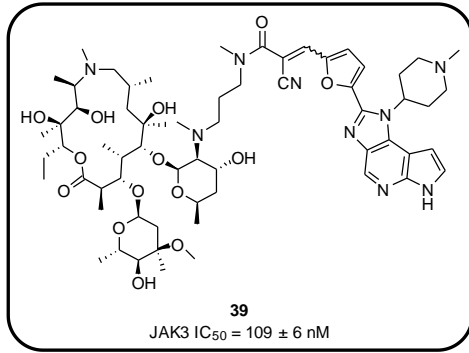


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

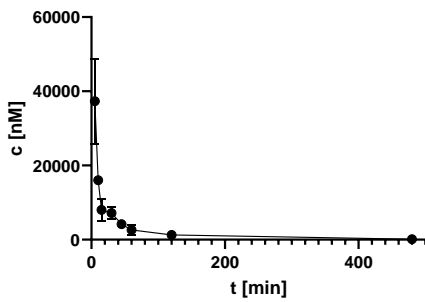


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

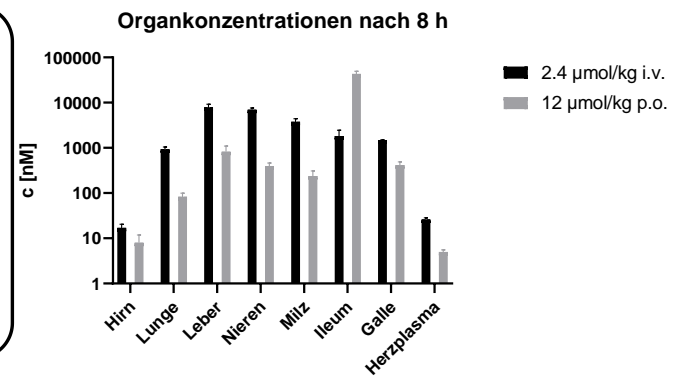
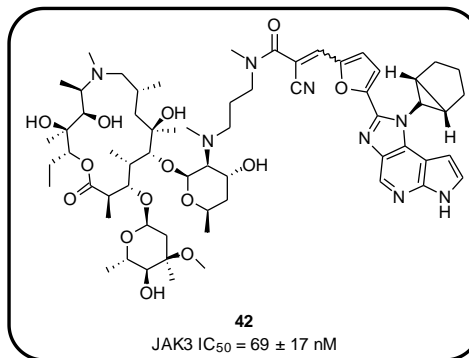
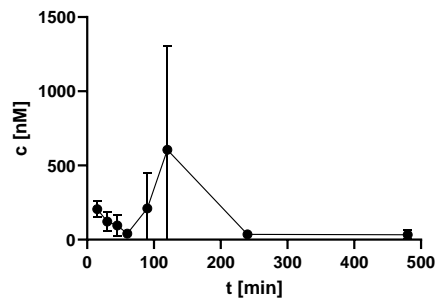




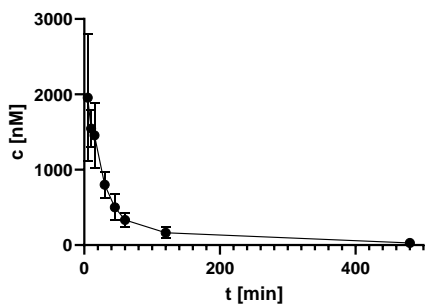
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



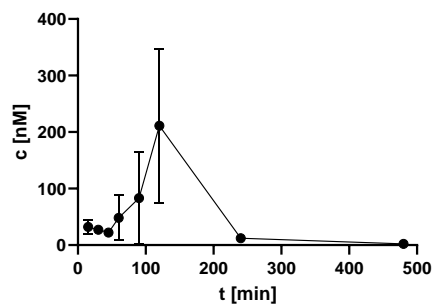
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

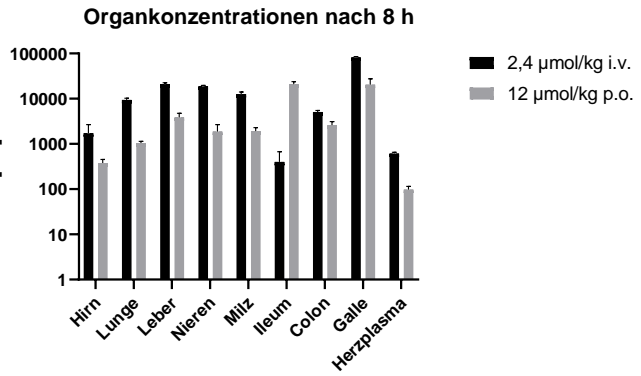
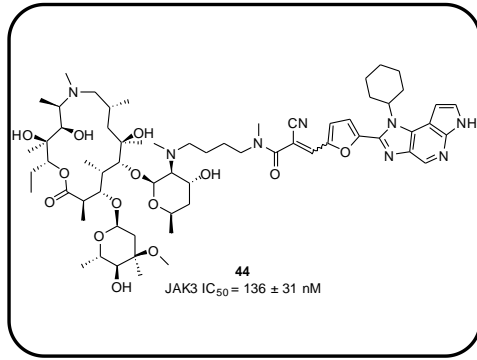


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

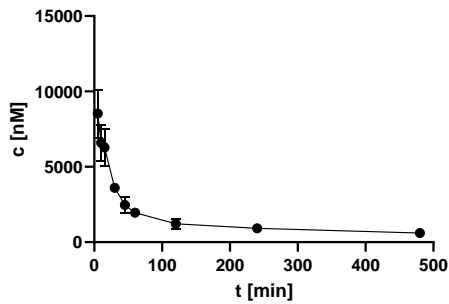


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

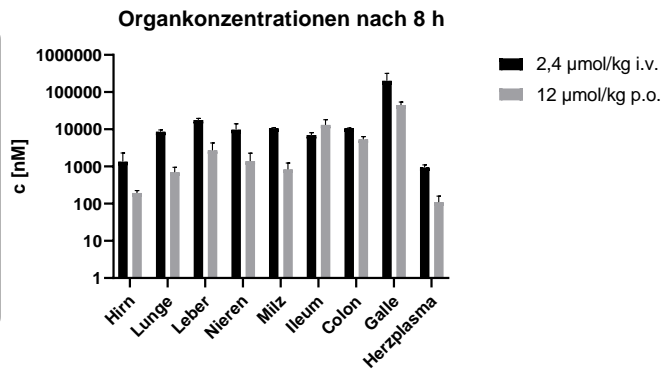
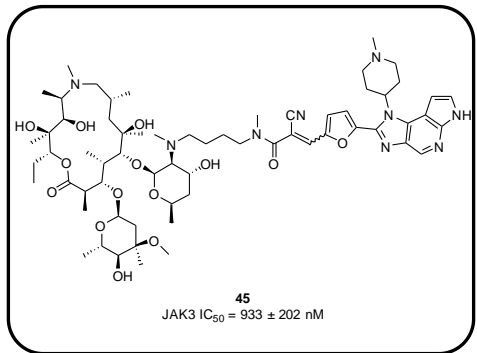
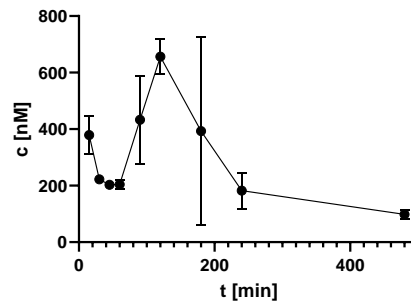




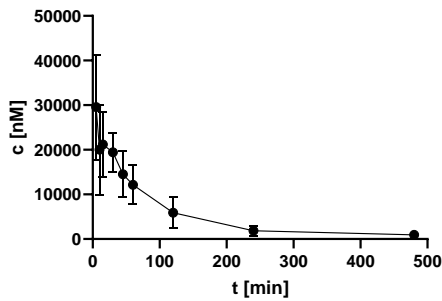
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



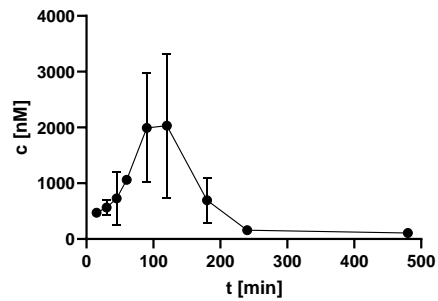
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

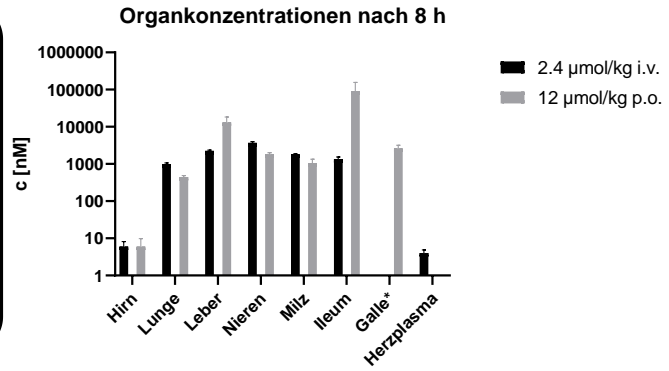
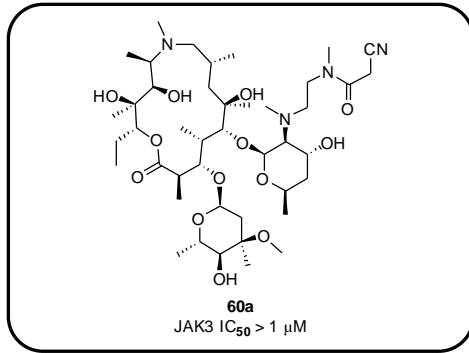


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

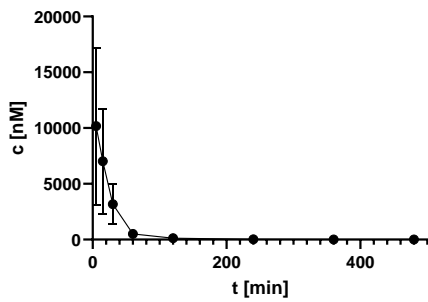


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

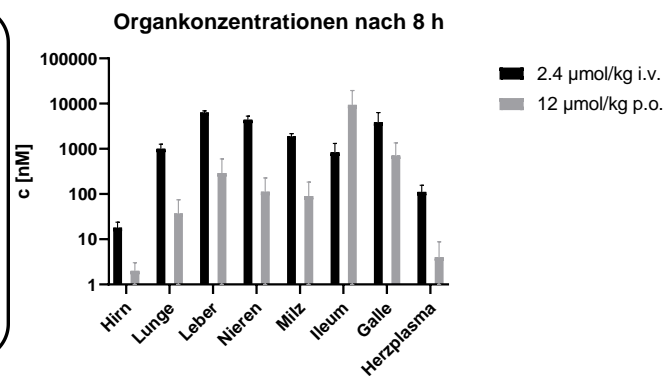
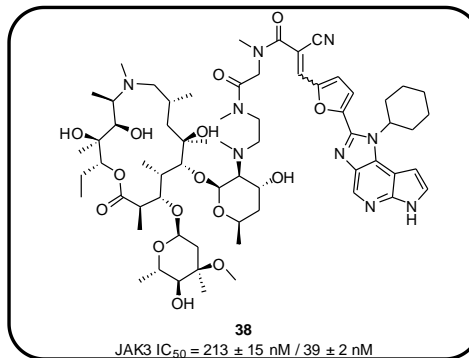
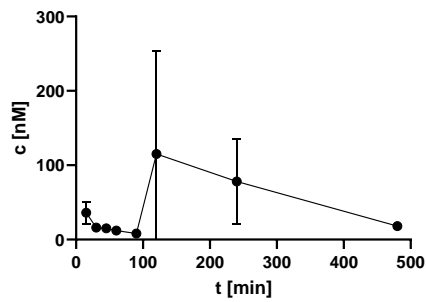




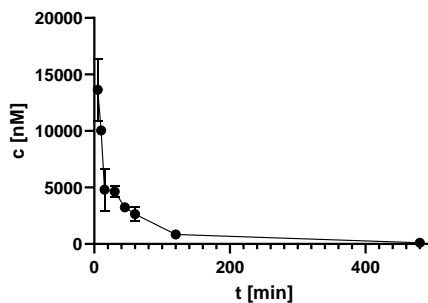
Plasmakonzentrationen nach 2,4 μmol/kg i.v.



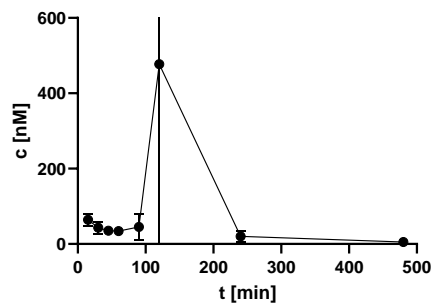
Plasmakonzentrationen nach 12 μmol/kg p.o.

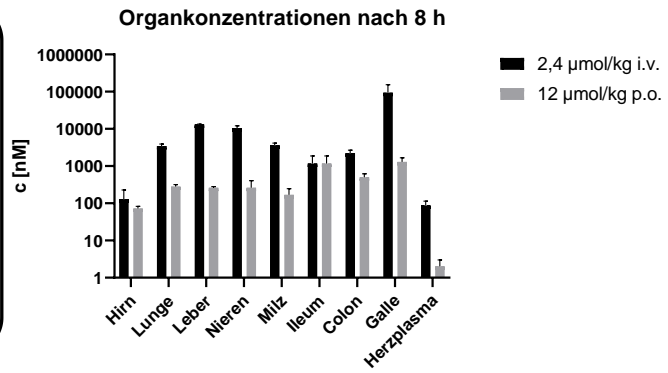
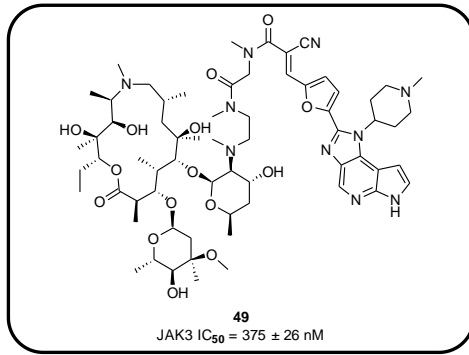


Plasmakonzentrationen nach 2,4 μmol/kg i.v.

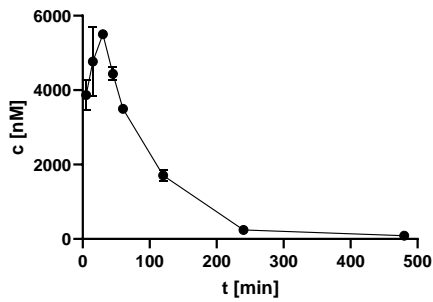


Plasmakonzentrationen nach 12 μmol/kg p.o.

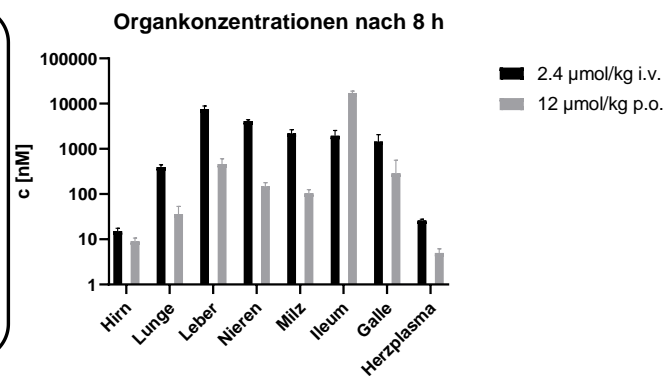
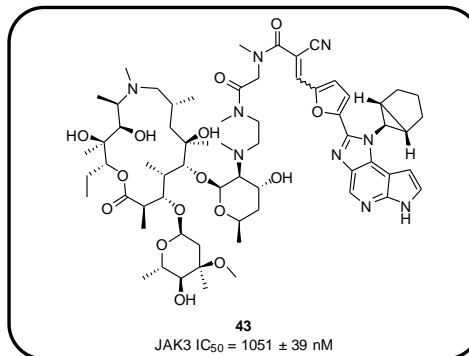
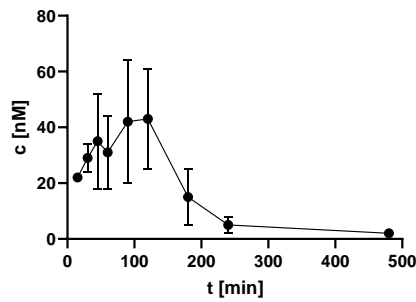




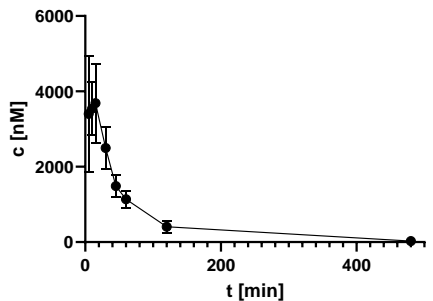
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



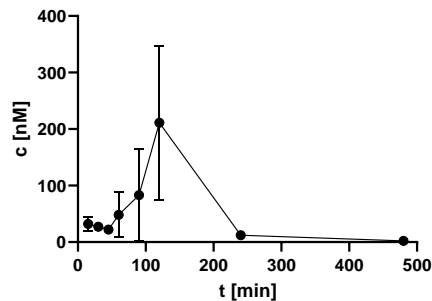
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

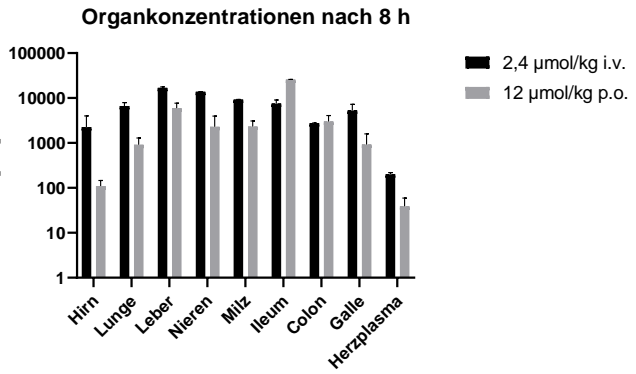
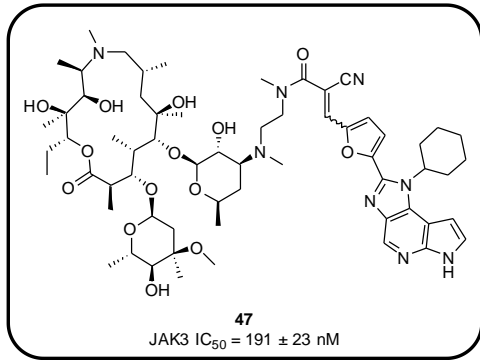


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

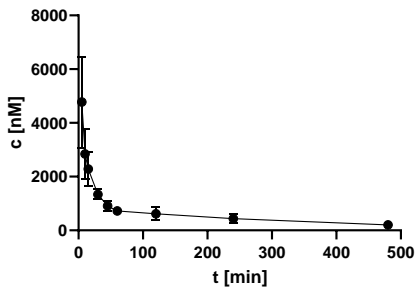


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

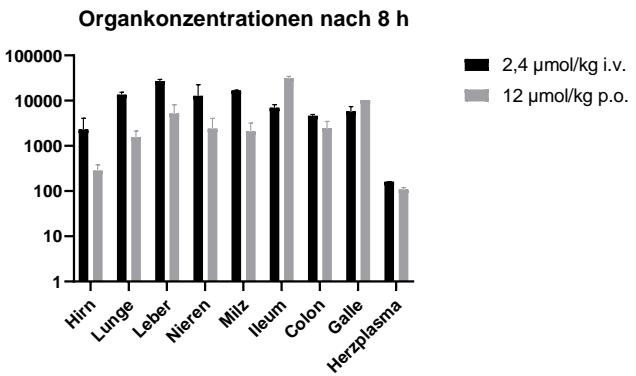
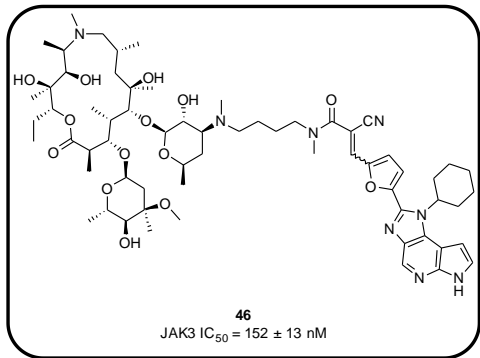
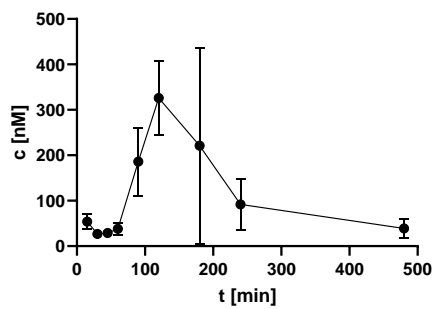




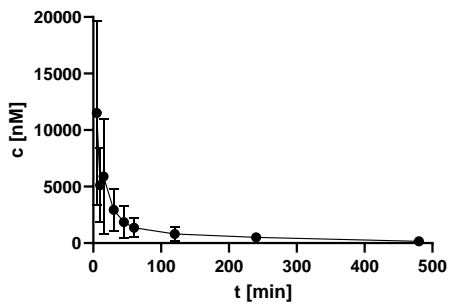
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



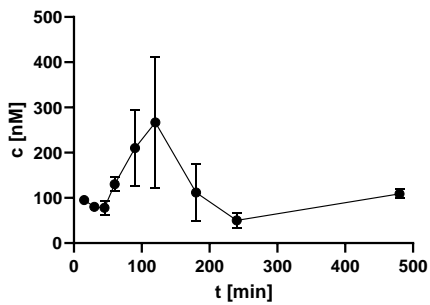
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

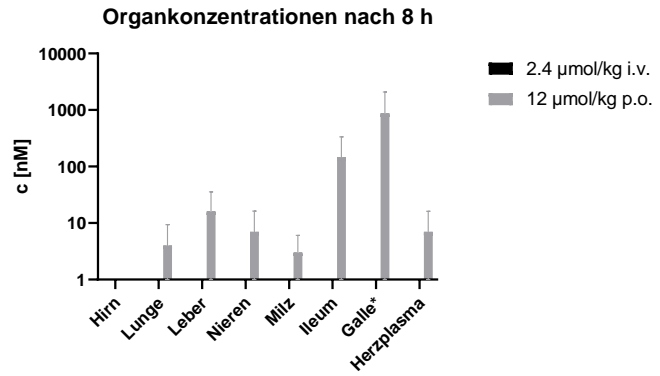
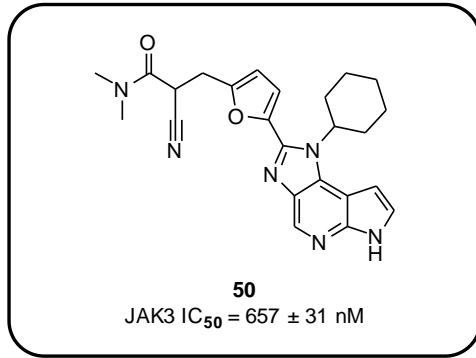


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.

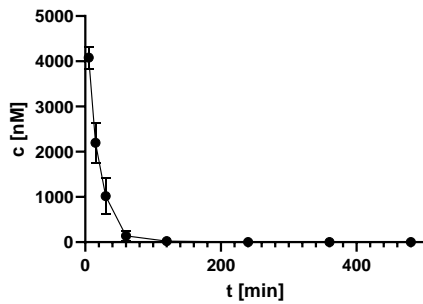


Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

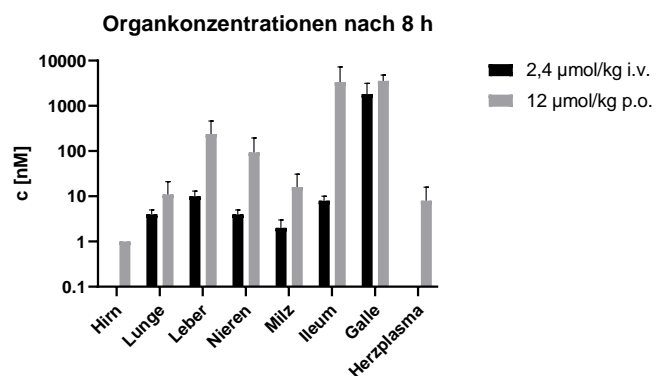
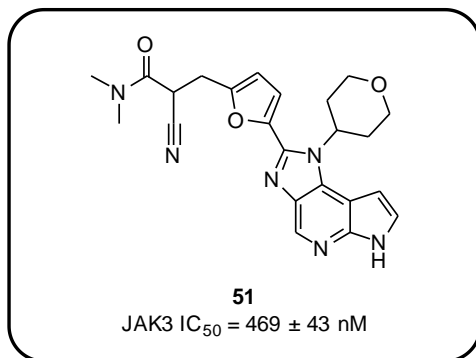
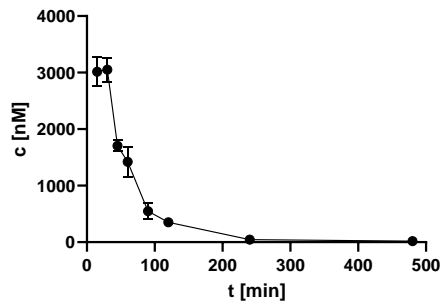




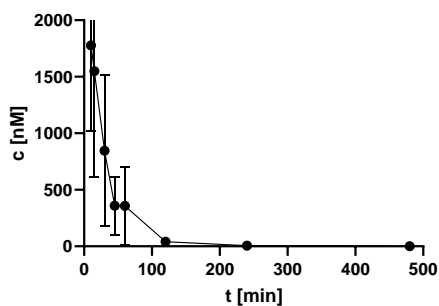
Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



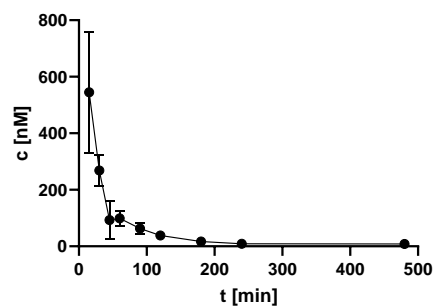
Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.

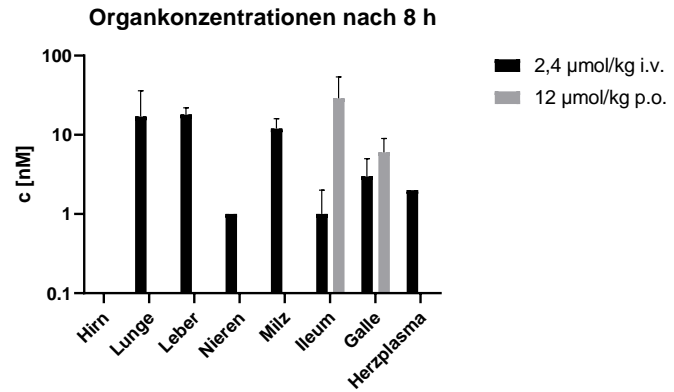
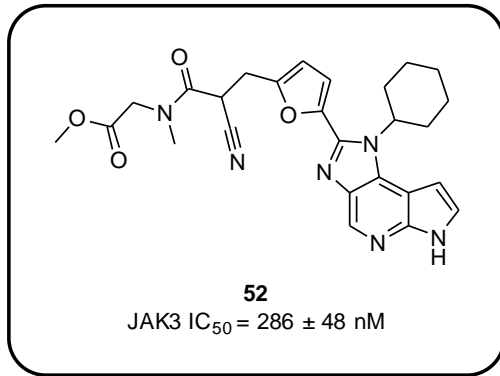


Plasmakonzentrationen nach 2,4 µmol/kg i.v.



Plasmakonzentrationen nach 12 µmol/kg p.o.





Plasmakonzentrationen der unveränderten Substanz lagen sowohl nach i.v. als auch nach p.o. Behandlung unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze

7.2 weitere experimentelle Daten

7.2.1 2D NMR Spektren

3h H,H-COSY Spektrum:

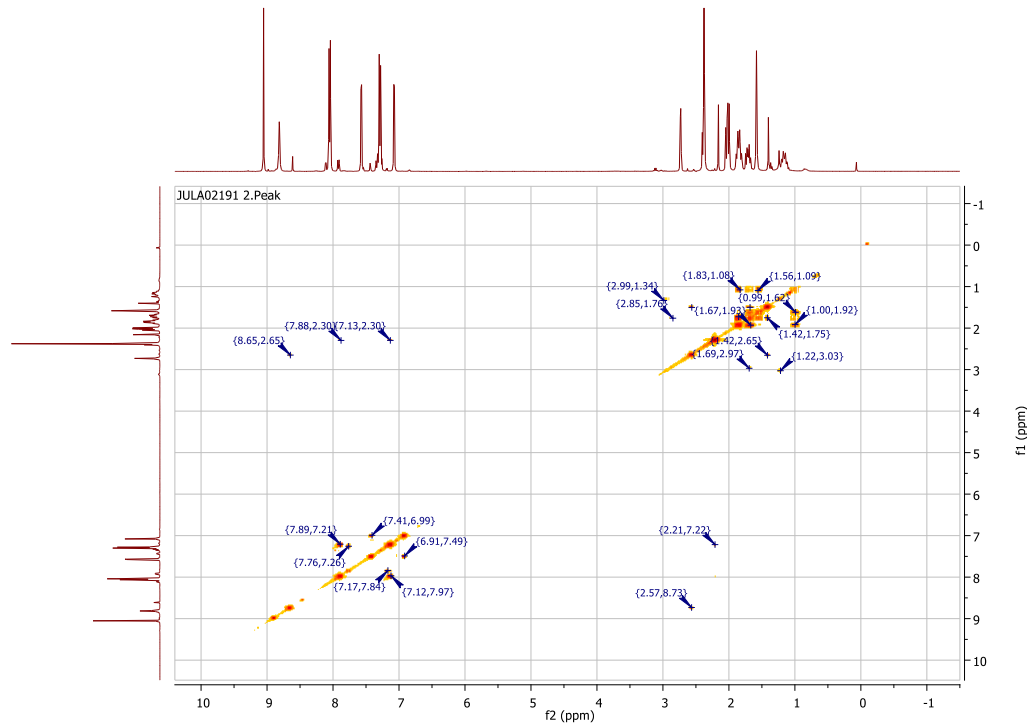


Abbildung 7.1: H,H-COSY Spektrum von **3h**.

3h HSQC Spektrum:

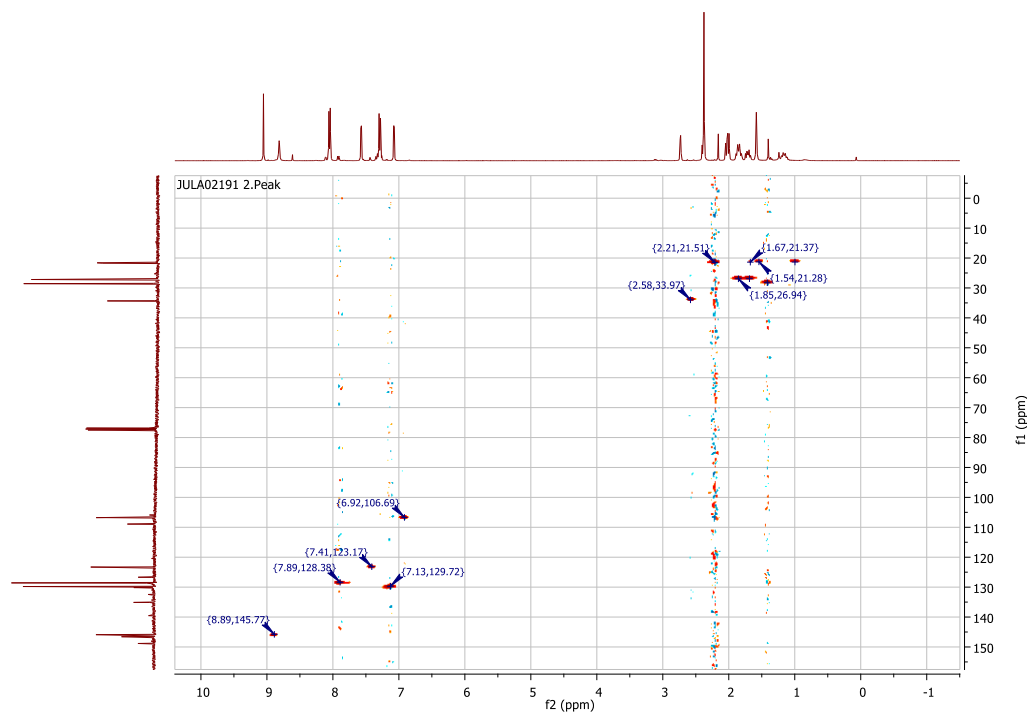


Abbildung 7.2: HSQC Spektrum von **3h**.

58 H,H-COSY Spektrum:

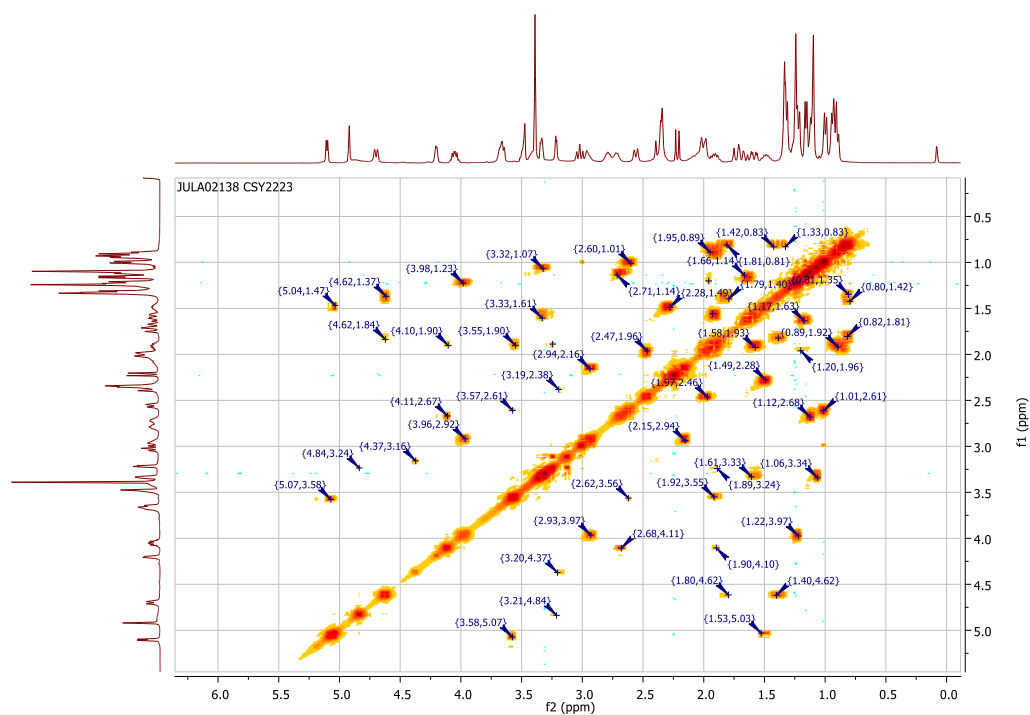


Abbildung 7.3: H,H-COSY Spektrum von 58.

58 HSQC Spektrum:

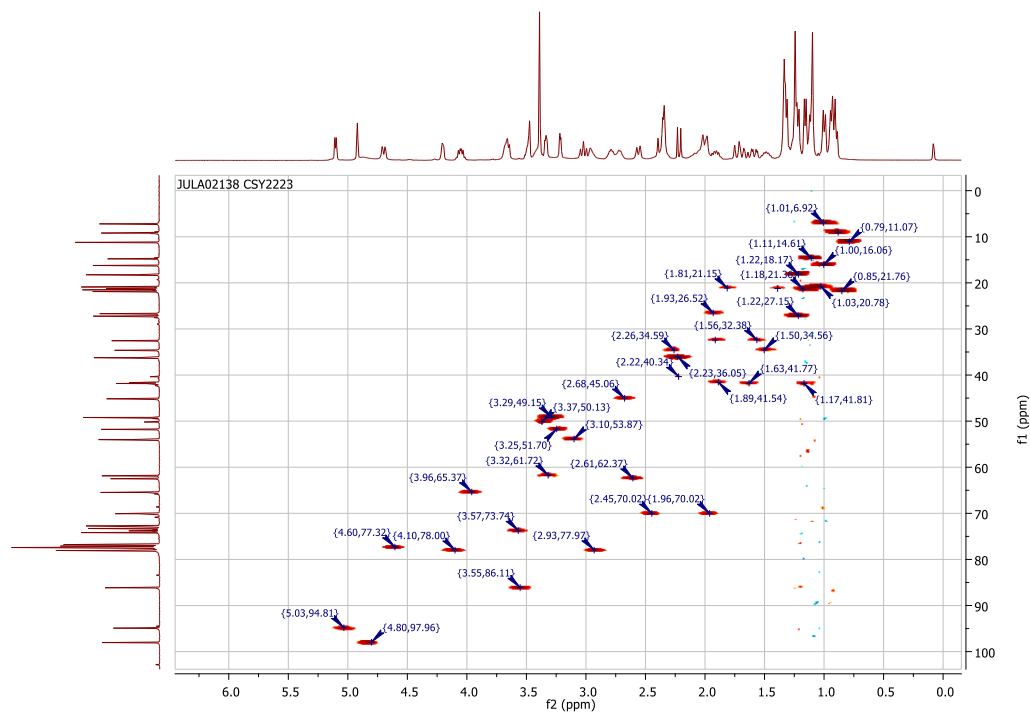
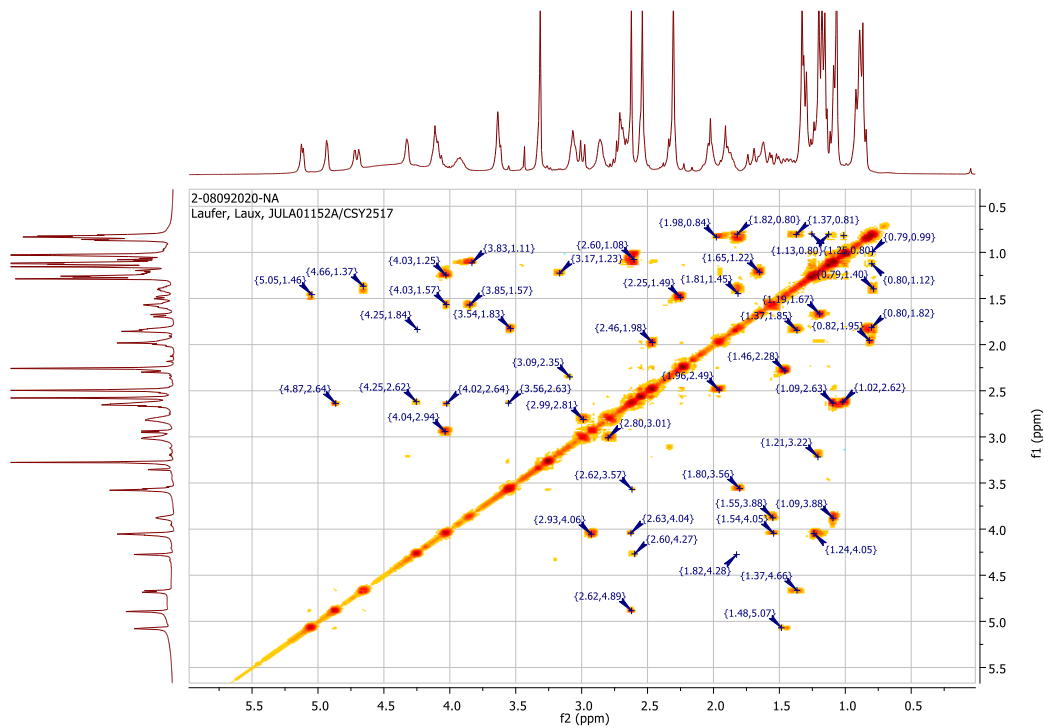
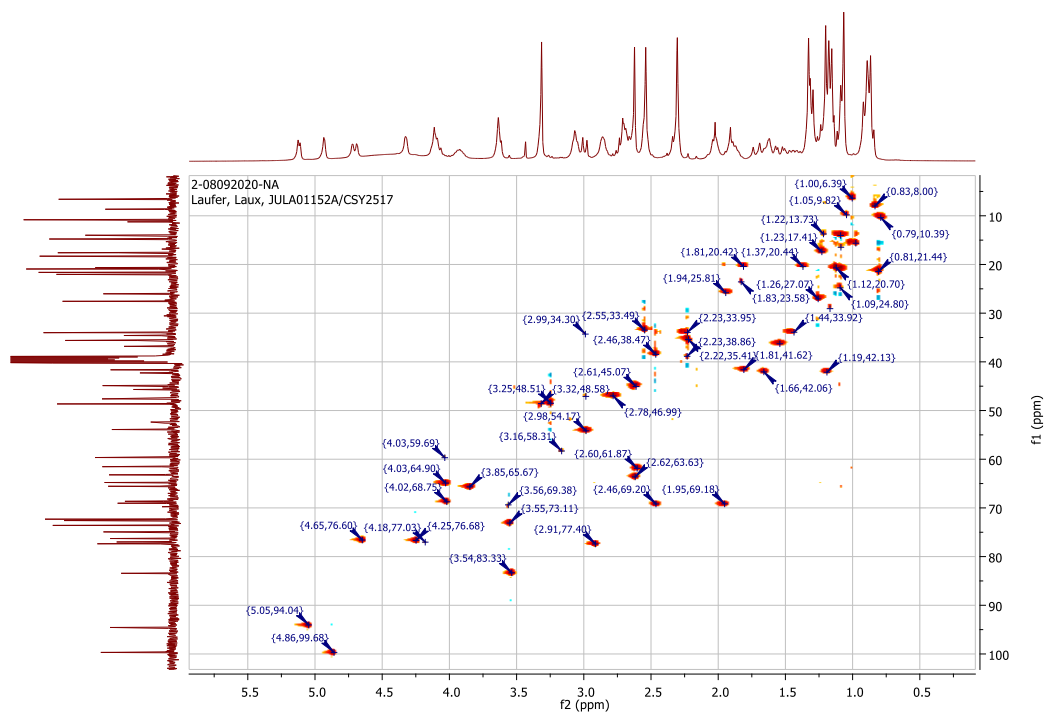
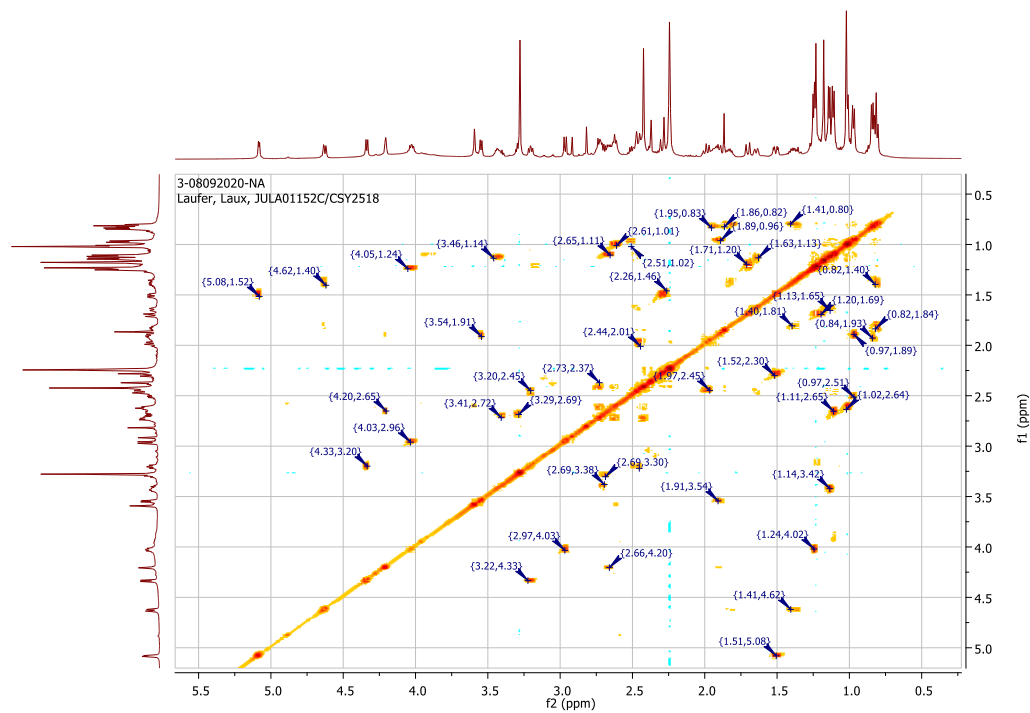
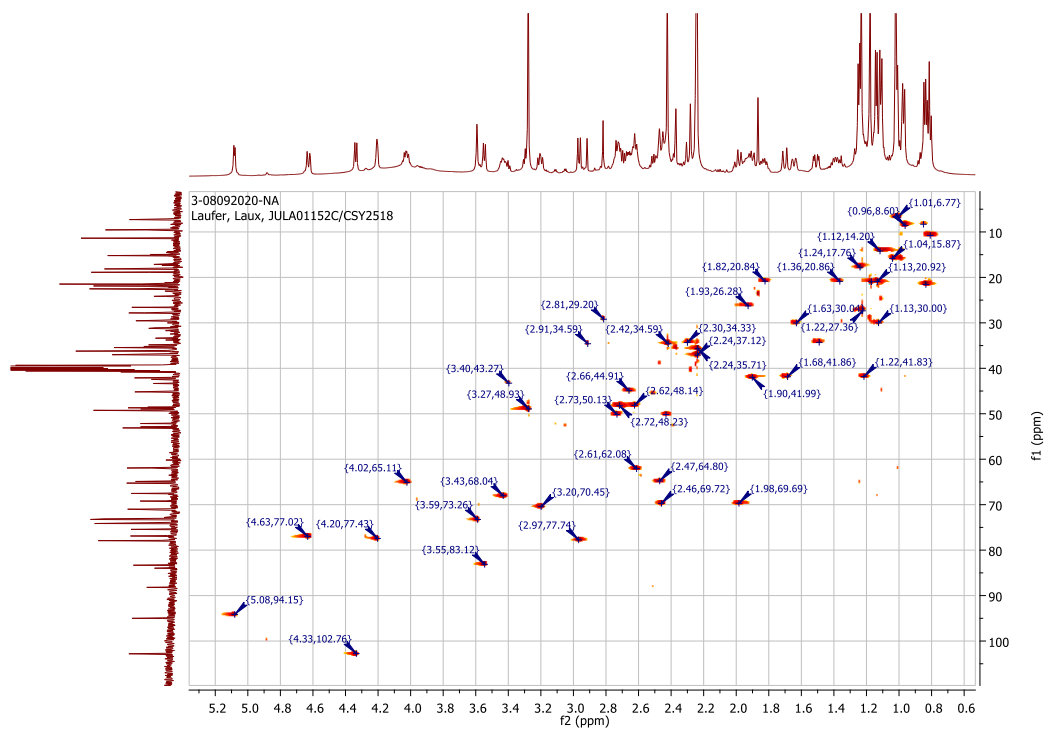
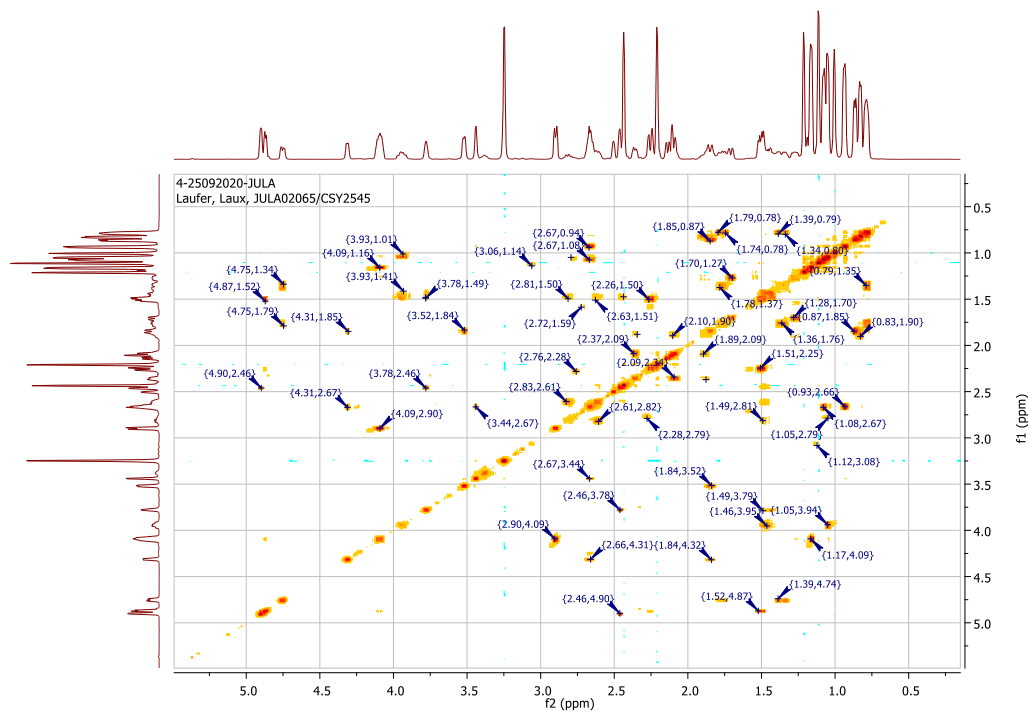
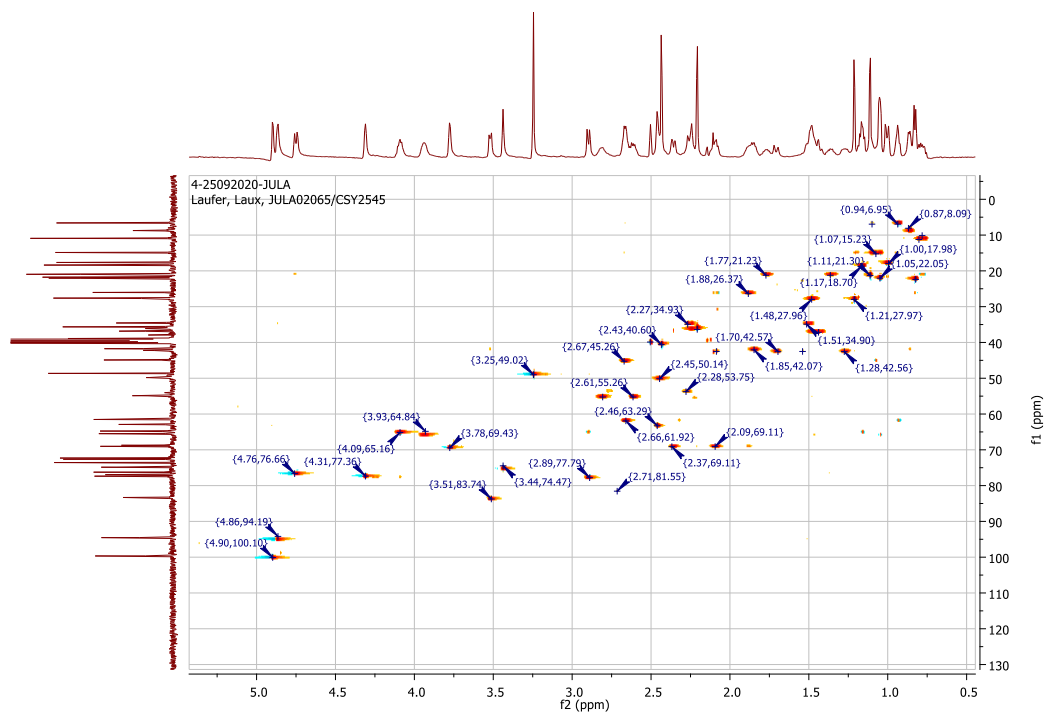
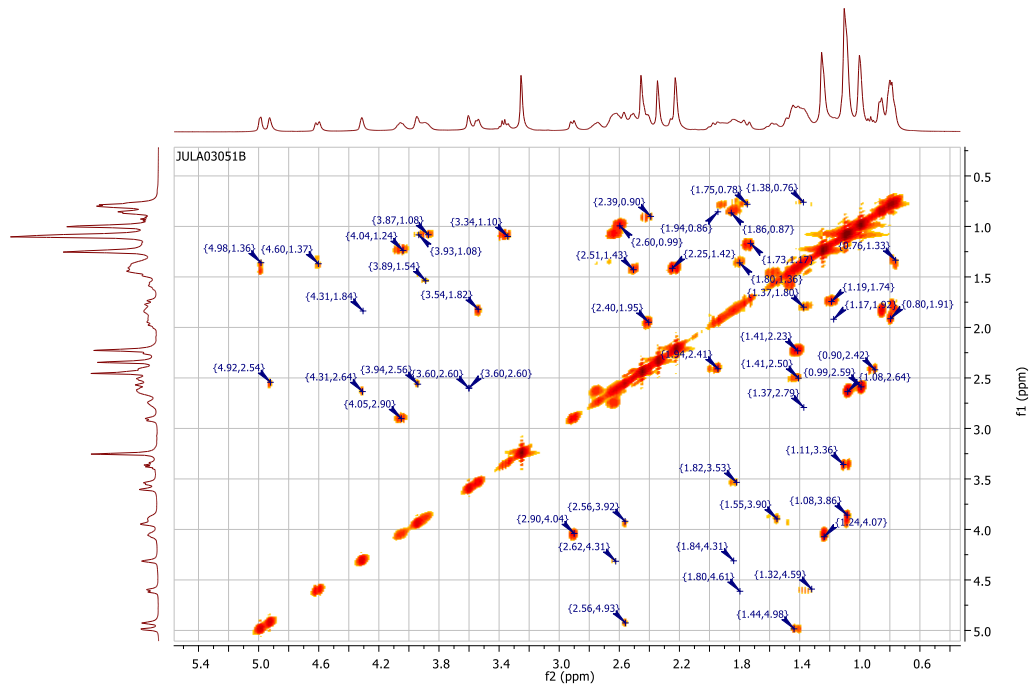
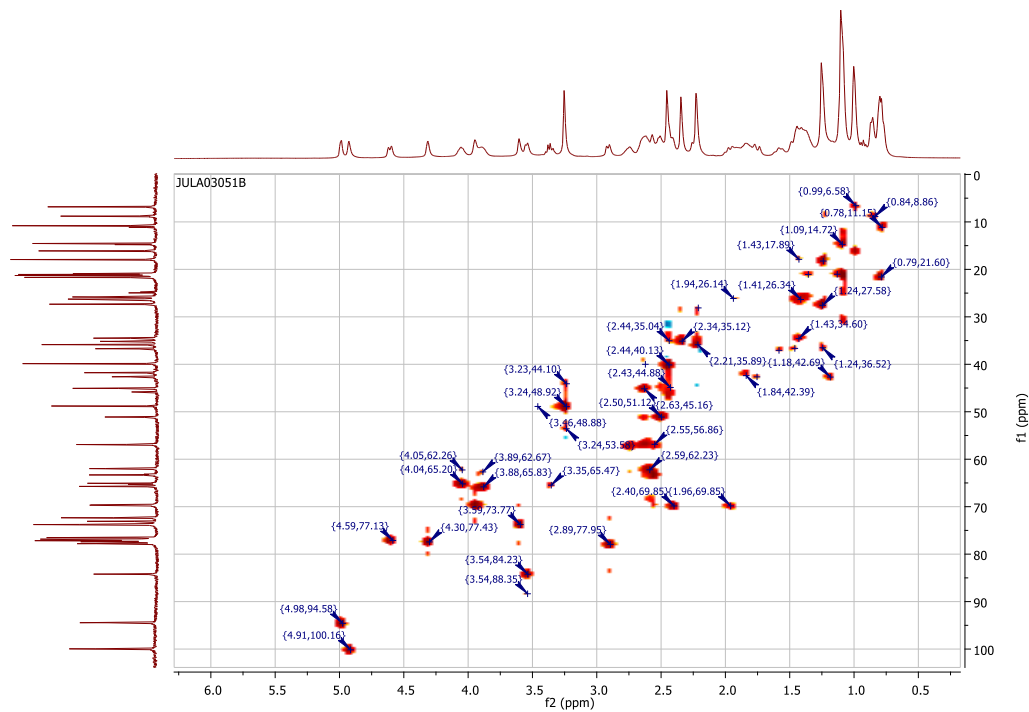


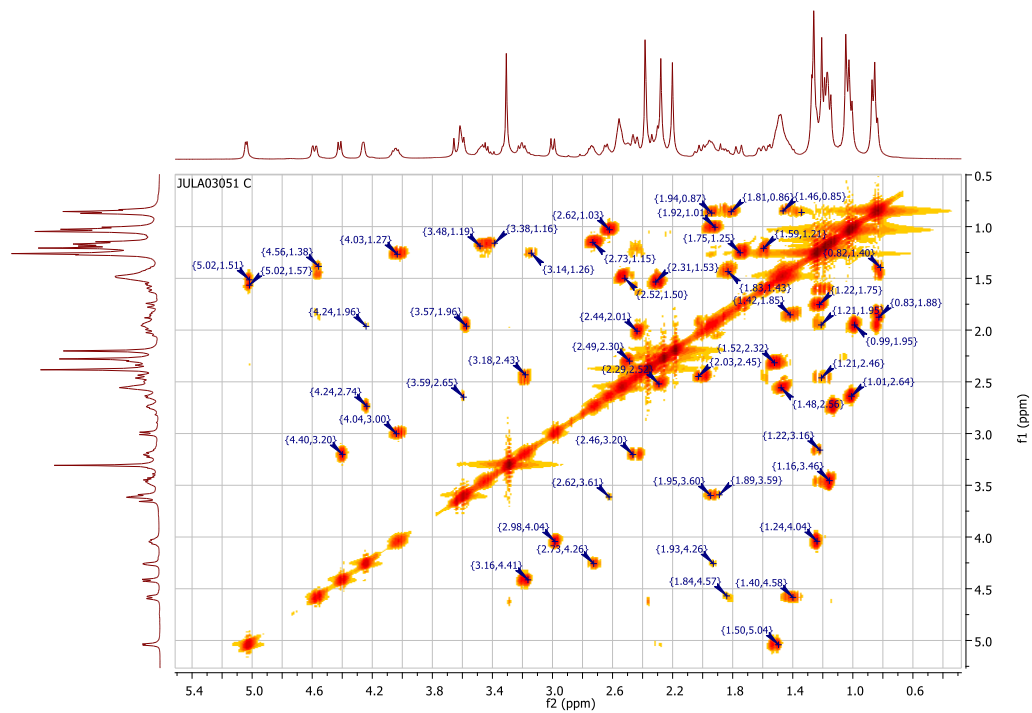
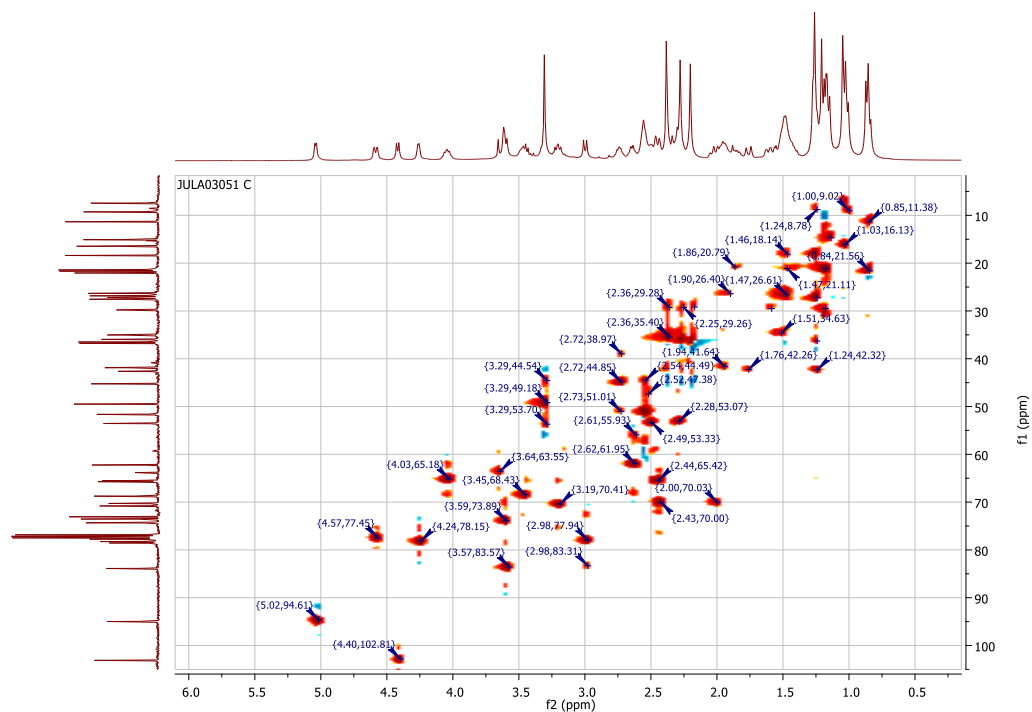
Abbildung 7.4: HSQC Spektrum von 58.

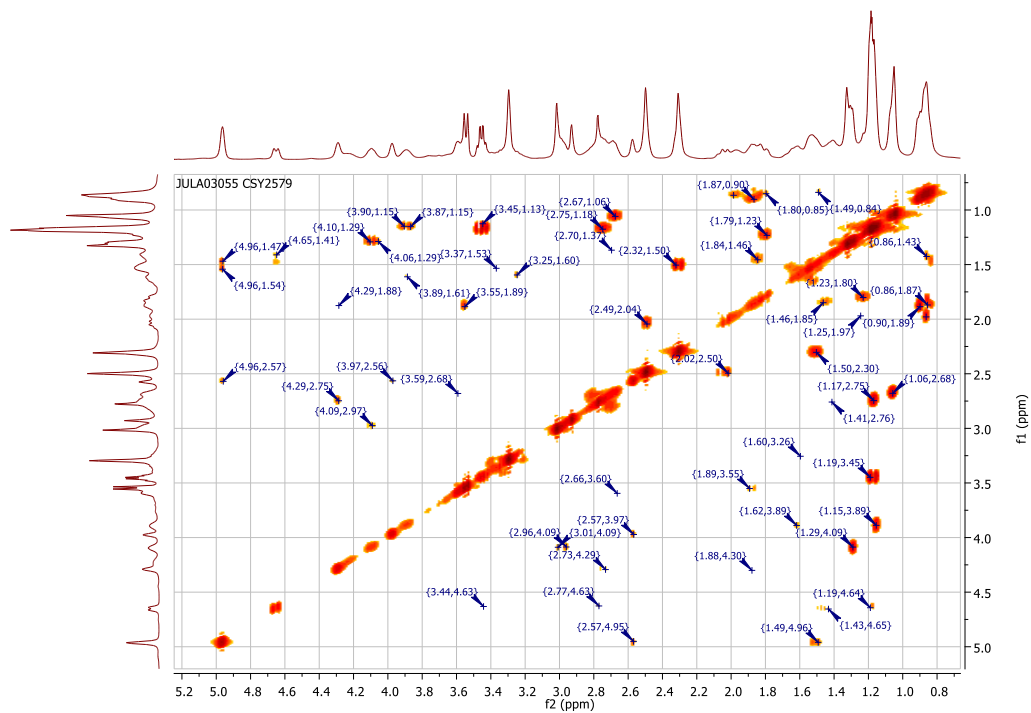
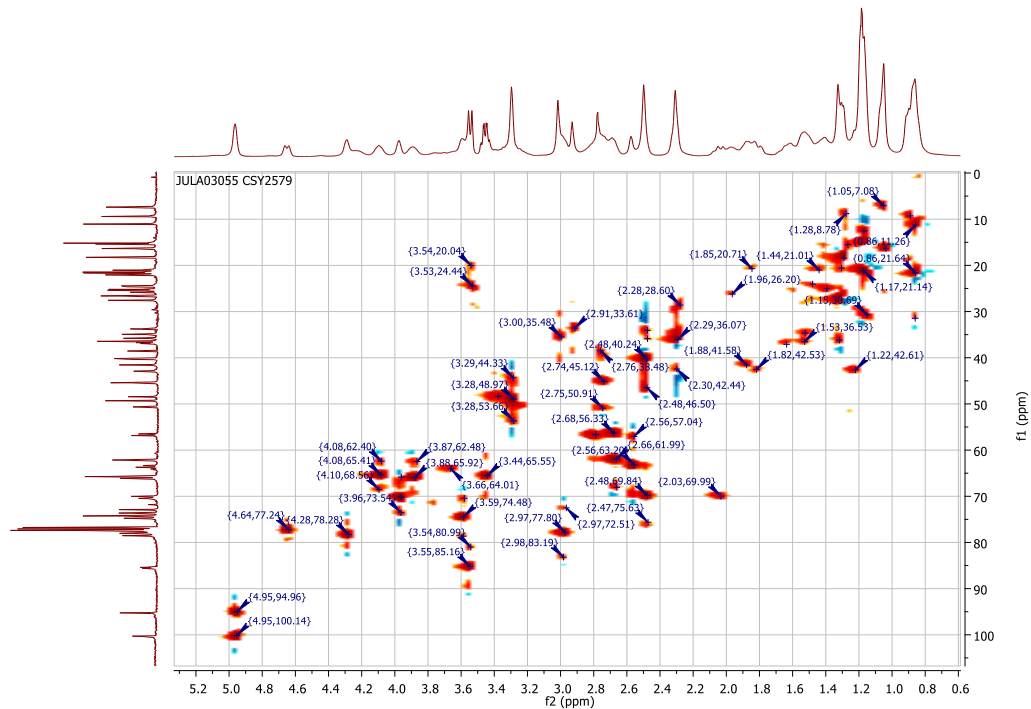
59a H,H-COSY Spektrum:**Abbildung 7.5:** H,H-COSY Spektrum von **59a**.**59a** HSQC Spektrum:**Abbildung 7.6:** HSQC Spektrum von **59a**.

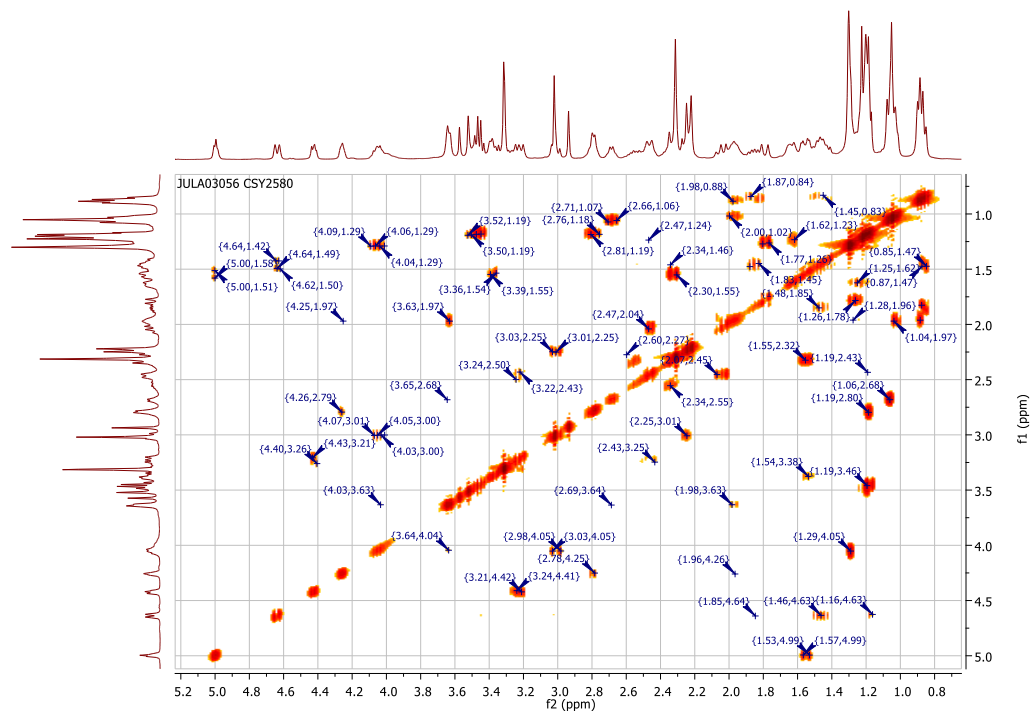
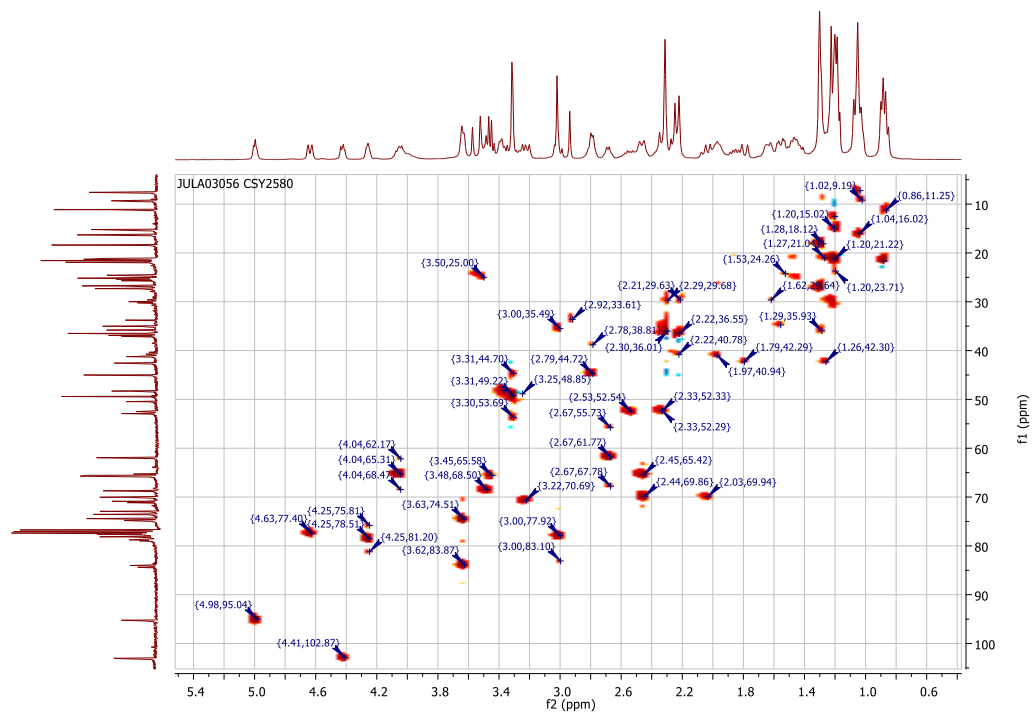
59d H,H-COSY Spektrum:**Abbildung 7.7:** H,H-COSY Spektrum von **59d**.**59d** HSQC Spektrum:**Abbildung 7.8:** HSQC Spektrum von **59d**.

59b H,H-COSY Spektrum:**Abbildung 7.9:** H,H-COSY Spektrum von **59b**.**59b** HSQC Spektrum:**Abbildung 7.10:** HSQC Spektrum von **59b**.

59c H,H-COSY Spektrum:**Abbildung 7.11:** H,H-COSY Spektrum von **59c**.**59c** HSQC Spektrum:**Abbildung 7.12:** HSQC Spektrum von **59c**.

59e H,H-COSY Spektrum:**Abbildung 7.13:** H,H-COSY Spektrum von **59e**.**59e** HSQC Spektrum:**Abbildung 7.14:** HSQC Spektrum von **59e**.

60c H,H-COSY Spektrum:**Abbildung 7.15:** H,H-COSY Spektrum von **60c**.**60c HSQC Spektrum:****Abbildung 7.16:** HSQC Spektrum von **60c**.

60e H,H-COSY Spektrum:**Abbildung 7.17:** H,H-COSY Spektrum von **60d**.**60e** HSQC Spektrum:**Abbildung 7.18:** HSQC Spektrum von **60e**.

60d H,H-COSY Spektrum:

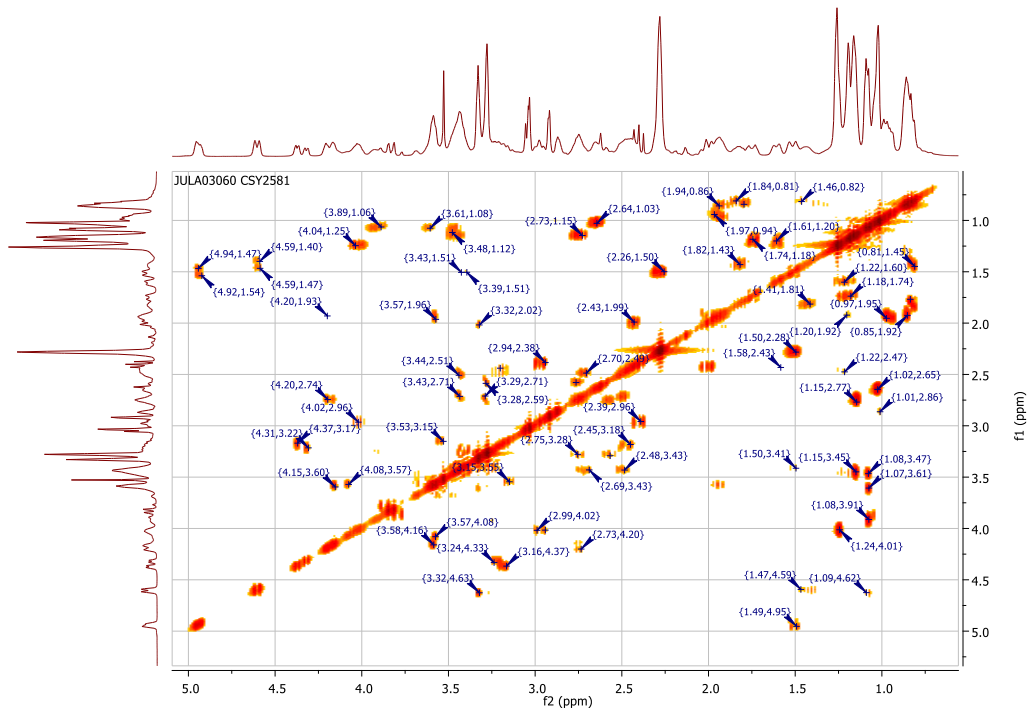


Abbildung 7.19: H,H-COSY Spektrum von **60d**.

60d HSQC Spektrum:

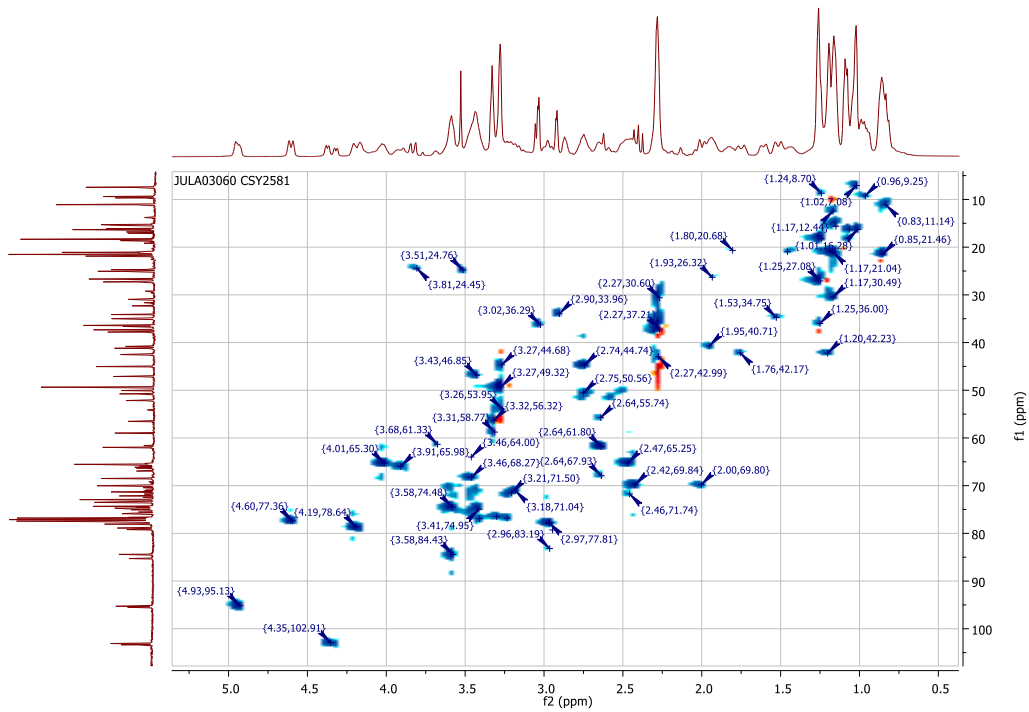


Abbildung 7.20: HSQC Spektrum von **60d**.

49 H,H-COSY Spektrum:

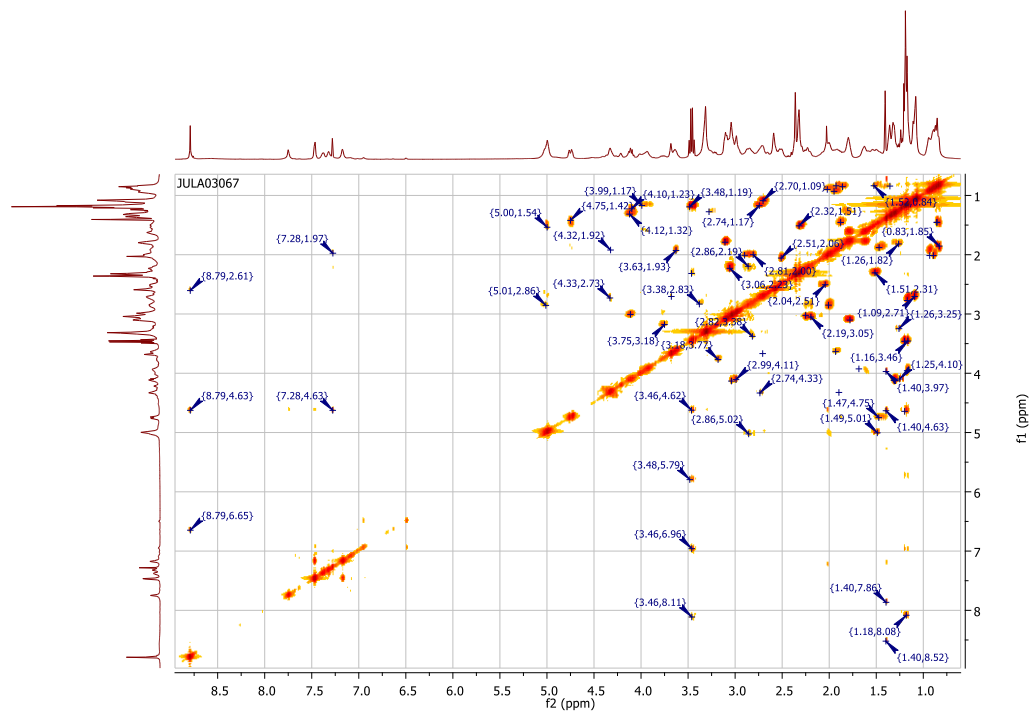


Abbildung 7.21: H,H-COSY Spektrum von 49.

49 HSQC Spektrum:

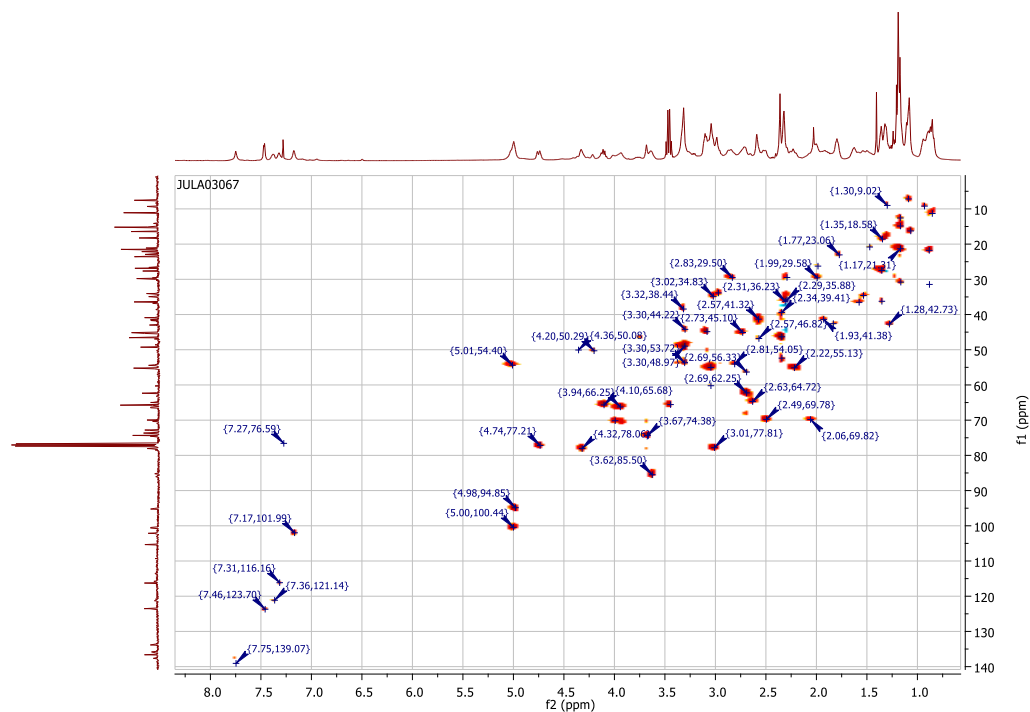
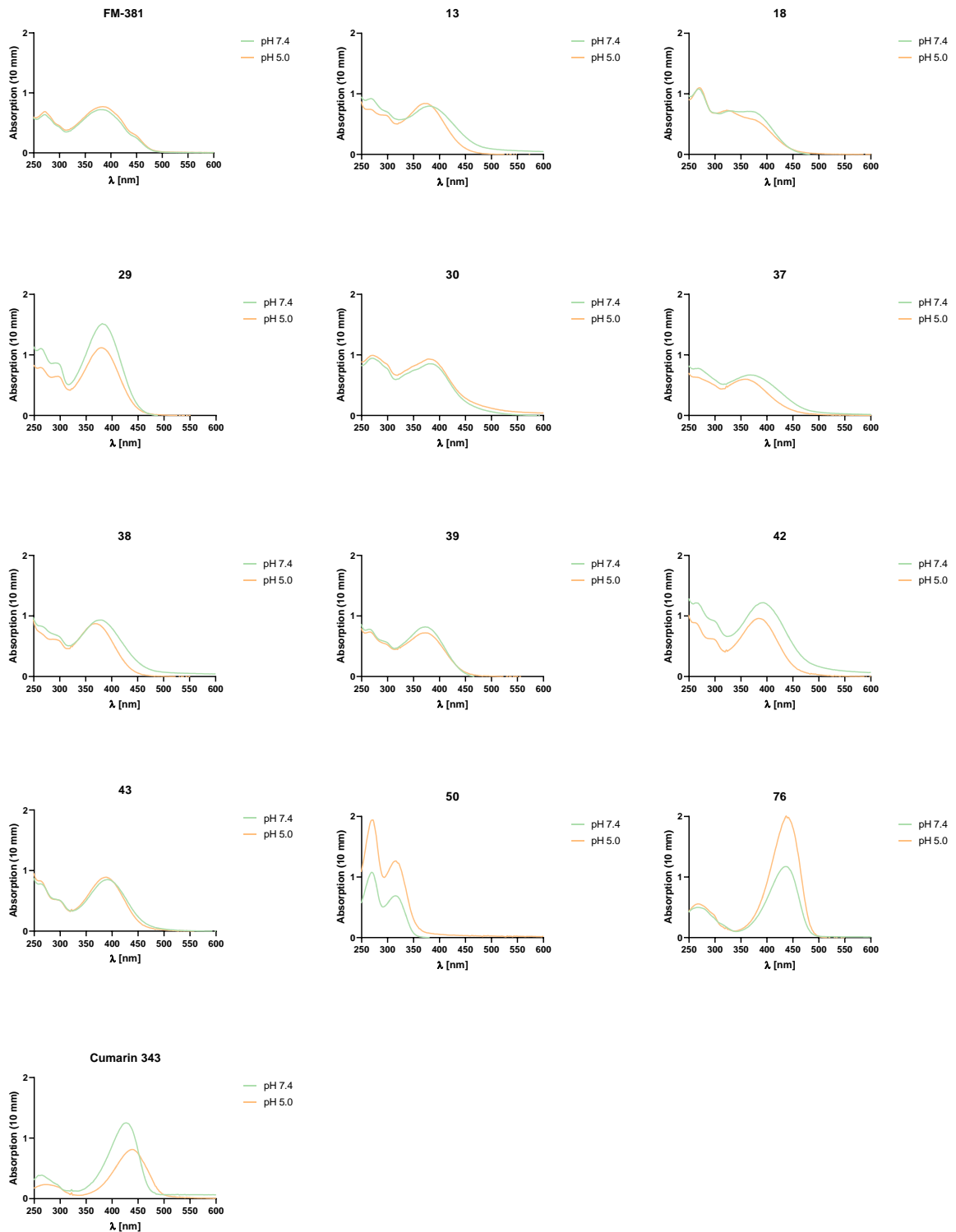
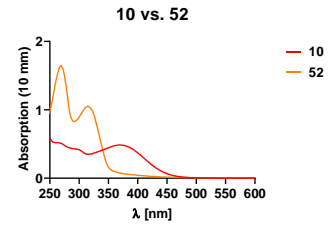
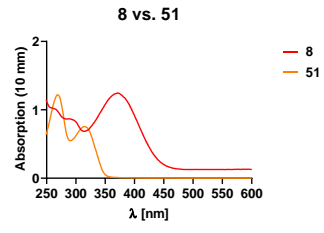
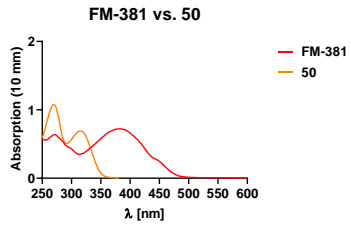


Abbildung 7.22: HSQC Spektrum von 49.

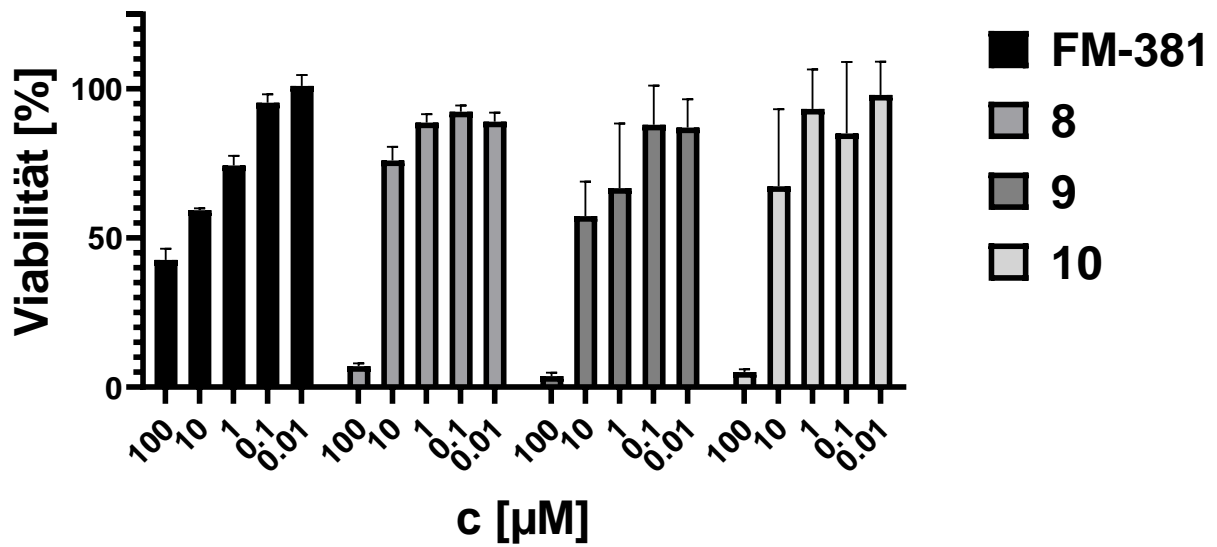
7.2.2 Absorptionsspektren ausgewählter Testverbindungen



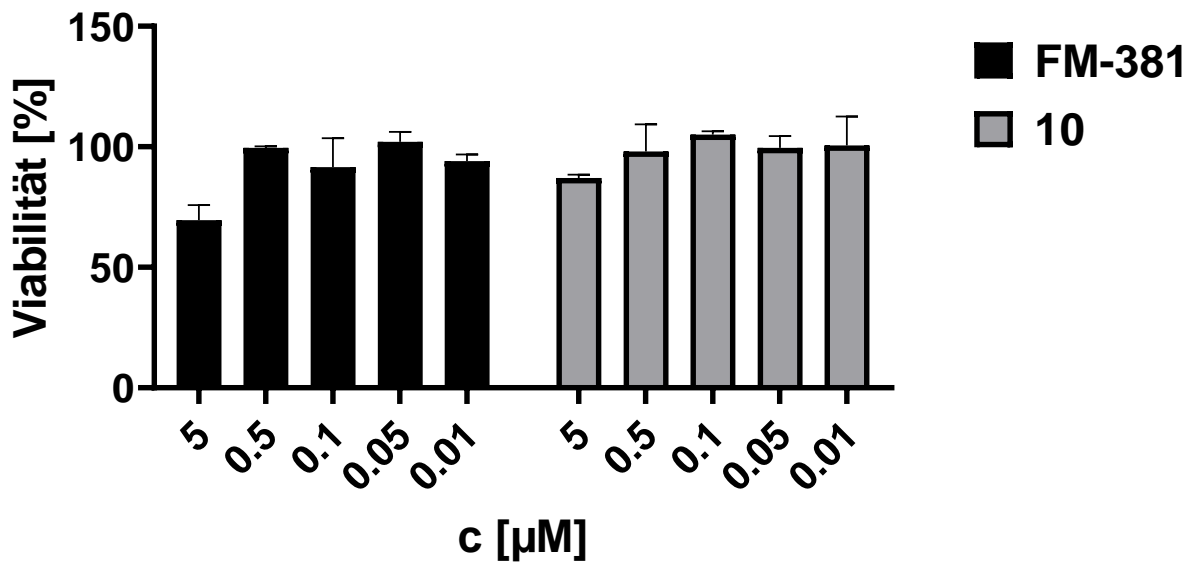


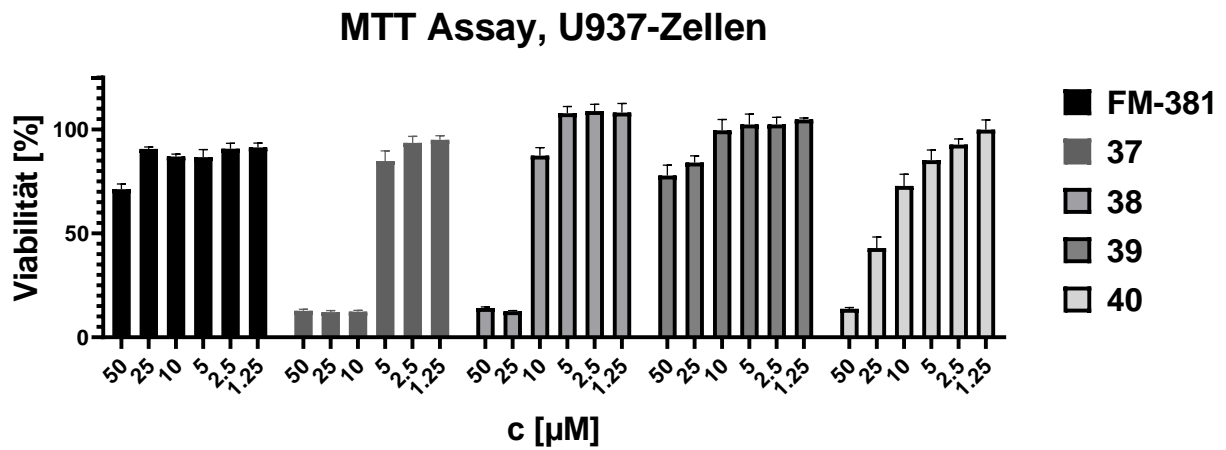
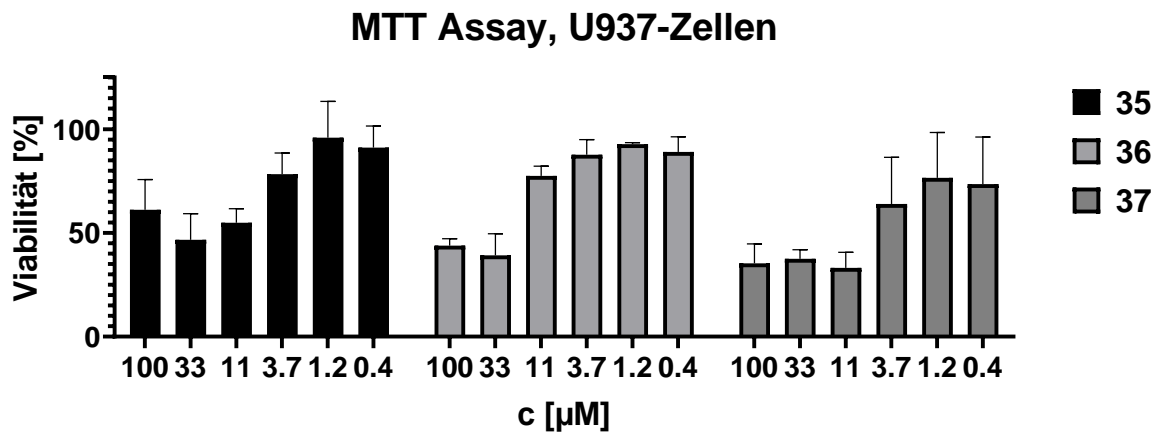
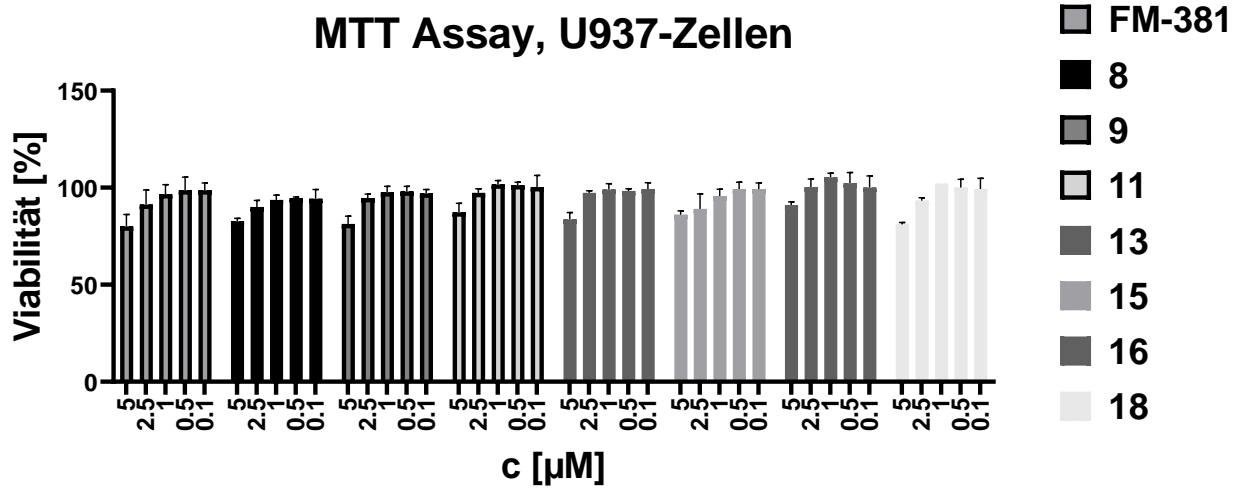
7.2.3 Zytotoxizitäts-Assays

MTT Assay, J774-Zellen

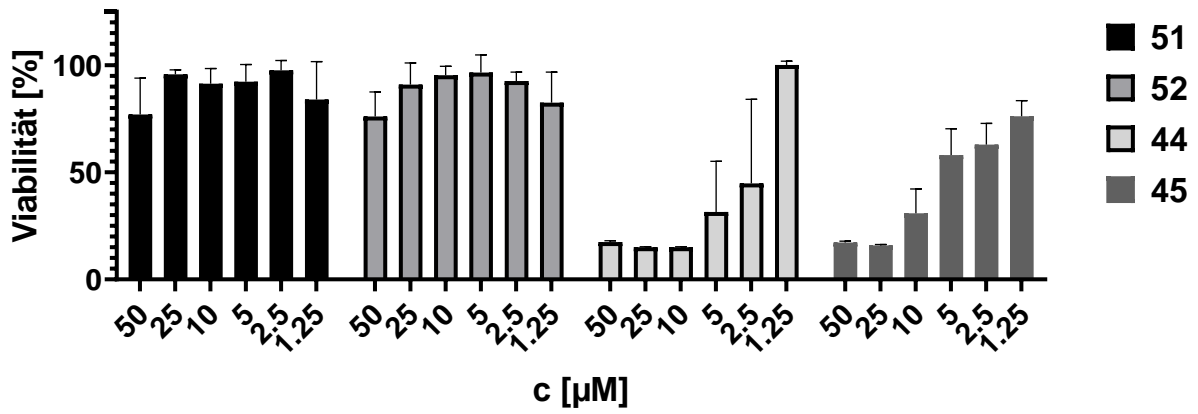


MTT Assay, U937-Zellen

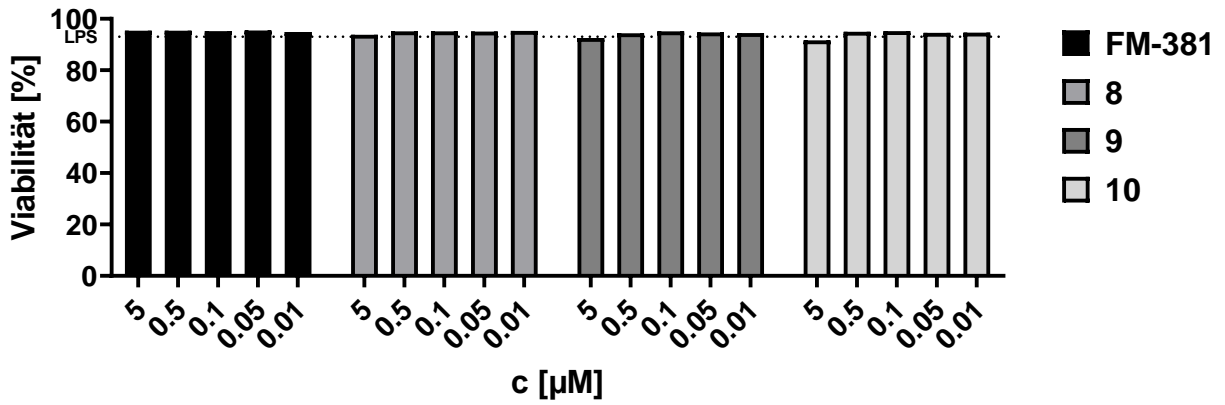




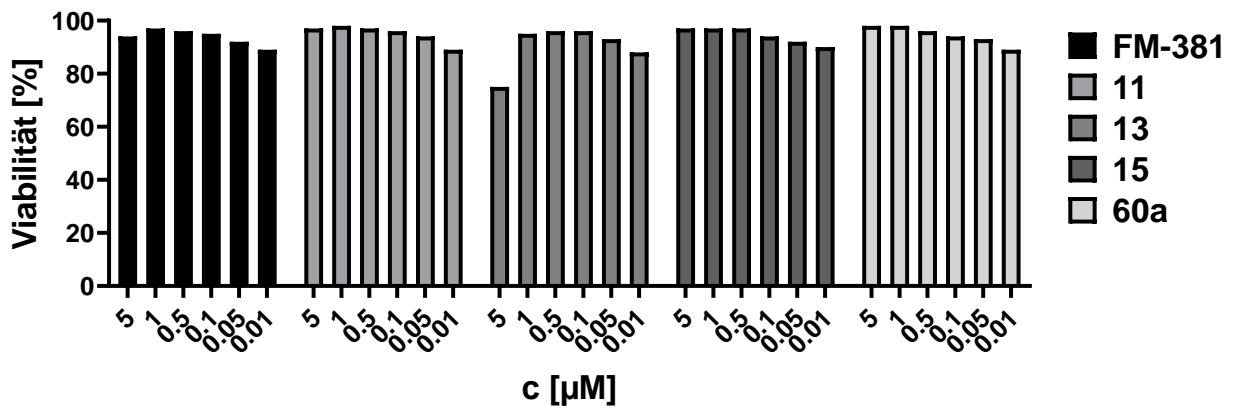
MTT Assay, U937-Zellen

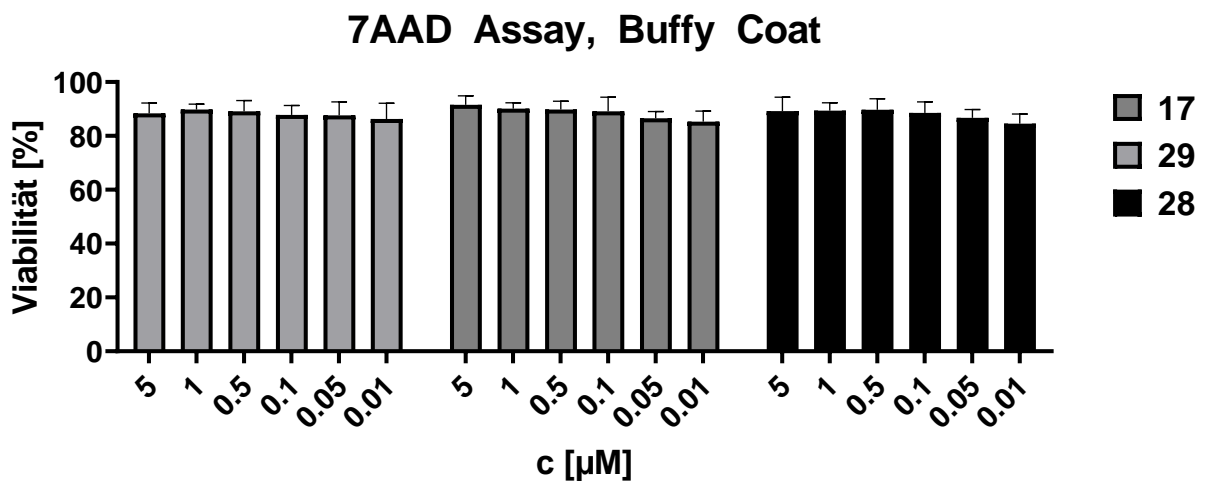
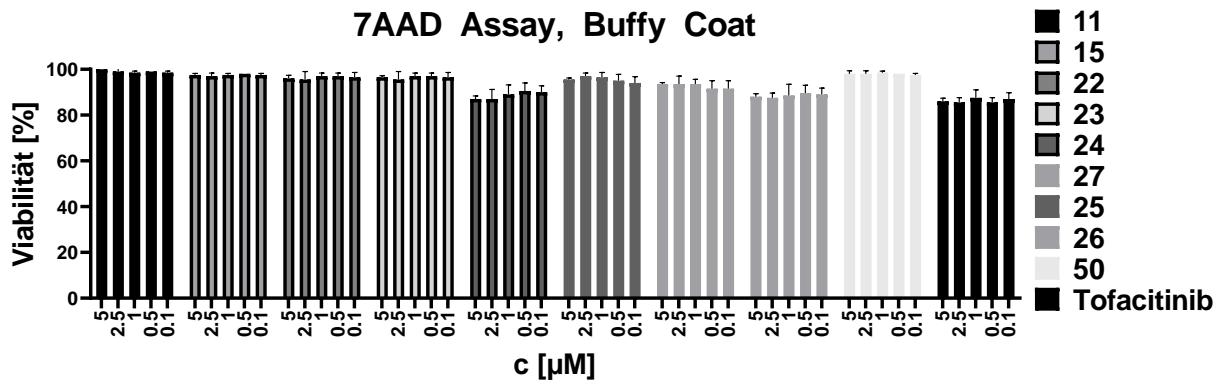


7AAD Assay, Buffy Coat



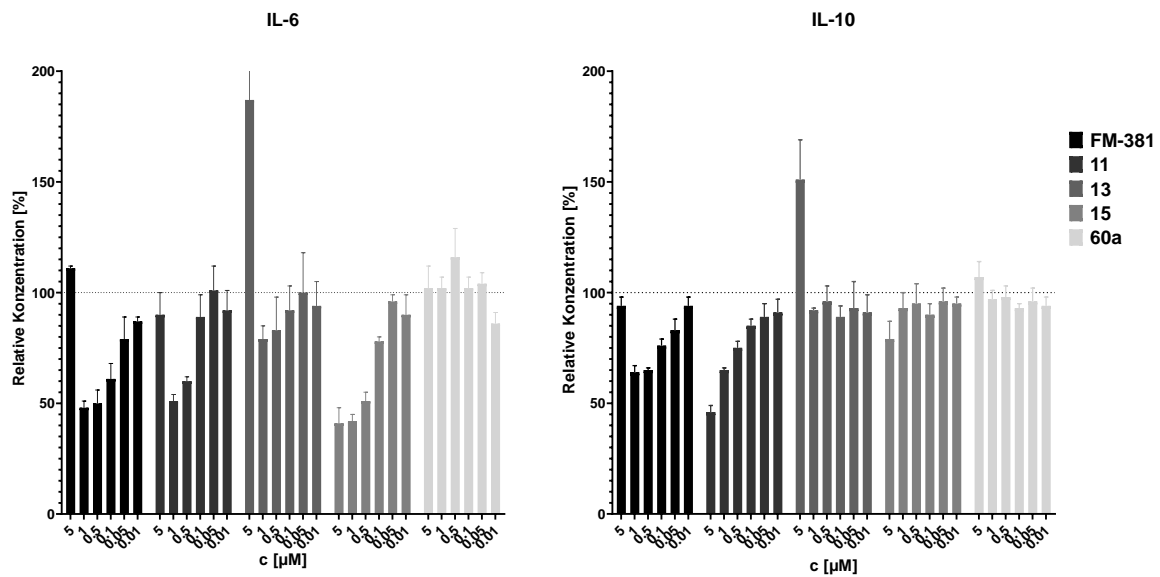
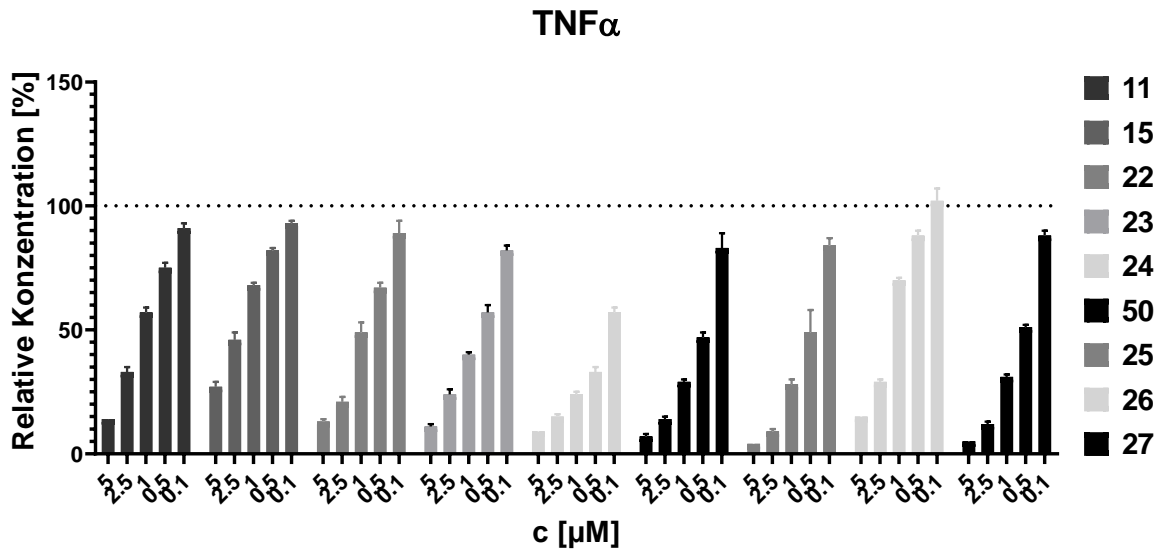
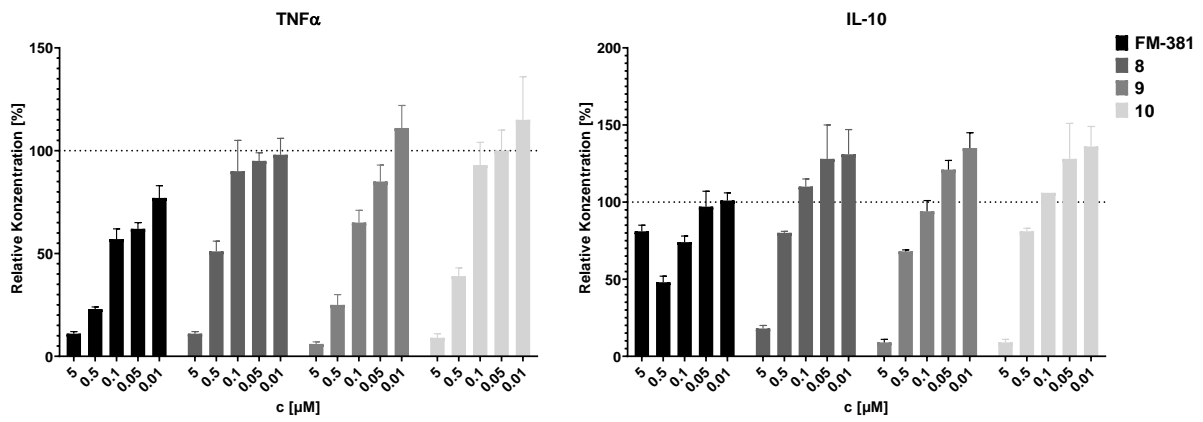
7AAD Assay, Buffy Coat

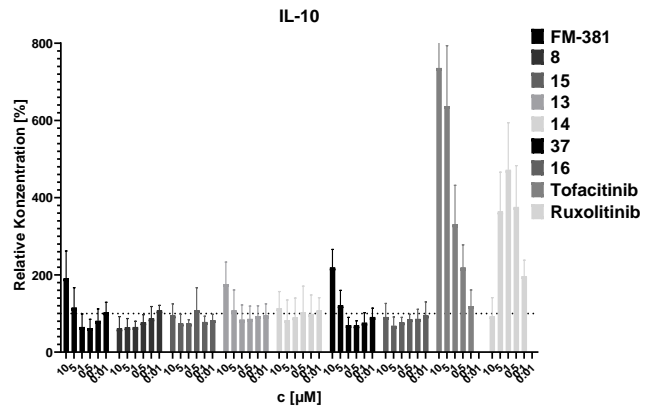
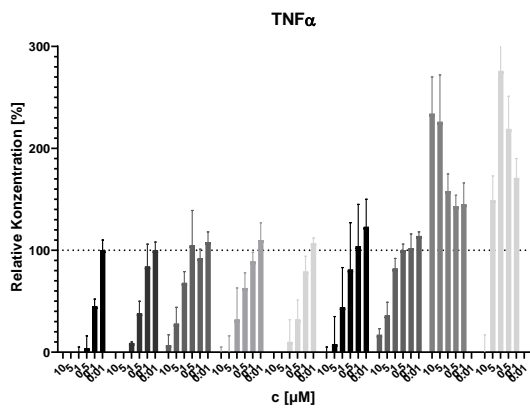
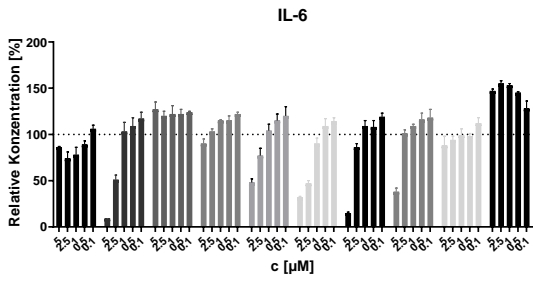
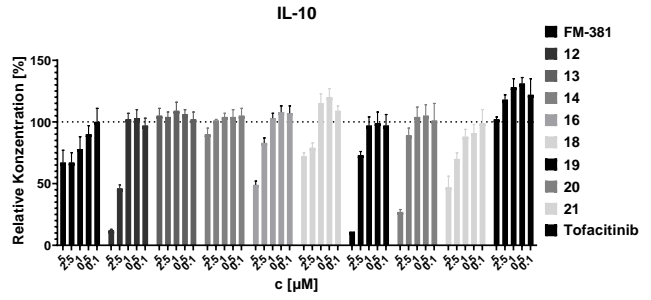
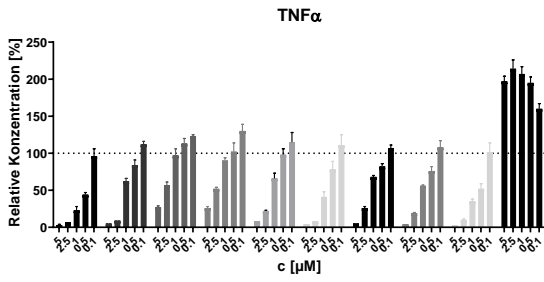


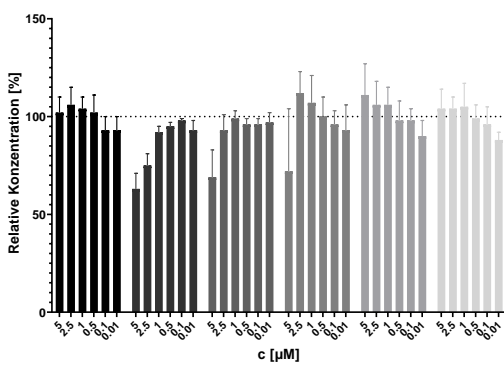
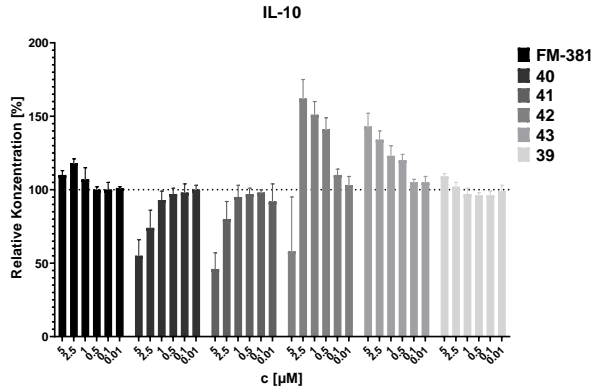
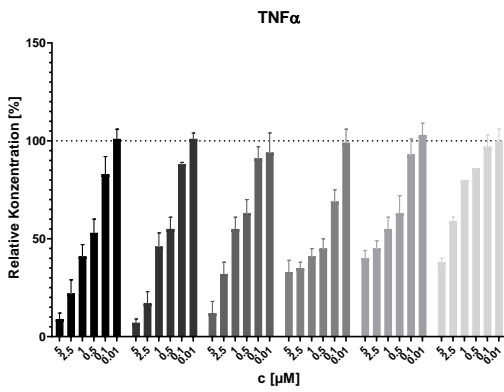
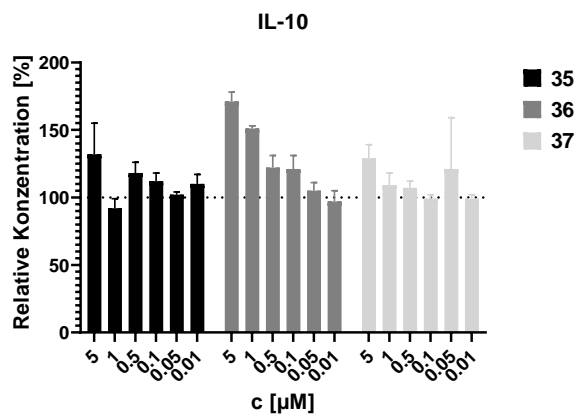
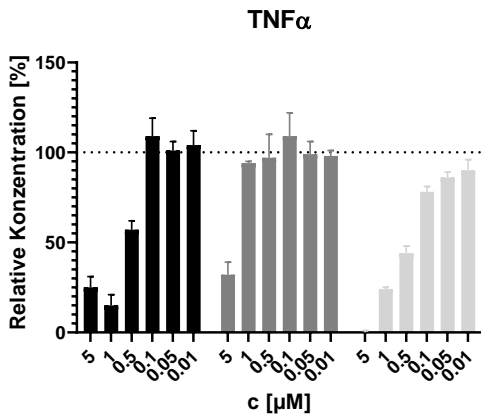
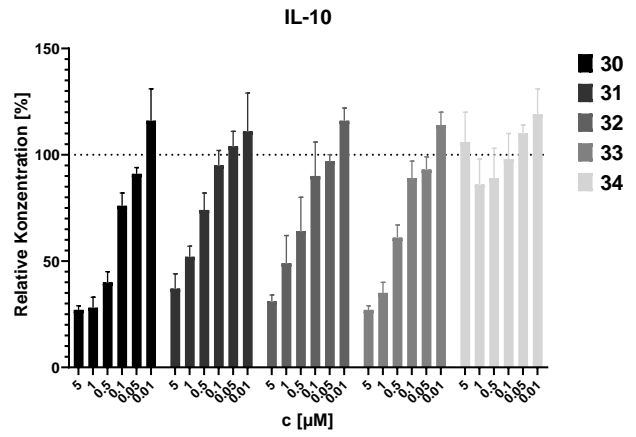
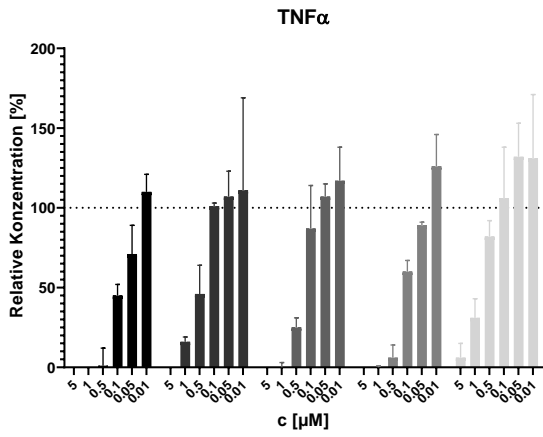


7.2.4 Weitere *in vitro* LPS-Assays

Menschlicher Buffy Coat (HBC):

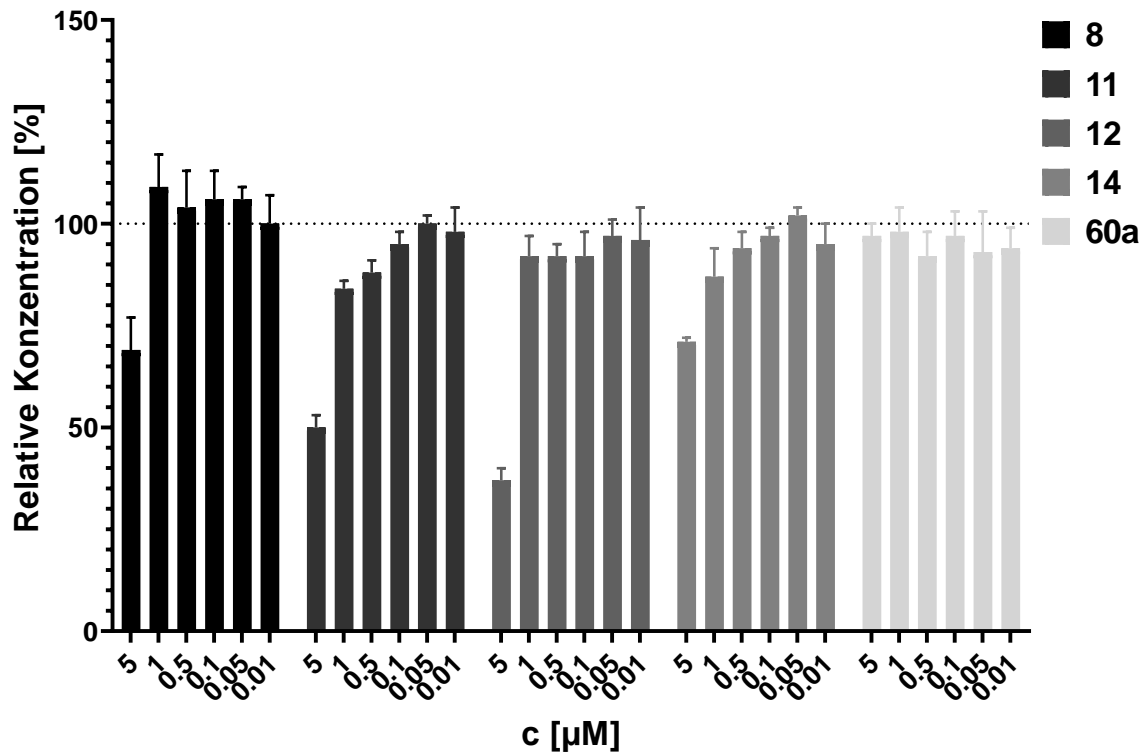




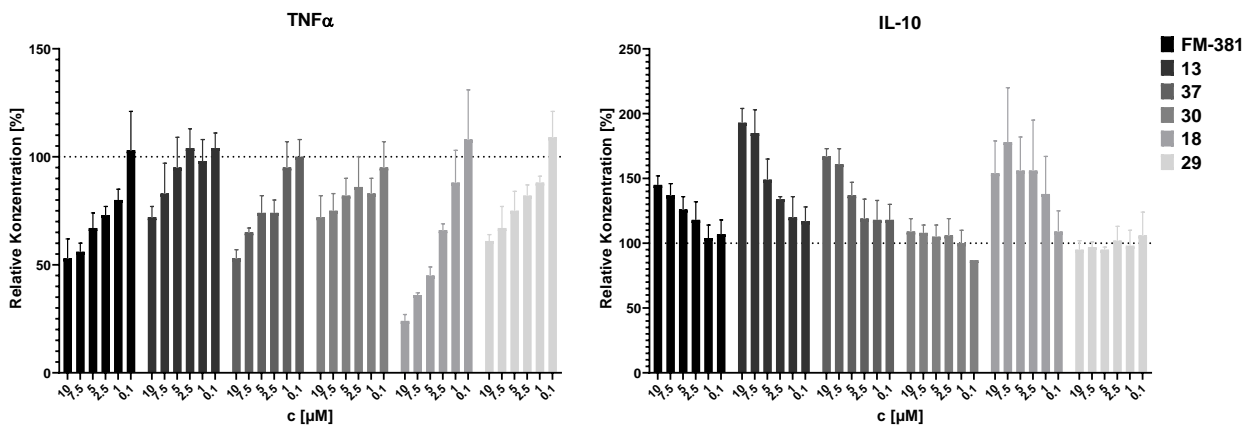


THP1 Zellen:

TNF α



Vollblut:



7.2.5 Röntgenkristallographische Daten

Table 7.1: Kristall- und Verfeinerungsdaten für **58**

Substanzcode	CSY2223
Summenformel	C ₃₇ H ₆₉ NO ₁₃
Molekülformel	C ₃₆ H ₆₅ NO ₁₂ , CH ₃ OH
Formelgewicht	735.93
Temperatur	120(2) K
Wellenlänge, Strahlungsart	0.71073Å, MoKα
Diffraktometer	STOE IPDS 2T
Kristallsystem	Orthorhombisch
Raumgruppenname, Nummer	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ , (19)
Gitterkonstanten	a = 10.2333(2) Å b = 17.4881(5) Å c = 22.6671(7) Å
Volumen	4056.53(19) Å ³
Reflexanzahl und	20585
Messbereich für Gitterkonstanten	2.50° ≤ θ ≤ 28.40°
Z	4
Dichte (berechnet)	1.205 Mg/m ³
Absorptionskoeffizient	0.090 mm ⁻¹
Methode der Absorptionskorrektur	None
F(000)	1608
Kristallgröße, Form und Farbe	0.400 x 0.500 x 0.950 mm ³ , farbloser Block
Theta Bereich der Messung	2.497 bis 27.904°.
Index Bereich	-13 ≤ h ≤ 12, -19 ≤ k ≤ 22, -29 ≤ l ≤ 25
Zahl der Reflexe:	

gemessen	15920
unabhängig	9633 [Rint = 0.0252]
beobachtet [I>2sigma(I)]	8820
Vollständigkeit bei $\Theta_{\max} = 25.2^\circ$	99.8 %
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Reflexe / Restraints / Parameter	9633 / 0 / 705
Fitgüte für F^2	1.062
Abschließende R Werte [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0394, wR2 = 0.0892
R Wert (alle Daten)	R1 = 0.0459, wR2 = 0.0937
Absoluter Strukturparameter	0.3(5)
Maximum und Minimum der diff. Map	0.346 und -0.180 eÅ ⁻³
Bemerkung	absolute Konfiguration aus Synthese

Tabelle 7.2: Kristall- und Verfeinerungsdaten für **69**

Substanzkode	jula02169
Summenformel	C ₇ H ₁₁ NO
Molekülformel	C ₇ H ₁₁ NO
Formelgewicht	125.17
Temperatur	120(2) K
Wellenlänge, Strahlungsart	0.71073Å, MoKa
Diffraktometer	STOE IPDS 2T
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppenname, Nummer	P 2 ₁ /c, (14)
Gitterkonstanten	a = 12.2066(14) Å b = 5.9164(8) Å β = 106.210(8)°

	$c = 9.6318(10) \text{ \AA}$
Volumen	$667.95(14) \text{ \AA}^3$
Reflexanzahl und	5334
Messbereich für Gitterkonstanten	$3.48^\circ \leq \theta \leq 28.18^\circ$
Z	4
Dichte (berechnet)	1.245 Mg/m^3
Absorptionskoeffizient	0.084 mm^{-1}
Methode der Absorptionskorrektur	None
F(000)	272
Kristallgröße, Form und Farbe	$0.020 \times 0.330 \times 0.510 \text{ mm}^3$, farblose Platte
Theta Bereich der Messung	3.476 bis 27.908°.
Index Bereich	$-16 \leq h \leq 15, -7 \leq k \leq 6, -9 \leq l \leq 12$
Zahl der Reflexe:	
gemessen	3148
unabhängig	1583 [Rint = 0.0441]
beobachtet [$I > 2\sigma(I)$]	1164
Vollständigkeit bei $\theta_{\text{max}} = 25.2^\circ$	99.8 %
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Reflexe / Restraints / Parameter	1583 / 0 / 122
Fitgüte für F^2	1.079
Abschließende R Werte [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0639, wR2 = 0.1434
R Wert (alle Daten)	R1 = 0.0949, wR2 = 0.1692
Maximum und Minimum der diff. Map	0.224 und -0.310 e\AA^{-3}

Tabelle 7.3: Kristall- und Verfeinerungsdaten für **7h**

Substanzcode	jula02175b
Summenformel	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄ S
Molekülformel	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄ S
Formelgewicht	412.46
Temperatur	120(2) K
Wellenlänge, Strahlungsart	1.54178Å, CuKα
Diffraktometer	STOE IPDS 2T
Kristallsystem	Orthorhombisch
Raumgruppenname, Nummer	F d d 2, (43)
Gitterkonstanten	a = 22.0627(8) Å b = 56.915(3) Å c = 5.9314(2) Å
Volumen	7448.0(5) Å ³
Reflexanzahl und	24773
Messbereich für Gitterkonstanten	3.11° ≤ θ ≤ 68.36°
Z	16
Dichte (berechnet)	1.471 Mg/m ³
Absorptionskoeffizient	1.867 mm ⁻¹
Methode der Absorptionskorrektur	Integration
Max. und min. Transmission	0.9466 und 0.5231
F(000)	3456
Kristallgröße, Form und Farbe	0.030 x 0.040 x 0.770 mm ³ , gelbe Nadel
Theta Bereich der Messung	3.106 bis 67.701°.
Index Bereich	-25 ≤ h ≤ 25, -67 ≤ k ≤ 61, -7 ≤ l ≤ 6
Zahl der Reflexe:	

gemessen	9874
unabhängig	3286 [Rint = 0.0328]
beobachtet [I>2sigma(I)]	3049
Vollständigkeit bei $\Theta_{\max} = 67.7^\circ$	99.0 %
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Reflexe / Restraints / Parameter	3286 / 1 / 267
Fitgüte für F^2	1.061
Abschließende R Werte [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0653, wR2 = 0.1643
R Wert (alle Daten)	R1 = 0.0749, wR2 = 0.1831
Absoluter Strukturparameter	0.03(5)
Maximum und Minimum der diff. Map	0.643 und -0.421 eÅ ⁻³
Bemerkung	NH lokalisiert und Koordinaten verfeinert.

8 Literaturverzeichnis

- (1) Ubersax, J. A.; Ferrell Jr, J. E. Mechanisms of Specificity in Protein Phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **2007**, *8* (7), 530–541. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>.
- (2) Cohen, P. Protein Kinases—the Major Drug Targets of the Twenty-First Century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (4), 309–315. <https://doi.org/10.1038/nrd773>.
- (3) Cohen, P. The Origins of Protein Phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4* (5), E127–E130. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e127>.
- (4) Forster, M. Scaffold-Hopping-Strategie Zur Entwicklung Neuer Kovalenter Januskinase 3 Inhibitoren Mit Hoher Isoform Selektivität. Tübingen 2018.
- (5) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science (80-.)*. **2002**, *298* (5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- (6) Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten Things You Should Know about Protein Kinases: IUPHAR R Eview 14. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (11), 2675–2700. <https://doi.org/10.1111/bph.13096>.
- (7) Lemmon, M. A.; Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **2010**, *141* (7), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- (8) Neet, K.; Hunter, T. Vertebrate Non-receptor Protein–Tyrosine Kinase Families. *Genes to Cells* **1996**, *1* (2), 147–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.d01-234.x>.
- (9) Babon, J. J.; Lucet, I. S.; Murphy, J. M.; Nicola, N. A.; Varghese, L. N. The Molecular Regulation of Janus Kinase (JAK) Activation. *Biochem. J.* **2014**, *462* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20140712>.
- (10) Boggon, T. J.; Li, Y.; Manley, P. W.; Eck, M. J. Crystal Structure of the Jak3 Kinase Domain in Complex with a Staurosporine Analog. *Blood* **2005**, *106* (3), 996–1002. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0707>.
- (11) Huse, M.; Kuriyan, J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **2002**, *109* (3), 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00741-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00741-9).
- (12) Kornev, A. P.; Taylor, S. S. Defining the Conserved Internal Architecture of a Protein Kinase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteomics* **2010**, *1804* (3), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>.
- (13) Shaw, A. S.; Kornev, A. P.; Hu, J.; Ahuja, L. G.; Taylor, S. S. Kinases and Pseudokinases: Lessons from RAF. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34* (9), 1538–1546. <https://doi.org/10.1128/MCB.00057-14>.
- (14) Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F. Surface Comparison of Active and Inactive Protein Kinases Identifies a Conserved Activation Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (47), 17783–17788. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607656103>.
- (15) Traxler, P.; Furet, P. Strategies toward the Design of Novel and Selective Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82* (2–3), 195–206. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00044-8).
- (16) Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Jänne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.;

- Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352* (8), 786–792. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044238>.
- (17) Chrencik, J. E.; Patny, A.; Leung, I. K.; Korniski, B.; Emmons, T. L.; Hall, T.; Weinberg, R. A.; Gormley, J. A.; Williams, J. M.; Day, J. E.; Hirsch, J. L.; Kiefer, J. R.; Leone, J. W.; Fischer, H. D.; Sommers, C. D.; Huang, H.; Jacobsen, E. J.; Tenbrink, R. E.; Tomasselli, A. G.; Benson, T. E. Structural and Thermodynamic Characterization of the TYK2 and JAK3 Kinase Domains in Complex With. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400* (3), 413–433. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.020>.
- (18) Haan, C.; Behrmann, I.; Haan, S. Perspectives for the Use of Structural Information and Chemical Genetics to Develop Inhibitors of Janus Kinases. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14* (3), 504–527. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01018.x>.
- (19) Saharinen, P.; Takaluoma, K.; Silvennoinen, O. Regulation of the Jak2 Tyrosine Kinase by Its Pseudokinase Domain. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (10), 3387–3395. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.10.3387-3395.2000>.
- (20) Radtke, S.; Haan, S.; Jörissen, A.; Hermanns, H. M.; Diefenbach, S.; Smyczek, T.; Schmitz-Vandeleur, H.; Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Haan, C. The Jak1 SH2 Domain Does Not Fulfill a Classical SH2 Function in Jak/STAT Signaling but Plays a Structural Role for Receptor Interaction and Up-Regulation of Receptor Surface Expression*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (27), 25760–25768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500822200>.
- (21) Lietha, D.; Cai, X.; Ceccarelli, D. F. J.; Li, Y.; Schaller, M. D.; Eck, M. J. Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell* **2007**, *129* (6), 1177–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.041>.
- (22) Haan, C.; Rolvering, C.; Raulf, F.; Kapp, M.; Drückes, P.; Thoma, G.; Behrmann, I.; Zerwes, H.-G. Jak1 Has a Dominant Role over Jak3 in Signal Transduction through Γ -Containing Cytokine Receptors. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (3), 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.01.012>.
- (23) Choy, E. H. Clinical Significance of Janus Kinase Inhibitor Selectivity. *Rheumatology* **2019**, *58* (6), 953–962. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez002>.
- (24) Leonard, W. J.; Shea, J. J. O. JAKs and STATs: Biological Implications. *Annu Rev Immunol.* **1998**, *16*, 293–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.293>.
- (25) Marshall, C. J. Specificity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Transient versus Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cell* **1995**, *80* (2), 179–185. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8).
- (26) Braunstein, J.; Brutsaert, S.; Olson, R.; Schindler, C. STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (36), 34133–34140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304531200>.
- (27) Reich, N. C. STATs Get Their Move On. *Jak-stat* **2013**, *2* (4), e27080. <https://doi.org/10.4161/jkst.27080>.
- (28) Shuai, K.; Liu, B. Regulation of JAK–STAT Signalling in the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (11), 900–911. <https://doi.org/10.1038/nri1226>.
- (29) Xu, D.; Qu, C.-K. Protein Tyrosine Phosphatases in the JAK/STAT Pathway. *Front. Biosci. a J. virtual Libr.* **2008**, *13*, 4925. <https://doi.org/10.2741/3051>.

- (30) Niu, G.; Xu, J.; Yuan, W.; Sun, J.; Yang, M.; Wang, J. Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) Negatively Regulates the JAK / STAT Pathway by Inhibiting STAT Phosphorylation and Translocation Immune Challenge and Tissue Collection. *Front Immunol.* **2018**, *9* (2392). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02392>.
- (31) Rakesh, K.; Agrawal, D. K. Controlling Cytokine Signaling by Constitutive Inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70* (5), 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.042>.
- (32) Baker, B. J.; Akhtar, L. N.; Benveniste, E. N. SOCS1 and SOCS3 in the Control of CNS Immunity. *Trends Immunol.* **2009**, *30* (8), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.001>.
- (33) Igaz, P.; Toth, S.; Falus, A. Biological and Clinical Significance of the JAK-STAT Pathway; Lessons from Knockout Mice. *Inflamm. Res.* **2001**, *50* (9), 435–441. <https://doi.org/10.1007/PL00000267>.
- (34) Icardi, L.; De Bosscher, K.; Tavernier, J. The HAT/HDAC Interplay: Multilevel Control of STAT Signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2012**, *23* (6), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.08.002>.
- (35) Cao, X.; Shores, E. W.; Hu-Li, J.; Anver, M. R.; Kelsail, B. L.; Russell, S. M.; Drago, J.; Noguchi, M.; Grinberg, A.; Bloom, E. T. Defective Lymphoid Development in Mice Lacking Expression of the Common Cytokine Receptor γ Chain. *Immunity* **1995**, *2* (3), 223–238. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90047-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90047-0).
- (36) Minegishi, Y. Hyper-IgE Syndrome. *Curr. Opin. Immunol.* **2009**, *21* (5), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.07.013>.
- (37) Jeong, E. G.; Kim, M. S.; Nam, H. K.; Min, C. K.; Lee, S.; Chung, Y. J.; Yoo, N. J.; Lee, S. H. Somatic Mutations of JAK1 and JAK3 in Acute Leukemias and Solid Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (12), 3716–3721. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4839>.
- (38) Del Bel, K. L.; Ragotte, R. J.; Saferali, A.; Lee, S.; Vercauteren, S. M.; Mostafavi, S. A.; Schreiber, R. A.; Prendiville, J. S.; Phang, M. S.; Halparin, J. JAK1 Gain-of-Function Causes an Autosomal Dominant Immune Dysregulatory and Hypereosinophilic Syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139* (6), 2016–2020. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.957>.
- (39) Zhao, R.; Xing, S.; Li, Z.; Fu, X.; Li, Q.; Krantz, S. B.; Zhao, Z. J. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (24), 22788–22792. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500138200>.
- (40) Nairismägi, M.-L.; Gerritsen, M. E.; Li, Z. M.; Wijaya, G. C.; Chia, B. K. H.; Laurensia, Y.; Lim, J. Q.; Yeoh, K. W.; Yao, X. S.; Pang, W. L. Oncogenic Activation of JAK3-STAT Signaling Confers Clinical Sensitivity to PRN371, a Novel Selective and Potent JAK3 Inhibitor, in Natural Killer/T-Cell Lymphoma. *Leukemia* **2018**, *32* (5), 1147–1156. <https://doi.org/10.1038/s41375-017-0004-x>.
- (41) Walters, D. K.; Mercher, T.; Gu, T.; Hare, T. O.; Tyner, J. W.; Loriaux, M.; Goss, V. L.; Lee, K. A.; Eide, C. A.; Wong, M. J.; Stoffregen, E. P.; McGreevey, L.; Nardone, J.; Moore, S. A.; Crispino, J.; Boggon, T. J.; Heinrich, M. C.; Deininger, M. W.; Polakiewicz, R. D.; Gilliland, D. G.; Druker, B. J. Activating Alleles of JAK3 in Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **2006**, *10* (1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.002>.

- (42) L Alicea-Velazquez, N.; J Boggon, T. The Use of Structural Biology in Janus Kinase Targeted Drug Discovery. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12* (4), 546–555. <https://doi.org/10.2174/138945011794751528>.
- (43) Chrencik, J. E.; Patny, A.; Leung, I. K.; Korniski, B.; Emmons, T. L.; Hall, T.; Weinberg, R. A.; Gormley, J. A.; Williams, J. M.; Day, J. E. Structural and Thermodynamic Characterization of the TYK2 and JAK3 Kinase Domains in Complex with CP-690550 and CMP-6. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400* (3), 413–433. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.020>.
- (44) H Johansson, M. Reversible Michael Additions: Covalent Inhibitors and Prodrugs. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12* (13), 1330–1344. <https://doi.org/10.2174/13895575112091330>.
- (45) Forster, M.; Chaikuad, A.; Bauer, S. M.; Holstein, J.; Robers, M. B.; Corona, C. R.; Gehringer, M.; Pfaffenrot, E.; Ghoreschi, K.; Knapp, S.; Laufer, S. A. Selective JAK3 Inhibitors with a Covalent Reversible Binding Mode Targeting a New Induced Fit Binding Pocket. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (11), 1335–1340. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.10.008>.
- (46) Kalmanti, L.; Saußebe, S.; Lauseker, M.; Müller, M. C.; Dietz, C. T.; Heinrich, L.; Hanfstein, B.; Proetel, U.; Fabarius, A.; Krause, S. W. Safety and Efficacy of Imatinib in CML over a Period of 10 Years: Data from the Randomized CML-Study IV. *Leukemia* **2015**, *29* (5), 1123–1132. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.36>.
- (47) Shoumariyeh, K.; Bubnoff, N. Long-Term Safety and Efficacy of Dasatinib in the Treatment of Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant or Intolerant to Imatinib. *Blood Lymphat. Cancer Targets Ther.* **2014**, *2014*, 81–89. <https://doi.org/10.2147/BLCTT.S48319>.
- (48) Roskoski Jr, R. Classification of Small Molecule Protein Kinase Inhibitors Based upon the Structures of Their Drug-Enzyme Complexes. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 26–48. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.021>.
- (49) Lamba, V.; Ghosh, I. New Directions in Targeting Protein Kinases: Focusing upon True Allosteric and Bivalent Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (20), 2936–2945. <https://doi.org/10.2174/138161212800672813>.
- (50) Liu, Q.; Sabnis, Y.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Buhrlage, S. J.; Jones, L. H.; Gray, N. S. Developing Irreversible Inhibitors of the Protein Kinase Cysteinome. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (2), 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.12.006>.
- (51) Krishnan, S.; Miller, R. M.; Tian, B.; Mullins, R. D.; Jacobson, M. P.; Taunton, J. Design of Reversible, Cysteine-Targeted Michael Acceptors Guided by Kinetic and Computational Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (36), 12624–12630. <https://doi.org/10.1021/ja505194w>.
- (52) Serafimova, I. M.; Pufall, M. A.; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frödin, M.; Taunton, J. Reversible Targeting of Noncatalytic Cysteines with Chemically Tuned Electrophiles. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (5), 471–476. <https://doi.org/10.1038/nchembio.925>.
- (53) Fishbein, J. C.; Jencks, W. P. Elimination Reactions of .Beta.-Cyano Thioethers: Evidence for a Carbanion Intermediate and a Change in Rate-Limiting Step. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (15), 5075–5086. <https://doi.org/10.1021/ja00223a028>.

- (54) Przepiorka, D.; Luo, L.; Subramaniam, S.; Qiu, J.; Gudi, R.; Cunningham, L. C.; Nie, L.; Leong, R.; Ma, L.; Sheth, C.; Deisseroth, A.; Goldberg, K. B.; Blumenthal, G. M.; Pazdur, R. FDA Approval Summary: Ruxolitinib for Treatment of Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease. *Oncologist* **2020**, *25* (2), e328–e334. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0627>.
- (55) Papp, K.; Szepietowski, J. C.; Kircik, L.; Toth, D.; Eichenfield, L. F.; Leung, D. Y. M.; Forman, S. B.; Venturanza, M. E.; Sun, K.; Kuligowski, M. E.; Simpson, E. L. Efficacy and Safety of Ruxolitinib Cream for the Treatment of Atopic Dermatitis: Results from 2 Phase 3, Randomized, Double-Blind Studies. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2021**, *85* (4), 863–872. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.04.085>.
- (56) Al-Salama, Z. T.; Scott, L. J. Baricitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **2018**, *78* (7), 761–772. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0908-4>.
- (57) Ely, E. W.; Ramanan, A. V.; Kartman, C. E.; de Bono, S.; Liao, R.; Piruzeli, M. L. B.; Goldman, J. D.; Saraiva, J. F. K.; Chakladar, S.; Marconi, V. C.; Alatorre-Alexander, J.; Altclas, J. D.; Casas, M.; CevoliRecio, V.; Ellerin, T.; Giovanni Luz, K.; Goldman, J. D.; Juliani Souza Lima, M. P.; Khan, A.; Paulin, P.; Procopio Carvalho, A. C.; Rojas Velasco, G.; Saraiva, J. F. K.; Shawa, I.; Simon Campos, J.; Tiffany, B.; Westheimer Cavalcante, A. Efficacy and Safety of Baricitinib plus Standard of Care for the Treatment of Critically Ill Hospitalised Adults with COVID-19 on Invasive Mechanical Ventilation or Extracorporeal Membrane Oxygenation: An Exploratory, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet Respir. Med.* **2022**. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00006-6).
- (58) Tanaka, Y.; Kavanaugh, A.; Wicklund, J.; McInnes, I. B. Filgotinib, a Novel JAK1-Preferential Inhibitor for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: An Overview from Clinical Trials. *Mod. Rheumatol.* **2022**, *32* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/14397595.2021.1902617>.
- (59) Tanaka, Y. A Review of Upadacitinib in Rheumatoid Arthritis. *Mod. Rheumatol.* **2020**, *30* (5), 779–787. <https://doi.org/10.1080/14397595.2020.1782049>.
- (60) Dhillon, S. Delgocitinib: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (6), 609–615. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01291-2>.
- (61) Angelini, J.; Talotta, R.; Roncato, R.; Fornasier, G.; Barbiero, G.; Dal Cin, L.; Brancati, S.; Scaglione, F. JAK-Inhibitors for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Focus on the Present and an Outlook on the Future. *Biomolecules* . 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10071002>.
- (62) Kvist-Hansen, A.; Hansen, P. R.; Skov, L. Systemic Treatment of Psoriasis with JAK Inhibitors: A Review. *Dermatol. Ther. (Heidelb)*. **2020**, *10* (1), 29–42. <https://doi.org/10.1007/s13555-019-00347-w>.
- (63) Ferrante, M.; Sabino, J. Efficacy of JAK Inhibitors in Ulcerative Colitis. *J. Crohn's Colitis* **2020**, *14* (Supplement_2), S737–S745. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz202>.
- (64) Clark, J. D.; Flanagan, M. E.; Telliez, J.-B. Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (12), 5023–5038. <https://doi.org/10.1021/jm401490p>.
- (65) van Vollenhoven, R.; Lee, E. B.; Strengholt, S.; Mojcik, C.; Valdez, H.; Krishnaswami, S.; Biswas, P.; Lazariciu, I.; Hazra, A.; Clark, J. D.; Hodge, J.; Wang, L.; Choy, E. Evaluation of the Short-, Mid-, and Long-Term Effects of Tofacitinib on Lymphocytes in

- Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **2019**, *71* (5), 685–695. <https://doi.org/10.1002/art.40780>.
- (66) Ytterberg, S. R.; Bhatt, D. L.; Mikuls, T. R.; Koch, G. G.; Fleischmann, R.; Rivas, J. L.; Germino, R.; Menon, S.; Sun, Y.; Wang, C.; Shapiro, A. B.; Kanik, K. S.; Connell, C. A. Cardiovascular and Cancer Risk with Tofacitinib in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386* (4), 316–326. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2109927>.
- (67) European Medicines Agency. Increased Risk of Blood Clots in Lungs and Death with Higher Dose of Xeljanz (Tofacitinib) for Rheumatoid Arthritis. 2019.
- (68) Administration, U. S. F. and D. Safety Trial Finds Risk of Blood Clots in the Lungs and Death with Higher Dose of Tofacitinib (Xeljanz, Xeljanz XR) in Rheumatoid Arthritis Patients; FDA to Investigate. 2019. URL <https://www.fda.gov/media/12048> **2019**, *5*.
- (69) Weinblatt, M.; Taylor, P. C.; Burmester, G. R.; Witt, S.; Saifan, C.; Walls, C.; Rooney, T. P.; Chen, L.; Takeuchi, T. Cardiovascular Safety during Treatment with Baricitinib in Rheumatoid Arthritis. **2017**. <https://doi.org/10.1002/art.40321>.
- (70) Genovese, M. C.; Fleischmann, R.; Combe, B.; Hall, S.; Rubbert-Roth, A.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Mohamed, M.-E. F.; Meerwein, S.; Pangan, A. L. Safety and Efficacy of Upadacitinib in Patients with Active Rheumatoid Arthritis Refractory to Biologic Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs (SELECT-BEYOND): A Double-Blind, Randomised Controlled Phase 3 Trial. *Lancet* **2018**, *391* (10139), 2513–2524. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31116-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31116-4).
- (71) Jiang, J.; Ghoreschi, K.; Deflorian, F.; Chen, Z.; Perreira, M.; Pesu, M.; Smith, J.; Nguyen, D.-T.; Liu, E. H.; Leister, W. Examining the Chirality, Conformation and Selective Kinase Inhibition of 3-((3 R, 4 R)-4-Methyl-3-(Methyl (7H-Pyrrolo [2, 3-d] Pyrimidin-4-Yl) Amino) Piperidin-1-Yl)-3-Oxopropanenitrile (CP-690,550). *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (24), 8012–8018. <https://doi.org/10.1021/jm801142b>.
- (72) Forster, M.; Chaikuad, A.; Dimitrov, T.; Döring, E.; Holstein, J.; Berger, B. T.; Gehringer, M.; Ghoreschi, K.; Müller, S.; Knapp, S.; Laufer, S. A. Development, Optimization, and Structure-Activity Relationships of Covalent-Reversible JAK3 Inhibitors Based on a Tricyclic Imidazo[5,4- d]Pyrrolo[2,3- b]Pyridine Scaffold. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (12), 5350–5366. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00571>.
- (73) Drew, R. H.; Gallis, H. A. Azithromycin—Spectrum of Activity, Pharmacokinetics, and Clinical Applications. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **1992**, *12* (3), 161–173. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1992.tb04504.x>.
- (74) Jelić, D.; Antolović, R. From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials. *Antibiotics*. 2016. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5030029>.
- (75) Svetlov, M. S.; Syroegin, E. A.; Aleksandrova, E. V.; Atkinson, G. C.; Gregory, S. T.; Mankin, A. S.; Polikanov, Y. S. Structure of Erm-Modified 70S Ribosome Reveals the Mechanism of Macrolide Resistance. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17* (4), 412–420. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00715-0>.
- (76) Fiese, E. F.; Steffen, S. H. Comparison of the Acid Stability of Azithromycin and Erythromycin A. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**, *25* (suppl_A), 39–47. https://doi.org/10.1093/jac/25.suppl_A.39.
- (77) Bakheit, A. H. H.; Al-Hadiya, B. M. H.; Abd-Elgalil, A. A. Chapter One - Azithromycin; Brittain Excipients and Related Methodology, H. G. B. T.-P. of D. S., Ed.; Academic

- Press, 2014; Vol. 39, pp 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00001-5>.
- (78) Giudicessi, J. R.; Ackerman, M. J.; Camilleri, M. Cardiovascular Safety of Prokinetic Agents: A Focus on Drug-Induced Arrhythmias. *Neurogastroenterol. Motil.* **2018**, *30* (6), e13302. <https://doi.org/10.1111/nmo.13302>.
- (79) Thomsen, M. B.; Beekman, J. D. M.; Attevelt, N. J. M.; Takahara, A.; Sugiyama, A.; Chiba, K.; Vos, M. A. No Proarrhythmic Properties of the Antibiotics Moxifloxacin or Azithromycin in Anaesthetized Dogs with Chronic-AV Block. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149* (8), 1039–1048. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706900>.
- (80) Cárceles, C. M.; Fernández-Varón, E.; Marín, P.; Escudero, E. Tissue Disposition of Azithromycin after Intravenous and Intramuscular Administration to Rabbits. *Vet. J.* **2007**, *174* (1), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.05.022>.
- (81) Van Bambeke, F.; Tulkens, P. Macrolides: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *18 Suppl 1*, S17-23. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00406-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00406-X).
- (82) Foulds, G.; Shepard, R. M.; Johnson, R. B. The Pharmacokinetics of Azithromycin in Human Serum and Tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**, *25* (suppl_A), 73–82. https://doi.org/10.1093/jac/25.suppl_A.73.
- (83) Kwiatkowska, B.; Maślińska, M. Macrolide Therapy in Chronic Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm.* **2012**, *2012*, 636157. <https://doi.org/10.1155/2012/636157>.
- (84) Venditto, V. J.; Haydar, D.; Abdel-Latif, A.; Gensel, J.; Anstead, M. I.; Pitts, M. G.; Creameans, J. W.; Kopper, T. J.; Peng, C.; Feola, D. J. Immunomodulatory Effects of Azithromycin Revisited: Potential Applications to COVID-19. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 285. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.574425>.
- (85) Burnet, M.; Guse, J.-H.; Gutke, H.-J.; Guillot, L.; Laufer, S.; Hahn, U.; Seed, M.; Vallejo, E.; Eggers, M.; McKenzie, D.; Albrecht, W.; Parnham, M. Anti-Inflammatory Macrolides to Manage Chronic Neutrophilic Inflammation. In *Macrocycles in Drug Discovery*, 2014; pp 206–234. <https://doi.org/10.1039/9781782623113>.
- (86) Gutke, H.-J.; Burnet, M.; Guse, J.-H. Macrocyclic Compounds and Methods of Use Thereof. US8461120, 2010.
- (87) Parnham, M. J.; Erakovic, V.; Giamarellos-bourboulis, E. J.; Perletti, G.; Verleden, G. M.; Vos, R. Azithromycin: Mechanisms of Action and Their Relevance for Clinical Applications. *Pharmacol Ther.* **2014**, *143* (2), 225–245. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.003>.
- (88) Kanoh, S.; Rubin, B. K. Mechanisms of Action and Clinical Application of Macrolides as Immunomodulatory Medications. *Clin Microbiol Rev.* **2010**, *23* (3), 590–615. <https://doi.org/10.1128/CMR.00078-09>.
- (89) Burnet, M.; Guse, J.; Bauerlein, C.; Hahn, U. Kinase Modulators for the Treatment of Cancer. US20130045938A1, 2013.
- (90) Burnet, M.; Guse, J.-H.; Gutke, H.-J.; Beck, A.; Tsotsou, G.; Droste-Borel, I.; Reichert, J.; Luyten, K.; Busch, M.; Wolff, M.; Khobzaoui, M.; Margutti, S.; Meindl, T.; Kim, G.; Barker, L. Conjugates of Biologically Active Compounds, Methods for Their Preparation and Use, Formulation and Pharmaceutical Applications Thereof. US7579324B2, 2009.
- (91) Aridos, G.; Laali, K. K. Ethylammonium Nitrate (EAN)/Tf2O and EAN/TFAA: Ionic Liquid

- Based Systems for Aromatic Nitration. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (19), 8088–8094. <https://doi.org/10.1021/jo201374a>.
- (92) Shackelford, S. A.; Anderson, M. B.; Christie, L. C.; Goetzen, T.; Guzman, M. C.; Hananel, M. A.; Kornreich, W. D.; Li, H.; Pathak, V. P.; Rabinovich, A. K. Electrophilic Tetraalkylammonium Nitrate Nitration. II. Improved Anhydrous Aromatic and Heteroaromatic Mononitration with Tetramethylammonium Nitrate and Triflic Anhydride, Including Selected Microwave Examples. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (2), 267–275. <https://doi.org/10.1021/jo026202q>.
- (93) Zelenov, V. P.; Bukalov, S. S.; Leites, L. A.; Aysin, R. R.; Subbotin, A. N.; Struchkova, M. I.; Fedyanin, I. V. Trifluoroacetyl Nitrate. *Mendeleev Commun.* **2017**, *1* (27), 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.01.009>.
- (94) Gillard, J. R.; Beaulieu, P. L. Oxone®-Mediated Synthesis of Benzimidazoles from 1, 2-Phenylenediamines and Aldehydes: Preparation of 2-(4-Cyano-Phenyl)-1-[2-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-Ethyl]-1H-Benzimidazole-5-Carboxylic Acid Ethyl Ester. *Org. Synth.* **2003**, *89*, 131–142. <https://doi.org/10.1002/0471264229.os089.15>.
- (95) Dess, D. B.; Martin, J. C. Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (22), 4155–4156. <https://doi.org/10.1021/jo00170a070>.
- (96) Mandal, S. B.; Achari, B.; Chattopadhyay, S. A Convenient Reduction of Substituted Amino-Acid Esters. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* (12), 1647–1650. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)91697-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91697-6).
- (97) Straß, S.; Schwamborn, A.; Keppler, M.; Cloos, N.; Guezguez, J.; Guse, J.; Burnet, M.; Laufer, S. Synthesis, Characterization, and in Vivo Distribution of Intracellular Delivered Macrolide Short-Chain Fatty Acid Derivatives. *ChemMedChem* **2021**, *16* (14), 2254–2269. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100139>.
- (98) Talele, T. T. The “ Cyclopropyl Fragment ” Is a Versatile Player That Frequently Appears in Preclinical/Clinical Drug Molecules. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (19), 8712–8756. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00472>.
- (99) Shaw, M. H.; McCreanor, N. G.; Whittingham, W. G.; Bower, J. F. Reversible C–C Bond Activation Enables Stereocontrol in Rh-Catalyzed Carbonylative Cycloadditions of Aminocyclopropanes. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (1), 463–468. <https://doi.org/10.1021/ja511335v>.
- (100) Kirmse, W.; Hellwig, G. Desaminierungsreaktionen, 51. Zerfall von Bicyclo[3.1.0]Hexan-Exo-6-Diazonium-Ionen. *Chem. Ber.* **1989**, *122* (2), 389–392. <https://doi.org/10.1002/cber.19891220231>.
- (101) Kovacic, P.; Hopper, R. J.; Chaudhary, S. S.; Levisky, J. A.; Liepkalns, V. A. A Convenient New Synthesis of T-Alkyl Amines. Amination of the Methine Group with Trichloramine–Aluminium Chloride. *Chem. Commun.* **1966**, No. 8, 232–233. <https://doi.org/10.1039/C19660000232>.
- (102) Kovacic, P.; Chaudhary, S. S. Conversion of Methylcyclohexane to 1-Amino-1-Methylcyclohexane by Trichloramine-Aluminum Chloride. *Tetrahedron* **1967**, *23* (9), 3563–3571. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(67\)80003-6](https://doi.org/10.1016/0040-4020(67)80003-6).
- (103) de Belder, A. N.; Wik, K. O. Preparation and Properties of Fluorescein-Labelled Hyaluronate. *Carbohydr. Res.* **1975**, *44* (2), 251–257.

6215(00)84168-3.

- (104) Bauer, S. M. Development, Setup and Validation of Biochemical Kinase Assays for Identification and Evaluation of Novel Janus Kinase 3 Inhibitors. Eberhard Karls Universität Tübingen 2016.
- (105) Bauer, S. M.; Gehringer, M.; Laufer, S. A. A Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantitative Evaluation of Janus Kinase 3 (JAK3) Inhibitors. **2014**, 8817–8822. <https://doi.org/10.1039/c4ay01589d>.
- (106) Jansen, K.; Pou Casellas, C.; Groenink, L.; Wever, K. E.; Masereeuw, R. Humans Are Animals, but Are Animals Human Enough? A Systematic Review and Meta-Analysis on Interspecies Differences in Renal Drug Clearance. *Drug Discov. Today* **2020**, 25 (4), 706–717. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.01.018>.
- (107) Shen, H.-W.; Jiang, X.-L.; Gonzalez, F. J.; Yu, A.-M. Humanized Transgenic Mouse Models for Drug Metabolism and Pharmacokinetic Research. *Curr. Drug Metab.* **2011**, 12 (10), 997–1006. <https://doi.org/10.2174/138920011798062265>.
- (108) Dixit, A.; Mallurwar, S. R.; Sulochana, S. P.; Zainuddin, M.; Mullangi, R.; Metabolism, D.; Biosys, J.; Biosys, J.; Suburb, I. Determination of Tofacitinib in Mice Whole Blood on Dried Blood Spots Using LC – ESI – MS / MS: Application to Pharmacokinetic Study in Mice. *Drug Res* **2019**, 6 (69), 330–336. <https://doi.org/10.1055/a-0677-3066>.
- (109) Flanagan, M. E.; Blumenkopf, T. A.; Brissette, W. H.; Brown, M. F.; Casavant, J. M.; Shang-poa, C.; Doty, J. L.; Elliott, E. A.; Fisher, M. B.; Hines, M.; Kent, C.; Kudlacz, E. M.; Lillie, B. M.; Magnuson, K. S.; Mccurdy, S. P.; Munchhof, M. J.; Perry, B. D.; Sawyer, P. S.; Strelevitz, T. J.; Subramanyam, C.; Sun, J.; Whipple, D. A.; Changelian, P. S. Discovery of CP-690 , 550 : A Potent and Selective Janus Kinase (JAK) Inhibitor for the Treatment of Autoimmune Diseases and Organ Transplant Rejection. **2010**, 8468–8484. <https://doi.org/10.1021/jm1004286>.
- (110) Di, L.; Rong, H.; Feng, B. Demystifying Brain Penetration in Central Nervous System Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2013**, 1 (56), 2–12. <https://doi.org/10.1021/jm301297f>.
- (111) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRx* **2005**, 2 (4), 541–553. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.4.541>.
- (112) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46 (1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- (113) Mikitsh, J. L.; Chacko, A.-M. Pathways for Small Molecule Delivery to the Central Nervous System across the Blood-Brain Barrier. *Perspect. Medicin. Chem.* **2014**, 6, PMC-S13384. <https://doi.org/10.4137/PMC.S13384>.
- (114) Sadiq, M. W.; Borgs, A.; Okura, T.; Shimomura, K.; Kato, S.; Hammarlund-udenaes, M. Diphenhydramine Active Uptake at the Blood – Brain Barrier and Its Interaction with Oxycodone in Vitro and in Vivo. *J Pharm Sci* **2011**, 100 (9), 3912–3923. <https://doi.org/10.1002/jps.22567>.
- (115) Tsuji, A. Influx Transporters and Drug Targeting: Application of Peptide and Cation Transporters. *International Congress Series.* 2005, pp 75–84.

- <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.02.013>.
- (116) Chapy, H.; André, P.; Declèves, X. A Polyspecific Drug / Proton Antiporter Mediates Diphenhydramine and Clonidine Transport at the Mouse Blood-Retinal Barrier. *Br J Pharmacol.* **2015**, *172* (19), 4714–4725. <https://doi.org/10.1111/bph.13246>.
- (117) Kirk, K. L. Fluorine in Medicinal Chemistry: Recent Therapeutic Applications of Fluorinated Small Molecules. *J. Fluor. Chem.* **2006**, *127* (8), 1013–1029. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2006.06.007>.
- (118) Shah, P.; Westwell, A. D. The Role of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22* (5), 527–540. <https://doi.org/10.1080/14756360701425014>.
- (119) Hagmann, W. K. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (15), 4359–4369. <https://doi.org/10.1021/jm800219f>.
- (120) Shepard, R. M.; Falkner, F. C. Pharmacokinetics of Azithromycin in Rats and Dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* **1990**, *25* (suppl_A), 49–60. https://doi.org/10.1093/jac/25.suppl_A.49.
- (121) Davila, D.; Kolacny-Babic, L. Pharmacokinetics of Azithromycin after Single Oral Dosing of Experimental Animals. *Biopharm. Drug Dispos.* **1991**, *12*, 505–514. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510120704>.
- (122) Girard, A. E.; Girard, D.; English, A. R.; Gootz, T. D.; Cimochoowski, C. R.; Faiella, J. A.; Haskell, S. L.; Retsema, J. A. Pharmacokinetic and In Vivo Studies with Azithromycin (CP-62, 993), a New Macrolide with an Extended Half-Life and Excellent Tissue Distribution. *Antimicrobal Agents Chemother.* **1987**, *31* (12), 1948–1954. <https://doi.org/10.1128/AAC.31.12.1948>.
- (123) Huang, H.; Zhang, X.; Li, S.; Liu, N.; Lian, W.; McDowell, E.; Zhou, P.; Zhao, C.; Guo, H.; Zhang, C.; Yang, C.; Wen, G.; Dong, X.; Lu, L.; Ma, N.; Dong, W.; Dou, Q. P.; Wang, X.; Liu, J. Physiological Levels of ATP Negatively Regulate Proteasome Function. *Cell Res.* **2010**, *20* (12), 1372–1385. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.123>.
- (124) De Vries, L. C. S.; Duarte, J. M.; De Krijger, M.; Welting, O.; Van Hamersveld, P. H. P.; Van Leeuwen-Hilbers, F. W. M.; Moerland, P. D.; Jongejan, A.; D’Haens, G. R.; De Jonge, W. J.; Wildenberg, M. E. A JAK1 Selective Kinase Inhibitor and Tofacitinib Affect Macrophage Activation and Function. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25* (4), 647–660. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy364>.
- (125) Pattison, M. J.; MacKenzie, K. F.; Arthur, J. S. C. Inhibition of JAKs in Macrophages Increases Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Production by Blocking IL-10-Mediated Feedback. *J. Immunol.* **2012**, *189* (6), 2784 LP – 2792. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200310>.
- (126) Quero, L.; Taden, A. N.; Hanser, E.; Roux, J.; Laski, A.; Hall, J.; Kyburz, D. MiR-221-3p Drives the Shift of M2-Macrophages to a Pro-Inflammatory Function by Suppressing JAK3/STAT3 Activation. *Frontiers in Immunology.* 2020, p 3087. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03087>.
- (127) Wang, H.; Brown, J.; Gao, S.; Liang, S.; Jotwani, R.; Zhou, H.; Suttles, J.; Scott, D. A.; Lamont, R. J. The Role of JAK-3 in Regulating TLR-Mediated Inflammatory Cytokine Production in Innate Immune Cells. *J. Immunol.* **2013**, *191* (3), 1164 LP – 1174. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203084>.
- (128) Telliez, J.-B.; Dowty, M. E.; Wang, L.; Jussif, J.; Lin, T.; Li, L.; Moy, E.; Balbo, P.; Li,

- W.; Zhao, Y.; Crouse, K.; Dickinson, C.; Symanowicz, P.; Hegen, M.; Banker, M. E.; Vincent, F.; Unwalla, R.; Liang, S.; Gilbert, A. M.; Brown, M. F.; Hayward, M.; Montgomery, J.; Yang, X.; Bauman, J.; Trujillo, J. I.; Casimiro-Garcia, A.; Vajdos, F. F.; Leung, L.; Geoghegan, K. F.; Quazi, A.; Xuan, D.; Jones, L.; Hett, E.; Wright, K.; Clark, J. D.; Thorarensen, A. Discovery of a JAK3-Selective Inhibitor: Functional Differentiation of JAK3-Selective Inhibition over Pan-JAK or JAK1-Selective Inhibition. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (12), 3442–3451. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00677>.
- (129) Yamaoka, K.; Min, B.; Zhou, Y.-J.; Paul, W. E.; O'shea, J. J. Jak3 Negatively Regulates Dendritic-Cell Cytokine Production and Survival. *Blood* **2005**, *106* (9), 3227–3233. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0769>.
- (130) Haller Hasskamp, J.; Zapas, J. L.; Elias, E. G. Dendritic Cell Counts in the Peripheral Blood of Healthy Adults. *Am. J. Hematol.* **2005**, *78* (4), 314–315. <https://doi.org/10.1002/ajh.20296>.
- (131) Mellman, I.; Fuchs, R.; Helenius, A. ACIDIFICATION OF THE ENDOCYTIC AND EXOCYTIC PATHWAYS. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55* (1), 663–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.003311>.
- (132) Bond, J. S.; Butler, P. E. INTRACELLULAR PROTEASES. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56* (1), 333–364. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002001>.
- (133) Carlier, M.; Garcia-Luque, I.; Montenez, J.; Tulkens, P.; Piret, J. Accumulation, Release and Subcellular Localization of Azithromycin in Phagocytic and Non-Phagocytic Cells in Culture. *Int. J. Tissue React.* **1994**, *16*, 211–220. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg223>.
- (134) Lemaire, S.; Tulkens, P. M.; Van Bambeke, F. Cellular Pharmacokinetics of the Novel Biaryloxazolidinone Radezolid in Phagocytic Cells: Studies with Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (6), 2540–2548. <https://doi.org/10.1128/AAC.01723-09>.
- (135) Retsema, J. A.; Bergeron, J. M.; Girard, D.; Milisen, W. B.; Girard, A. E. Preferential Concentration of Azithromycin in an Infected Mouse Thigh Model. *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, *31* (suppl_E), 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/31.suppl_E.5.
- (136) Girard, D.; Regan, P. A.; Milisen, W. B.; Retsema, J. A.; Swindell, A. C. Influence of Immunosuppression on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Azithromycin in Infected Mouse Tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37* (suppl_C), 21–35. https://doi.org/10.1093/jac/37.suppl_C.21.
- (137) Hall Jr, H. K. Correlation of the Base Strengths of Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (20), 5441–5444. <https://doi.org/10.1021/ja01577a030>.
- (138) Zhao, S.-B.; Wang, S. Luminescence and Reactivity of 7-Azaindole Derivatives and Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 3142–3156. <https://doi.org/10.1039/C001897J>.
- (139) Adler, T. K.; Albert, A. The Biological and Physical Properties of the Azaindoles. *J. Med. Chem.* **1963**, *6* (5), 480–483. <https://doi.org/10.1021/jm00341a003>.
- (140) Tormählen, N.; Martorelli, M.; Kuhn, A.; Maier, F.; Guezguez, J.; Burnet, M.; Albrecht, W.; Laufer, S.; Koch, P. Design and Synthesis of Highly Selective Brain Penetrant P38 α Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01773>.
- (141) Laux, J.; Forster, M.; Riexinger, L.; Schwamborn, A.; Guezguez, J.; Pokoj, C.; Kudolo,

- M.; Berger, L. M.; Knapp, S.; Schollmeyer, D.; Guse, J.; Burnet, M.; Laufer, S. A. Pharmacokinetic Optimization of Small Molecule Janus Kinase 3 Inhibitors to Target Immune Cells. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.2c00054>.
- (142) Michelet, F.; Gueguen, R.; Leroy, P.; Wellman, M.; Nicolas, A.; Siest, G. Blood and Plasma Glutathione Measured in Healthy Subjects by HPLC: Relation to Sex, Aging, Biological Variables, and Life Habits. *Clin. Chem.* **1995**, *41* (10), 1509–1517. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.10.1509>.
- (143) Sakai, C.; Iwano, S.; Yamazaki, Y.; Ando, A.; Nakane, F.; Kouno, M.; Yamazaki, H.; Miyamoto, Y. Species Differences in the Pharmacokinetic Parameters of Cytochrome P450 Probe Substrates between Experimental Animals, Such as Mice, Rats, Dogs, Monkeys, and Microminipigs, and Humans. *J Drug Metab Toxicol* **2014**, *5* (6), 1–12. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000173>.
- (144) Beconi, M. G.; Howland, D.; Park, L.; Lyons, K.; Giuliano, J.; Dominguez, C.; Munoz-Sanjuan, I.; Pacifici, R. Pharmacokinetics of Memantine in Rats and Mice. *PLoS Curr.* **2011**, *3*. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1291>.
- (145) Jeon, J.-H.; Kang, B.; Lee, S.; Jin, S.; Choi, M.-K.; Song, I.-S. Pharmacokinetics and Intestinal Metabolism of Compound K in Rats and Mice. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (2), 129. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020129>.
- (146) Lu, Y.; Yeh, W.; Ohashi, P. S. LPS / TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* **2008**, *42* (2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
- (147) Drexler, S. K.; Kong, P. L.; Wales, J.; Foxwell, B. M. Cell Signalling in Macrophages, the Principal Innate Immune Effector Cells of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2008**, *10* (5), 216. <https://doi.org/10.1186/ar2481>.
- (148) Drexler, S. K.; Sacre, S. M.; Foxwell, B. M. Toll-like Receptors: A New Target in Rheumatoid Arthritis? *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2006**, *2* (4), 585–599. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2.4.585>.
- (149) Edwards, S. W.; Hallett, M. B. Seeing the Wood for the Trees: The Forgotten Role of Neutrophils in Rheumatoid Arthritis. *Immunol. Today* **1997**, *18* (7), 320–324. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01087-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01087-6).
- (150) Ghoreschi, K.; Jesson, M. I.; Li, X.; Lee, J. L.; Ghosh, S.; Alsup, J. W.; Warner, J. D.; Tanaka, M.; Steward-Tharp, S. M.; Gadina, M.; Thomas, C. J.; Minnerly, J. C.; Storer, C. E.; LaBranche, T. P.; Radi, Z. A.; Dowty, M. E.; Head, R. D.; Meyer, D. M.; Kishore, N.; O'Shea, J. J. Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550). *J. Immunol.* **2011**, *186* (7), 4234 LP – 4243. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003668>.
- (151) Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF-KB Signaling in Inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2* (1), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- (152) Leonard, W. J.; O'Shea, J. J. Jaks and STATs: Biological Implications. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16* (1), 293–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.293>.
- (153) Nakajima, K.; Sano, S. Mouse Models of Psoriasis and Their Relevance. *J. Dermatol.* **2018**, *45* (3), 252–263. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14112>.
- (154) Michalek, I. M.; Loring, B.; John, S. M. A Systematic Review of Worldwide Epidemiology of Psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2017**, *31* (2), 205–212.

<https://doi.org/10.1111/jdv.13854>.

- (155) Girolomoni, G.; Strohal, R.; Puig, L.; Bachelez, H.; Barker, J.; Boehncke, W.-H.; Prinz, J. C. The Role of IL-23 and the IL-23/TH 17 Immune Axis in the Pathogenesis and Treatment of Psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2017**, *31* (10), 1616–1626. <https://doi.org/10.1111/jdv.14433>.
- (156) Sano, S.; Chan, K. S.; Carbajal, S.; Clifford, J.; Peavey, M.; Kiguchi, K.; Itami, S.; Nickoloff, B. J.; DiGiovanni, J. Stat3 Links Activated Keratinocytes and Immunocytes Required for Development of Psoriasis in a Novel Transgenic Mouse Model. *Nat. Med.* **2005**, *11* (1), 43–49. <https://doi.org/10.1038/nm1162>.
- (157) Van Der Fits, L.; Mourits, S.; Voerman, J. S. A.; Kant, M.; Boon, L.; Laman, J. D.; Cornelissen, F.; Mus, A.-M.; Florencia, E.; Prens, E. P. Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.* **2009**, *182* (9), 5836–5845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802999>.
- (158) Alvarez, P.; Jensen, L. E. Imiquimod Treatment Causes Systemic Disease in Mice Resembling Generalized Pustular Psoriasis in an IL-1 and IL-36 Dependent Manner. *Mediators Inflamm.* **2016**, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/6756138>.
- (159) Zhang, J.; Yang, X.; Qiu, H.; Chen, W. Weight Loss May Be Unrelated to Dietary Intake in the Imiquimod-Induced Plaque Psoriasis Mice Model. *Open Life Sci.* **2020**, *15* (1), 79–82. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0009>.
- (160) Compston, A.; Coles, A. Multiple Sclerosis. *Lancet* **2008**, *372* (9648), 1502–1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7).
- (161) Kutzelnigg, A.; Lassmann, H. Pathology of Multiple Sclerosis and Related Inflammatory Demyelinating Diseases. *Handb. Clin. Neurol.* **2014**, *122*, 15–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00002-9>.
- (162) Constantinescu, C. S.; Gran, B. Autoimmune Associations in Multiple Sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6* (11), 591–592. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.147>.
- (163) Calabresi, P. A. Diagnosis and Management of Multiple Sclerosis. *Am. Fam. Physician* **2004**, *70* (10), 1935–1944.
- (164) Lublin, F. D.; Reingold, S. C. Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Neurology* **1996**, *46* (4), 907 LP – 911. <https://doi.org/10.1212/WNL.46.4.907>.
- (165) Bjornevik, K.; Cortese, M.; Healy, B. C.; Kuhle, J.; Mina, M. J.; Leng, Y.; Elledge, S. J.; Niebuhr, D. W.; Scher, A. I.; Munger, K. L. Longitudinal Analysis Reveals High Prevalence of Epstein-Barr Virus Associated with Multiple Sclerosis. *Science (80-.)*. **2022**. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>.
- (166) Rosati, G. The Prevalence of Multiple Sclerosis in the World: An Update. *Neurol. Sci.* **2001**, *22* (2), 117–139. <https://doi.org/10.1007/s100720170011>.
- (167) Katz Sand, I. The Role of Diet in Multiple Sclerosis: Mechanistic Connections and Current Evidence. *Curr. Nutr. Rep.* **2018**, *7* (3), 150–160. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0236-z>.
- (168) Hedström, A. K.; Olsson, T.; Alfredsson, L. High Body Mass Index before Age 20 Is Associated with Increased Risk for Multiple Sclerosis in Both Men and Women. *Mult. Scler. J.* **2012**, *18* (9), 1334–1336. <https://doi.org/10.1177/1352458512436596>.

- (169) Caetano, A.; Veiga, L.; Capaldi, F.; Alencar, S.; Azevedo, R.; Bezerra, R. The Antioxidant Response of the Liver of Male Swiss Mice Raised on a AIN 93 or Commercial Diet. *BMC Physiol.* **2013**, *13*, 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-13-3>.
- (170) Makki, K.; Deehan, E. C.; Walter, J.; Bäckhed, F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe* **2018**, *23* (6), 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>.
- (171) Whitham, R. H.; Bourdette, D. N.; Hashim, G. A.; Herndon, R. M.; Ilg, R. C.; Vandenberg, A. A.; Offner, H. Lymphocytes from SJL/J Mice Immunized with Spinal Cord Respond Selectively to a Peptide of Proteolipid Protein and Transfer Relapsing Demyelinating Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **1991**, *146* (1), 101 LP – 107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.1.101>.
- (172) Procaccini, C.; De Rosa, V.; Pucino, V.; Formisano, L.; Matarese, G. Animal Models of Multiple Sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *759*, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.042>.
- (173) Matsushima, G. K.; Morell, P. The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathol.* **2001**, *11* (1), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x>.
- (174) Jeffery, N. D.; Blakemore, W. F. Remyelination of Mouse Spinal Cord Axons Demyelinated by Local Injection of Lysolecithin. *J. Neurocytol.* **1995**, *24*(10), 775–781. <https://doi.org/10.1007/BF01191213>.
- (175) Segal, J. P.; Bannerman, C. A.; Silva, J. R.; Haird, C. M.; Baharnoori, M.; Gilron, I.; Ghasemlou, N. Chronic Mechanical Hypersensitivity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Is Regulated by Disease Severity and Neuroinflammation. *Brain. Behav. Immun.* **2020**, *89*, 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.010>.
- (176) Carambia, A.; Freund, B.; Schwinge, D.; Bruns, O. T.; Salmen, S. C.; Ittrich, H.; Reimer, R.; Heine, M.; Huber, S.; Waurisch, C. Nanoparticle-Based Autoantigen Delivery to Treg-Inducing Liver Sinusoidal Endothelial Cells Enables Control of Autoimmunity in Mice. *J. Hepatol.* **2015**, *62* (6), 1349–1356. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.01.006>.
- (177) Berger, T.; Rubner, P.; Schautzer, F.; Egg, R.; Ulmer, H.; Mayringer, I.; Dilitz, E.; Deisenhammer, F.; Reindl, M. Antimyelin Antibodies as a Predictor of Clinically Definite Multiple Sclerosis after a First Demyelinating Event. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349* (2), 139–145. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022328>.
- (178) Cassiani-Ingoni, R.; Coksaygan, T.; Xue, H.; Reichert-Scriver, S. A.; Wiendl, H.; Rao, M. S.; Magnus, T. Cytoplasmic Translocation of Olig2 in Adult Glial Progenitors Marks the Generation of Reactive Astrocytes Following Autoimmune Inflammation. *Exp. Neurol.* **2006**, *201* (2), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.030>.
- (179) Murta, V.; Ferrari, C. C. Influence of Peripheral Inflammation on the Progression of Multiple Sclerosis: Evidence from the Clinic and Experimental Animal Models. *Mol. Cell. Neurosci.* **2013**, *53*, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.06.004>.
- (180) Xavier, R. J.; Podolsky, D. K. Unravelling the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature* **2007**, *448* (7152), 427–434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>.
- (181) Kaser, A.; Zeissig, S.; Blumberg, R. S. Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *28*, 573–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>.

- (182) Baumgart, D. C.; Sandborn, W. J. Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Established and Evolving Therapies. *Lancet* **2007**, *369* (9573), 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X).
- (183) Perše, M.; Cerar, A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 718617. <https://doi.org/10.1155/2012/718617>.
- (184) Chassaing, B.; Aitken, J. D.; Malleshappa, M.; Vijay-Kumar, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol.* **2014**, *104*, 15.25.1-15.25.14. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>.
- (185) Watanabe, H.; Numata, K.; Ito, T.; Takagi, K.; Matsukawa, A. Innate Immune Response in Th1-and Th2-Dominant Mouse Strains. *Shock* **2004**, *22* (5), 460–466. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>.
- (186) Cochran, K. E.; Lamson, N. G.; Whitehead, K. A. Expanding the Utility of the Dextran Sulfate Sodium (DSS) Mouse Model to Induce a Clinically Relevant Loss of Intestinal Barrier Function. *PeerJ* **2020**, *8*, e8681. <https://doi.org/10.7717/peerj.8681>.
- (187) Kitajima, S.; Takuma, S.; Morimoto, M. Histological Analysis of Murine Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium of Different Molecular Weights. *Exp. Anim.* **2000**, *49*(1), 9–15. <https://doi.org/10.1538/expanim.49.9>.
- (188) Texler, B.; Zollner, A.; Reinstadler, V.; Reider, S. J.; Macheiner, S.; Jelusic, B.; Pfister, A.; Watschinger, C.; Przysiecki, N.; Tilg, H.; Oberacher, H.; Moschen, A. R. Tofacitinib-Induced Modulation of Intestinal Adaptive and Innate Immunity and Factors Driving Cellular and Systemic Pharmacokinetics. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *13* (2), 383–404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.09.004>.
- (189) Fontenot, J. D.; Rasmussen, J. P.; Gavin, M. A.; Rudensky, A. Y. A Function for Interleukin 2 in Foxp3-Expressing Regulatory T Cells. *Nat. Immunol.* **2005**, *6* (11), 1142–1151. <https://doi.org/10.1038/ni1263>.
- (190) Zhang, L.; Zhao, Y. The Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory CD4+CD25+T Cells: Multiple Pathways on the Road. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *211* (3), 590–597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.21001>.
- (191) Cetkovic-Cvrlje, M.; Olson, M.; Ghate, K. Targeting Janus Tyrosine Kinase 3 (JAK3) with an Inhibitor Induces Secretion of TGF- β by CD4+ T Cells. *Cell. Mol. Immunol.* **2012**, *9* (4), 350–360. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.20>.
- (192) Mayack, S. R.; Berg, L. J. Cutting Edge: An Alternative Pathway of CD4+ T Cell Differentiation Is Induced Following Activation in the Absence of γ -Chain-Dependent Cytokine Signals. *J. Immunol.* **2006**, *176* (4), 2059–2063. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2059>.
- (193) Mori, M.; Morris, S. C.; Orekhova, T.; Marinaro, M.; Giannini, E.; Finkelman, F. D. IL-4 Promotes the Migration of Circulating B Cells to the Spleen and Increases Splenic B Cell Survival. *J. Immunol.* **2000**, *164* (11), 5704–5712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5704>.
- (194) Firestein, G. S. Evolving Concepts of Rheumatoid Arthritis. *Nature* **2003**, *423* (6937), 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature01661>.
- (195) Brand, D. D. Rodent Models of Rheumatoid Arthritis. *Comp. Med.* **2005**, *55* (2), 114–122.

- (196) O'Shea, J. J.; Kontzias, A.; Yamaoka, K.; Tanaka, Y.; Laurence, A. Janus Kinase Inhibitors in Autoimmune Diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **2013**, *72* (suppl 2), ii111–ii115. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202576>.
- (197) Rosloniec, E. F.; Cremer, M.; Kang, A. H.; Myers, L. K.; Brand, D. D. Collagen-induced Arthritis. *Curr. Protoc. Immunol.* **2010**, *89* (1), 15. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1505s89>.
- (198) Brand, D. D.; Latham, K. A.; Rosloniec, E. F. Collagen-Induced Arthritis. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (5), 1269–1275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173>.
- (199) Vasta, J. D.; Corona, C. R.; Wilkinson, J.; Zimprich, C. A.; Hartnett, J. R.; Ingold, M. R.; Zimmerman, K.; Machleidt, T.; Kirkland, T. A.; Huwiler, K. G.; Ohana, R. F.; Slater, M.; Otto, P.; Cong, M.; Wells, C. I.; Berger, B.-T.; Hanke, T.; Glas, C.; Ding, K.; Drewry, D. H.; Huber, K. V. M.; Willson, T. M.; Knapp, S.; Müller, S.; Meisenheimer, P. L.; Fan, F.; Wood, K. V.; Robers, M. B. Quantitative, Wide-Spectrum Kinase Profiling in Live Cells for Assessing the Effect of Cellular ATP on Target Engagement. *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25* (2), 206-214.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.010>.

9 Offenlegung

FM-381 wurde ursprünglich von Michael Forster entwickelt und analysiert.

Simon Strass führte den letzten Syntheseschritt von **76** durch und war an der Planung der Vollblut- und Plasmastabilitäts-Assays sowie der PK-Studie in Ratten beteiligt.

Nadja Späth, Dr. Marie Dorier und Sophia Geiger führten die ELISAs zur Zytokinbestimmung in den LPS-basierten Experimenten (in vitro und in vivo) durch. Nadja Späth führte zudem die Durchflusszytometrie der Arthritis-Studie durch.

Sophia Geiger war zudem an der Quantifizierung des FITC-Dextran Gehalts der Plasmaproben aus den Colitis-Studien und der histologischen Analyse der dort erhaltenen Proben beteiligt.

Mariella Martorelli war beteiligt an der Durchführung der EAE-Studie, der histologischen Analyse dort erhaltener Proben, dem Zellaufnahme-Assay in HBC sowie bei der Bedienung des Fluoreszenzmikroskops.

Tina Fischer war für die Durchführung der Zytotoxizitäts-Assays verantwortlich und half bei der Vorbereitung und Analyse histologischer Proben der EAE- und Colitis-Studien. An letzteren war zudem Kim Gohlke beteiligt.

Matthias Dengler führte die qPCR-Analyse von Proben aus der EAE-Studie durch.

Das Synovo Tierstall-Team (Thilo Weinstein, Dr. Luciano Oliveira, Katharina Sauter, Johanna Geiger, Santiago Cruzes, Osman Can, Christina Pokoj) war für die praktische Durchführung der Tierstudien verantwortlich.

Katharina Bauer führte die enzymatischen Assays zur Bestimmung der JAK3 IC₅₀ durch.

NMR-Spektren wurden von Gerd Helms bzw. teilweise im NMR-Labor des Hörsaalzentrums an der Universität Tübingen (Priska Kolb, Dominik Brzecki) aufgenommen.

HRMS-Spektren wurden in der Abteilung Massenspektrometrie (Dr. Dorothee Wistuba, Dr. Norbert Grzegorzek) im Hörsaalzentrum an der Universität Tübingen aufgenommen.

Die Röntgenkristallographie-Aufnahmen der kristallinen Proben wurden von Dr. Dieter Schollmeyer angefertigt.

Anna Schwamborn, Dr. Jamil Guezguez und Laura Riexinger waren an der HPLC-MS Analyse von Proben und teilweise bei der Probenextraktion und dem Erstellen von Standardverdünnungsreihen beteiligt.

Mark Kudolo führte die Metabolismus-Experimente in murinen Lebermikrosomen durch.

Die Metabolismus-Experimente mit humaner S9-Fraktion wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Pierre Koch (Universität Regensburg) durchgeführt.

Die zellulären JAK3 nanoBRET Assays wurden im Arbeitskreis Knapp (Universität Frankfurt) von Lena Berger durchgeführt.

Die JAK3-Selektivitätsassays wurden von Reaction Biology Europe (Freiburg) durchgeführt.

Dr. Agne Klein half bei der Anfertigung der Graphen aus der Zusammenfassung (Kapitel **5**).

Abbildung 1.3, 1.4, 2.1, 4.1, 4.22, 4.54, 4.61, 4.65, 4.70 und 4.88 wurden mit Biorender.com erstellt.