

**FieldScreen basierte Leitstrukturfindung und
Optimierung von Hemmstoffen der p38 MAP Kinase**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

Melanie Holm

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01.04.2006 bis zum 31.07.2009 unter der Anleitung von Prof. Dr. Stefan Laufer am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2009

Dekan

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Gutachter

Prof. Dr. Stefan Laufer

2. Gutachter

Prof. Dr. Rolf Daniels

Mein Dank gilt meiner Familie, den Kollegen, Kooperationspartnern und Freunden, die mich während dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben. Ohne sie wären die Durchführung und das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere bedanke möchte ich mich bei:

meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer** für die Überlassung des interessanten Themas, die umfassende Betreuung und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit, die Übernahme des Erstgutachtens, die Finanzierung und die umfassende Unterstützung über die gesamten drei Jahre. Nicht unerwähnt lassen möchte ich die großzügige Ermöglichung der regelmäßigen Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen,

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels für die zeitnahe Erstellung des Zweitgutachtens,

Herrn Dr. Werner Zimmermann für sein bereicherndes Interesse an meiner Arbeit und für das Korrekturlesen,

Herrn Dr. Frank Lehmann für die angenehme Zusammenarbeit, Diskussions- und Hilfsbereitschaft insbesondere bei der Korrektur der Arbeit,

Herrn Peter Keck für die gute Zusammenarbeit und in erster Linie für die Hilfe bei Computerfragen und -problemen,

Frau Karin Ward für die prompte Erledigung aller administrativen und organisatorischen Angelegenheiten,

Frau Helga Söllinger und **Herrn Andi Walker** aus der Chemikalienausgabe und den hilfsbereiten Herren aus der hauseigenen Werkstatt unter der Leitung von **Herrn Karl-Heinz Geiger**,

Frau Dr. Sabine Luik, **Frau Marcia Goettert** und **Frau Katharina Bauer** für die angenehme Atmosphäre im Labor beim Testen wirksamer und weniger wirksamer Hemmstoffe,

Frau Verena Schattel für das Ermitteln des Bindemodus meiner Verbindungen, die Bereitstellung der Bilder für diese Arbeit,

Herrn Dr. Christian Beyer, **Herrn Dr. Christian Peifer**, **Herrn Dr. Andy Liedke**, **Herrn Dr. David Domeyer** und **Herrn Marc Weißer** für die unkomplizierte und gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des ersten Semesters,

der Arbeitsgruppe von **Herrn Dr. Dominik Hauser: Herrn Roland Selig, Frau Claudia Bracht** und **Frau Stefanie Bühler** für die Verbreitung immer guter Laune im Arbeitskreis und besonders der letztgenannten für das Korrekturlesen des chemischen Teils der Arbeit,

den Mitarbeitern des „M-Parkes“: **Herrn Dr. Holger Scheible, Frau Maisaa Sakr, Frau Claudia Mayer, Herrn Frank Zwanziger** für die Messung der unzähligen Proben und für viele fachliche Gespräche,

Herrn Gerd Helms für seine immer freundliche Hilfsbereitschaft bei allen (Computer-) technischen Problemen sowie **Herrn Holger Kahnt** für die Instandhaltung und Pflege aller Laborgeräte,

meinen Laborkolleginnen aus dem Südlabor **Frau Dr. Simona Margutti und Frau Sabine Klos**, den Kollegen und Kolleginnen **Frau Dr. Gabriele Ahrens, Herrn Dr. Dino Bullinger, Frau Dr. Katharina Ziegler, Herrn Pierre Koch, Frau Angelika Dorn, Frau Katharina Martz, Herrn Benjamin Baur, Herrn Joachim Schlosser, Frau Fabiana Geller und Herrn Dr. Mohammed Abadleh** und allen anderen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Laufer für das angenehme Arbeitsklima und schöne gemeinsame Unternehmungen außerhalb des Uni-alltages.

Zu guter Letzt meinen besonderen Dank meiner **Familie** und meinen **Freunden** für die fortwährende Unterstützung, meiner **Mutter** und **Irene** zudem für das Korrekturlesen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in der folgenden Form veröffentlicht:

Holm, M.; Laufer, S.: "Synthesis and structure-activity relationship of [1,2,4]triazolo [3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole derivatives as novel p38 MAPK inhibitors." Posterpräsentation, *8th World Congress on Inflammation, Copenhagen*, Inflammation Research, Supplement 3, Book of Abstracts, 2007, 445.

Holm, M.; Schollmeyer, D.; Laufer, S. 3-(2-Fluorophenyl)-6-(phenoxyethyl)-1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole. *Acta Crystallographica*, Section E: Structure Reports Online, 2008, 4, o700/1-o700/8. doi: 10.1107/S1600536808003917

Lehmann, F.; Holm, M.; Laufer, S. Three-Component Combinatorial Synthesis of Novel Dihydropyran[2,3-*c*]pyrazoles. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 2008, 3, 364-367. doi: 10.1021/cc800028m

Holm, M.; Lehmann, F.; Laufer, S. Medicinal chemistry and molecular inhibitor mechanism of tyrosine kinase inhibitors. *Pharmazie in Unserer Zeit*, 2008, 5, 382-392. doi: 10.1002/pauz.200800279

Holm, M.; Laufer, S.: "3,6-Disubstituted-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles: novel lead structures for p38 MAP Kinase." Posterpräsentation, *XXth International Symposium on Medicinal Chemistry* in Wien (31.08. - 4.09. 2008).

Lehmann, F.; Holm, M.; Laufer, S. Rapid and easy access to indoles via microwave-assisted Hemetsberger-Knittel synthesis. *Tetrahedron Letters*, 2009, 15, 1708-1709. doi:10.1016/j.tetlet.2009.01.129

Cheeseright, T. J.; Holm, M.; Lehmann, F.; Luik, S.; Goettert, M.; Melville, J. L.; Laufer, S. Novel Lead Structures for p38 MAP Kinase via FieldScreen Virtual Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52, 4200-4209. doi: 10.1021/jm801399r

Meinem Vater
Dr. Hartmut Holm

*Alles sollte so einfach wie möglich gemacht werden,
aber nicht einfacher.*

Albert Einstein (1879-1955)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	17
1.1 Proteinkinasen.....	17
1.1.1 Proteinkinasen als Target.....	17
1.1.2 Die räumliche Struktur von Proteinkinasen.....	20
1.1.3 Die ATP-Bindungstasche.....	23
1.2 Die p38 MAP Kinase.....	29
1.2.1 Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK).....	29
1.2.2 Aktivierung und Effekte der p38 MAP Kinase.....	31
1.2.3 Identifizierung der p38 MAP Kinase als molekulare Zielstruktur.....	33
1.2.4 p38 MAP Kinase Inhibitoren und Bindemodi.....	35
1.3 Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Leitstrukturen in der Wirkstoffforschung.....	45
1.3.1 Methoden des Wirkstoffdesigns.....	45
1.3.2 Biomolekulares Screening.....	47
1.3.3 Virtuelles Screening.....	49
1.3.3.1 Direktes Drug Design.....	51
1.3.3.2 Indirektes Drug Design.....	52
1.3.3.3 Virtuelle Rezeptormodelle.....	53
1.3.3.4 Abstraktion von Molekülstrukturen.....	54
2 Aufgabenstellung.....	57
3 Ausgangspunkt.....	59
3.1 Das Macroceptprojekt.....	59
3.2 Die FieldScreen Suche.....	60

4 Chemie und Optimierung.....	69
4.1 Darstellung 3,6-disubstituierter [1,2,4]Triazolo[3,4-<i>b</i>]	
[1,3,4]thiadiazole.....	69
4.1.1 Grundgerüst der [1,2,4]Triazolo[3,4- <i>b</i>][1,3,4]thiadiazole.....	69
4.1.2 Retrosynthese und entwickelte Synthesestrategien.....	70
4.1.3 Der zentrale Triazol-Baustein.....	71
4.1.4 Synthese der 3,6-disubstituierter [1,2,4]Triazolo[3,4- <i>b</i>][1,3,4]	
thiadiazole.....	77
4.2 Darstellung 2,5,6-trisubstituierter Imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]	
thiadiazole.....	84
4.2.1 Grundgerüst der Imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3,4]thiadiazole.....	84
4.2.2 Retrosynthese und entwickelte Synthesestrategien.....	85
4.2.3 Der zentrale Thiadiazol-Baustein.....	86
4.2.4 Synthese der 2,5,6-trisubstituierter Imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3,4]thiadiazole....	91
5 Biologische Testung und Ergebnisse.....	107
5.1 Der p38 MAP Kinase Enzym-Essay.....	107
5.1.1 Durchführung des p38 α Enzym-Essays.....	107
5.1.2 Quantitative Auswertung.....	109
5.2 Biologische Evaluation der 3,6-disubstituierter [1,2,4]Triazolo	
[3,4-<i>b</i>][1,3,4] thiadiazole.....	111
5.2.1 Biologische Testergebnisse der Triazolothiadiazole.....	111
5.2.2 Möglicher Bindemodus der Triazolothiadiazole.....	118
5.3 Biologische Evaluation der 2,5,6-trisubstituierter	
Imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]thiadiazole.....	119
5.3.1 Biologische Testergebnisse der Imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3,4]thiadiazole.....	119
5.3.2 Möglicher Bindemodus der Imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3,4]thiadiazole.....	123

6 Zusammenfassung.....	125
6.1 Substanzklasse der Triazolothiadiazole.....	125
6.2 Substanzklasse der Imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]thiadiazole.....	126
7 Experimenteller Teil.....	131
7.1 Material und Methoden.....	131
7.2 Benötigte Lösungen.....	135
7.3 Arbeitsvorschriften.....	135
7.3.1 Synthesevorschriften für die in Kapitel 4.1 behandelten	
Verbindungen.....	135
7.3.1.1 Allgemeine Methode A für die dargestellten Ester.....	135
7.3.1.2 Allgemeine Methode B für die dargestellten Hydrazide.....	137
7.3.1.3 Allgemeine Methode C für die dargestellten Hydrazin-	
carbodithionate.....	149
7.3.1.4 Allgemeine Methode D für die dargestellten in Position 5	
substituierten 2-Amino[1,2,4]triazole.....	141
7.3.1.5 Allgemeine Methode E für die dargestellten in Position 5	
substituierten 2-Amino[1,2,4]triazole.....	144
7.3.1.6 Allgemeine Methode F für die in den Positionen 3,6-disub-	
stituierten [1,2,4]Triazolo[3,4- <i>b</i>][1,3,4]thiadiazole.....	148
7.3.2 Synthesevorschriften für die in Kapitel 4.2 behandelten	
Verbindungen.....	169
8 Literaturverzeichnis.....	201
Akademische Lehrer.....	218
Lebenslauf.....	219

Abkürzungsverzeichnis

ATF-2	activation transcription factor-2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CDK	cyclin-dependent kinase
CYP 450	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EI	electron impact
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
ESI	electrospray ionisation
FAB	fast atom bombardment
FPP	field point pattern
GC	Gaschromatographie
GPCR	G protein-coupled receptor
gk	gatekeeper
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
HTS	high-throughput scening
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IL	Interleukin

IR	Infrarot
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LC	liquid chromatography
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKAPK	MAPK aktivierende Proteinkinase
MAPKK, MAP2K, MKK	mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK, MAP3K	mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MEF 2C	myocyte enhancer factor 2C
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrum
MSK-1	mitogen- and stress-activated protein kinase 1
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NMR	nuclear magnetic resonance
NPP	4-Nitrophenolphosphat
PDB	Proteindatenbank
ppm	parts per million
QSAR	quantitative structure-activity relationship
SEM	standard error of the mean
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett
XED	eXtended Electron Distribution

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen

1.1.1 Proteinkinasen als Target

Die große Mehrheit der bewährten Arzneistoffe erzielt ihre Wirksamkeit durch Bindung an ein Protein, dessen Aktivität dadurch modifiziert wird. Das begrenzt die molekularen Zielstrukturen (Targets), für die marktfähige Verbindungen entwickelt werden können. Der von Hopkins^[1] geprägte Begriff "druggable" Genom erfasst den Anteil der ca. 30.000 Gene des menschlichen Genoms, die Proteine exprimiert, die in der Lage sind, einen niedermolekularen Wirkstoff zu binden. Jedoch reicht diese Fähigkeit eines Proteins allein nicht aus, um es zu einem möglichen Target zu machen. Das bleibt ausschließlich den Proteinen vorbehalten, die zudem in kausalem Zusammenhang mit einer Krankheit stehen. Die potenziellen Zielstrukturen, die für die Pharmaindustrie von Nutzen sein könnten, sind somit, wie in Abbildung 1.1 veranschaulicht, in der Schnittmenge zwischen dem "druggable" Genom und den mit einer Krankheit assoziierten Genen zu finden.

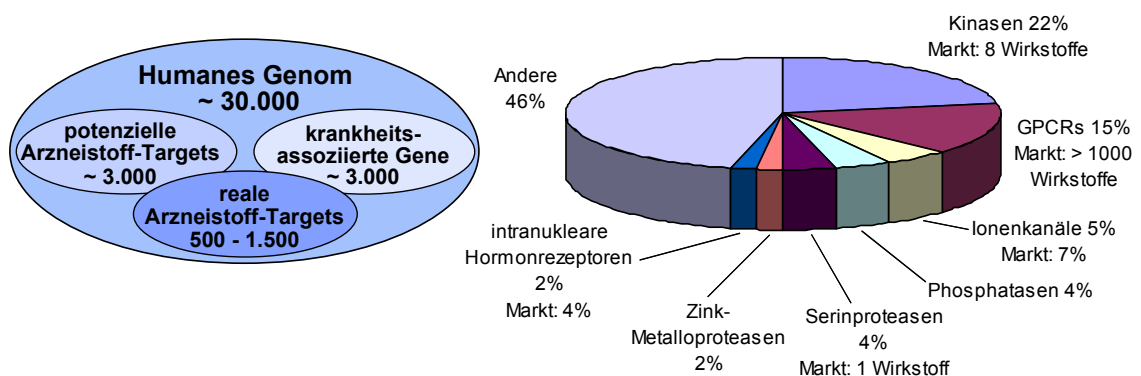


Abbildung 1.1 Zahl potentieller Wirkstoff-Targets im humanen Genom (nach Margutti und Laufer^[2]) und das "druggable Genom" (nach Hopkins et al.^[1])

Die schon bekannten molekularen Zielstrukturen werden von nur 130 Proteinfamilien repräsentiert und nahezu die Hälfte davon durch die folgenden sechs Genfamilien: G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCRs), Serin/Threonin- und Tyrosinkinassen, Zink-Metalloproteasen, Serinproteasen, intranukleare Hormonrezeptoren und Phosphodiesterasen. Kinasen haben insgesamt einen 24%igen Anteil am “druggable“ Genom (Abbildung 1.1). Obwohl 244 der Kinase-Gene mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden, sind zurzeit nur acht Arzneistoffe auf dem Markt, die auf diese Enzymfamilie Einfluss nehmen. Im Gegensatz dazu gibt es Tausende von zugelassenen Arzneistoffen für die G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, die mit 15% einen deutlich geringeren Anteil vom “druggable“ Genom ausmachen.

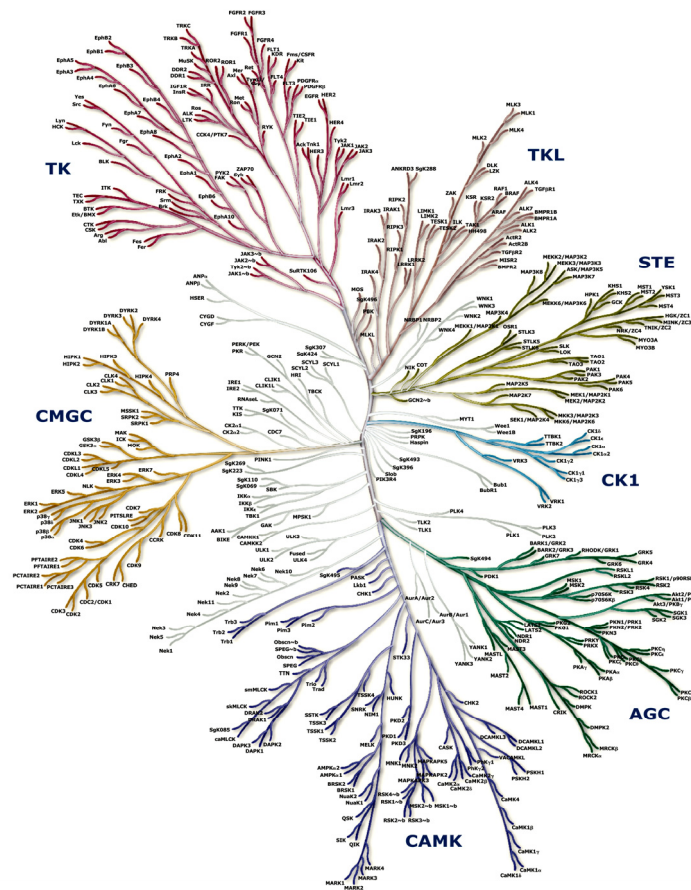


Abbildung 1.2

Dendrogramm des humanen Kinoms zur Veranschaulichung der phylogenetischen Beziehungen zwischen allen 518 Proteinkinasen^[3] Abkürzungen: TK: Tyrosinkinassen; TKL: Tyrosinkinase-ähnliche Kinasen; STE: Kinasen mit Ähnlichkeit zu Steril-7-, Steril-11-, Steril-20-Kinasen aus Hefe; CMGC: Zusammenfassung von CDK (Cyclin-abhängige Kinasen); MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase), GSK (Glykogen-Synthase-Kinase) und CLK (Cdy2-ähnliche Kinasen); CK1: Caseinkinase-1; AGC: Zusammenfassung der Proteinkinase (PK) A, G und C; CAMK: Calmodulin-abhängige Proteinkinase.

Manning *et al.*^[3] beschrieben, dass für 518 Proteinkinasen genetische Codes existieren, in Summe also halb so viele wie vor 20 Jahren vorausgesagt^[1], allerdings immer noch eine auffallend große Anzahl Codes, die ca. 1.7% aller menschlichen Gene ausmachen. Die Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über das komplette Set der Proteinfamilie der Kinasen.

Von diesen über 500 unterschiedlichen Proteinkinasen bei Säugetieren wird die Übertragung eines Phosphatrests von ATP auf Hydroxylgruppen von Proteinen katalysiert.^[4] Die reversible Proteinphosphorylierung ist der Hauptmechanismus, mit dem zelluläre Systeme Signale übermitteln. Die Aktivität der Kinasen ist normalerweise streng reguliert durch weitere in Folge ablaufende Phosphorylierungen, hemmende und aktivierende Proteine, Proteinabbau oder Auf- bzw. Abregulation der Transkription von Genen. Nicht überraschend ist, dass die Deregulierung der Aktivität von Proteinkinasen durch Mutation in konstituierenden Allelen, der Verlust von negativen Regulatoren oder die Änderungen auf chromosomaler Ebene an der Entwicklung von Krankheiten beteiligt sind. In Konsequenz sollte ein großes Interesse an der Entwicklung von selektiven Kinase-Hemmstoffen bestehen. Dennoch wurde, obwohl Proteinkinasen vielfältig an pathophysiologischen Vorgängen beteiligt sind, die Option, durch eine Hemmung dieser Enzyme therapeutisch einzugreifen, lange unterschätzt, denn die Entwicklung von spezifischen Hemmstoffen gegen einzelne Proteinkinasen galt als schwierig. Das hat vor allem die folgenden Gründe: Gemeinsam ist allen bekannten Kinasen, dass sie eine sehr ähnliche Proteinsequenz und damit eine nahezu identische dreidimensionale Struktur besitzen. Die ATP-Bindungsdomäne ist hoch konserviert, d.h. sie unterscheidet sich bei den einzelnen Kinasen kaum. Ebenso wird von allen Adenosintriphosphat (ATP) als Kosubstrat genutzt, das intrazellulär in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, was eine sehr hohe Bindungsaffinität des Inhibitors voraussetzt. Man nahm daher an, dass die Entwicklung eines ATP-kompetitiven Hemmstoffs, der selektiv nur eine einzelne Proteinkinase angreift, nicht möglich oder zumindest unwahrscheinlich sei. Dass die ATP-Bindungsstelle der Enzymklasse somit kein lohnendes Target darstellt, galt so lange als Fakt, bis Parke-Davis einen schwachen, aber selektiven EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor entdeckte. Darauf vollzog sich ein Umdenken und Kinasen gerieten in der Fachwelt verstärkt in den Blickpunkt des Interesses.

Auf Proteinkinasen beziehen sich derzeit etwa 30 bis 35% aller präklinischen Wirkstofffindungsprogramme und die Frage von P. Cohen ^[5]:

„Poteinkinasen – die bedeutendsten Zielmoleküle für Arzneistoffe im 21. Jahrhundert?“ ist mehr als berechtigt.

1.1.2 Die räumliche Struktur der Proteinkinasen

Mit der Aufklärung der Struktur der Proteinkinase A im Jahr 1991 wurde auch eine komplette Übersicht über die dreidimensionale Anordnung der Aminosäuren gegeben, die die katalytische Domäne von Proteinkinasen bilden.^[6] Die Daten, die aus einer schnell wachsenden Zahl von analysierten Röntgenkristallstrukturen anderer Kinasen resultierten, ließen erkennen, dass die räumliche Struktur von Proteinkinasen hochkonserviert ist. Diese bestehen aus zwei Subdomänen, auch „lobes“ genannt, zum einen die N-terminale Domäne, bestehend aus fünf verbundenen β -Faltblättern und einer α -Helix, zum anderen die C-terminale Domäne, die größer ist und überwiegend α -helikal. Beide strukturellen Untereinheiten sind über eine Gelenkregion („Hinge“-Region) miteinander verbunden, die eine Rotation der Substrukturen erlaubt.

Eine detailliertere Einteilung der Struktur der Proteinkinasen in 11 Subdomänen lässt sich nach Hanks und Hunter^[7] geben (Abbildung 1.3). Hiernach bildet die Subdomäne 1 am N-Terminus eine Schleife oberhalb der ATP-Bindungsstelle und enthält das glycinreiche Sequenzmotiv Gly-X-Gly-X-X-Gly (siehe Abbildung 1.4), welches nicht nur bei Proteinkinasen zu finden ist, sondern auch bei vielen anderen Nukleotid-bindenden Proteinen konserviert vorliegt. Die Subdomäne 2 enthält bei nahezu allen Proteinkinasen unverändert einen Lysin-Rest, der durch einen Glutamin-Rest in der Subdomäne 3 stabilisiert wird und einen entscheidenden Wechselwirkungspunkt für den Phosphattransfer darstellt. Die Subdomäne 5 verbindet die kleine mit der großen Untereinheit. Die Subdomäne VIA schließt das Motiv Asp-x-x-x-x-Asn (DxxxxN) mit ein. Hier sind vor allem die Aminosäuren x-x-x-x von Bedeutung, die zwischen den bei allen Kinasen vorliegenden Aminosäuren D und N vorliegen. Die Sequenz Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn deutet auf Serin/Threonin-Kinasen hin, während die Tyrosinkinasen aller Wirbeltiere hier entweder die Sequenz Asp-Leu-Arg-Ala-Ala-Asn im Fall der Src-Kinase-Familie

oder die Sequenz Asp-Leu-Ala-Ala-Arg-Asn in allen anderen Tyrosinkinasen aufweisen.^[8]

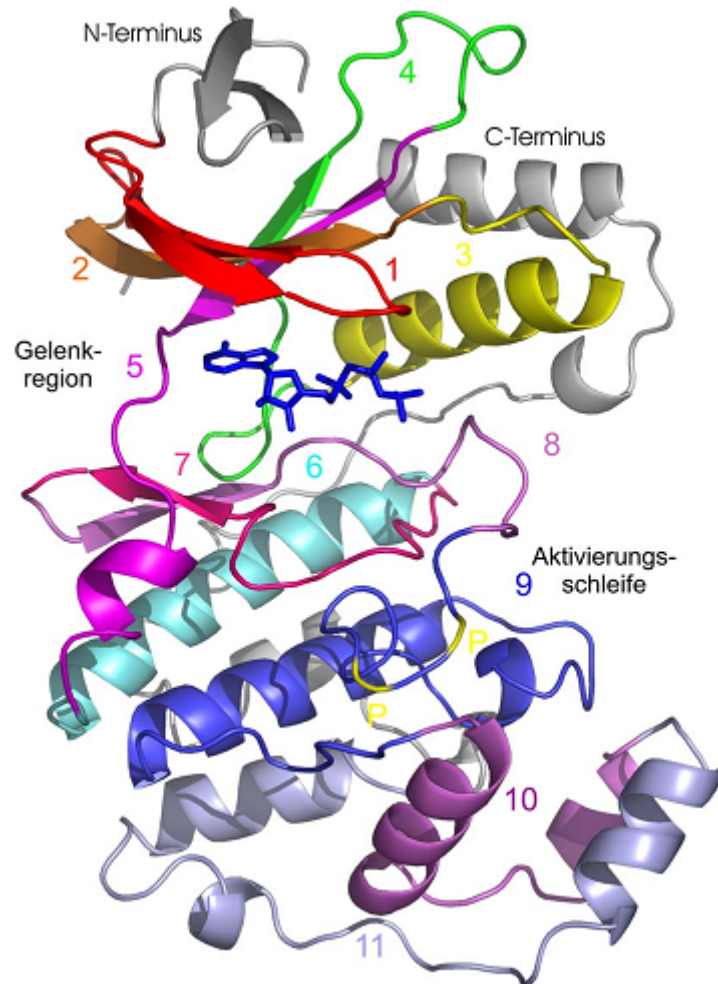


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung von Proteinkinasen am Beispiel der p38 MAPK (pdb-ID: 1A9U). Die 11 Subdomänen farbig hervorgehoben, die Phosphorylierungsstellen durch P markiert.^[7,9]

Innerhalb der Subdomäne VIII liegen bei den meisten Kinasen die Reste vor, durch deren Phosphorylierung eine Aktivierung stattfindet. Bei Mitgliedern der MAP Kinase-Familie ist eine Phosphorylierung von Thr und Tyr erforderlich. Dieser wichtige konservierte Bereich wird bei Kinasen auch als die Aktivierungsschleife bezeichnet. Obwohl Proteinkinasen das Substrat ATP auch in der katalytisch inaktiven Form binden, sind in einigen Fällen die Reste des aktiven Zentrums für eine Übertragung des Phosphatrests ungeeignet überlagert. Außerdem verschließt die Schleife oft die ATP-Tasche und/oder die Phosphat-Bindungsstelle, bevor eine Aktivierung erfolgt ist.

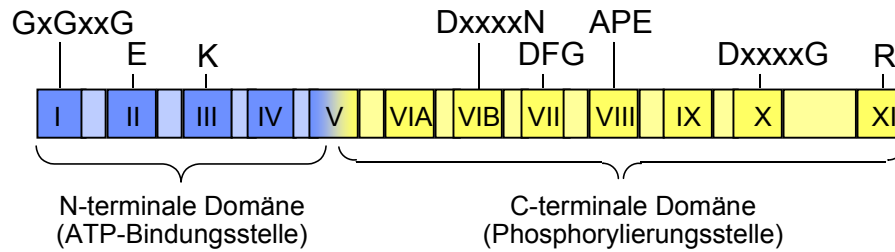


Abbildung 1.4 Zusammenfassung der Subdomänen mit den Aminosäureresten und hochkonservierten Motiven (Angabe der Aminosäuren im Einbuchstabencode); modifiziert nach Hanks.^[10]

Durch die Phosphorylierung wird in den meisten Fällen eine Konformationsänderung bewirkt, die die Bindungsstelle für das Substrat zugänglich macht und die katalytischen Reste für einen Phosphattransfer geeignet anordnet. Dabei erfolgen eine Bewegung der Aktivierungsschleife weg von der ATP-Bindungstasche, eine Rotation der C-Helix und die Änderung der Position der glycinreichen Domäne (Abbildung 1.5).

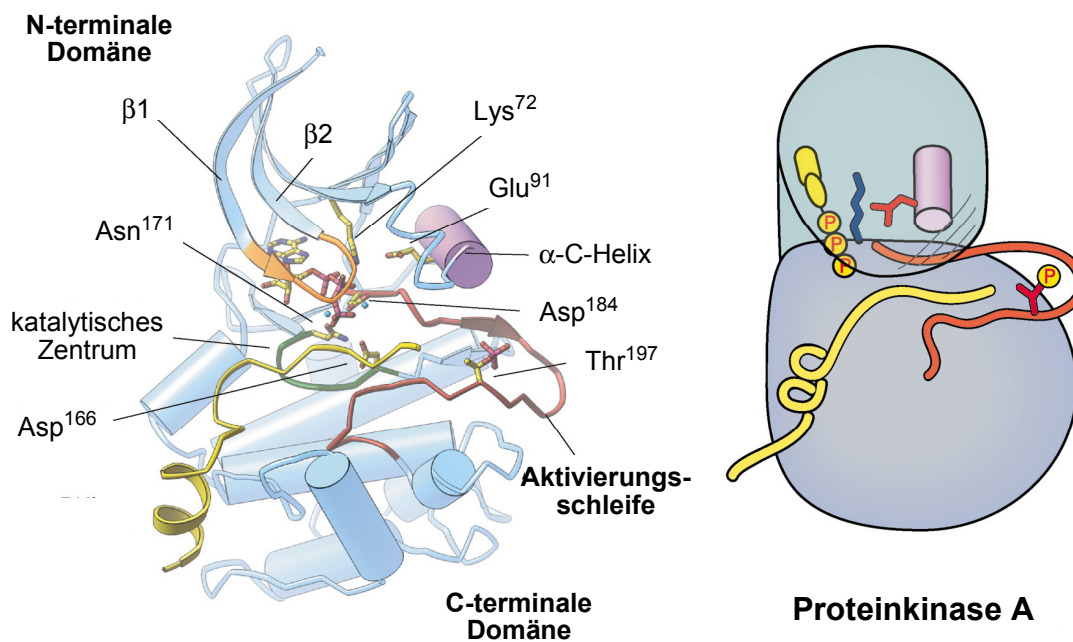


Abbildung 1.5 Die katalytisch aktive Form der Proteinkinase A; links: Kristallstruktur^[11] mit den Schlüsselementen der Kinase-Domäne in den Farben wie folgt: Aktivierungsschleife (Rot); α -C-Helix (Lila); katalytische Domäne (Grün); einzelne hochkonservierte Reste sind angegeben; rechts: abstrahiertes, schematisches Modell; modifiziert nach Huse und Kuriyan.^[12]

Abbildung 1.6 zeigt beispielhaft die Gegenüberstellung der aktiven und der inaktiven Form der MAP Kinase und macht die sterischen Änderungen deutlich, die durch die Autophosphorylierung bei der Aktivierungsschleife eintreten. Die Konformationsänderungen sind dabei eindeutig zu erkennen und wurden durch viele weitere Kristallstrukturanalysen von inaktiven und aktivierten Proteinkinasen, wie EGFR, CDK2 oder auch der Insulin-Rezeptor-Kinase bestätigt.^[13-15]

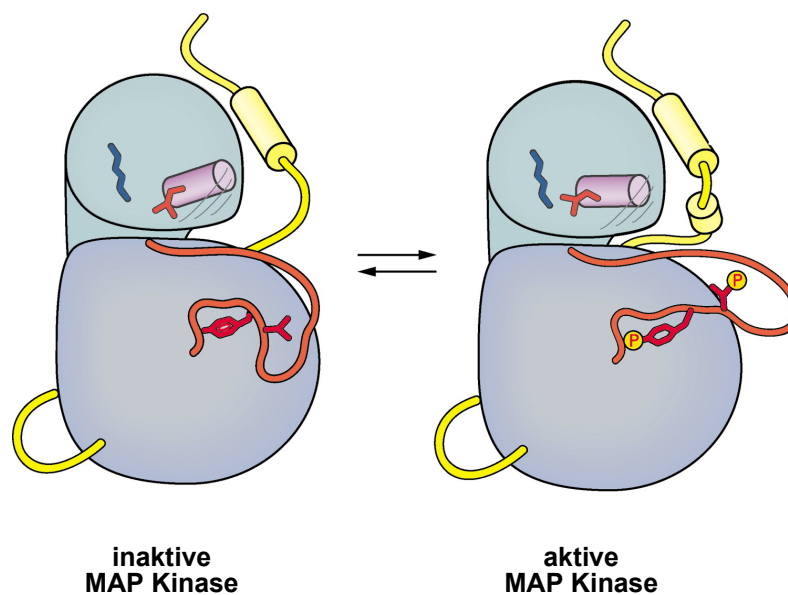


Abbildung 1.6 Gegenüberstellung der inaktiven und der aktivierten MAP Kinase als schematisches Modell; modifiziert nach Huse und Kuriyan.^[12]

Die Ähnlichkeiten, die in der Tertiärstruktur aller Proteinkinasen festzustellen sind, setzen sich in der ATP-Bindungsstelle fort. Da diese hochkonservierte Tasche eine große Herausforderung für die Entwicklung selektiver ATP-kompetitiver Kinase-Inhibitoren darstellt, soll sie im Folgenden näher erläutert werden.

1.1.3 Die ATP-Bindungstasche

Die Mehrzahl der gegenwärtigen Forschungsaktivitäten für Proteinkinase-Inhibitoren konzentriert sich auf die Entwicklung von ATP-kompetitiven Wirkstoffmolekülen. Diese sollen sich in die ATP-Bindungstasche einlagern und die Phosphorylierung der Substrate sowie der Kinase selbst hemmen. Naheliegender war es, Substanzen zu suchen, die analog zum Adenin Wasserstoffbrücken zu dem aktiven Zentrum ausbilden können.

Wie die analysierten Kristallstrukturen offenlegten, bestehen neben einer Adenin-, einer Ribose- und einer Phosphatbindungsstelle auch noch zwei hydrophobe Regionen, die das natürliche Substrat zwar nicht ausfüllen, den Inhibitoren jedoch zur stärkeren wie auch selektiven Bindung verhelfen können. Ein schematisches Diagramm des Aufbaus der ATP-Bindungsstelle von Proteinkinasen zeigt Abbildung 1.7.

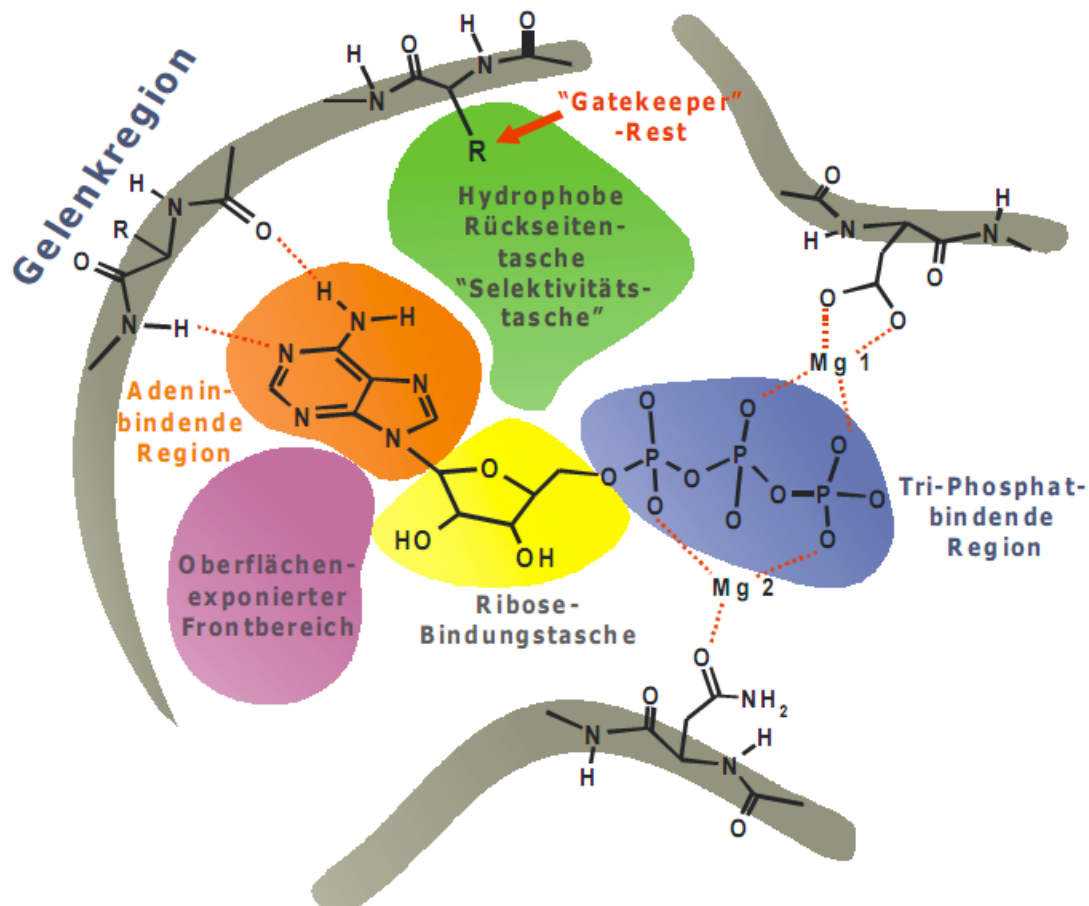


Abbildung 1.7 Aufbau der ATP-Bindungsstelle von Proteinkinasen. ^[9,16-18]

Die ATP-Bindungsstelle der Proteinkinasen besteht aus mehreren Unterbereichen, die im strukturbasierten Hemmstoffdesign ausgenutzt werden können und potentielle Interaktionspunkte bieten. ^[9,16-18] Sehr deutlich variieren diese von Adenin unvollzogenen Wechselwirkungen zwischen den 518 bekannten menschlichen Kinasen und bieten Spielraum für eine selektive Bindung von Wirkstoffen.

Die ATP-Bindungsregion der Proteinkinasen ist aus fünf bzw. sechs Regionen aufgebaut:

1. *Die Gelenkregion (Linker-Region):*

Diese Region besteht aus dem Abschnitt der Proteinkette, welcher die N- und C-terminalen Domänen miteinander verbindet. Die Gelenkregion geht wichtige Wasserstoffbrückenbindungen mit ATP sowie mit der großen Mehrzahl der bis dato publizierten Hemmstoffmoleküle ein. Mindestens eine Wasserstoffbrücke wird praktisch bei allen in der Proteindatenbank (PDB) bekannten Kinase-Ligand-Strukturen ausgebildet. Hier können in Abhängigkeit von variierenden Domänen-Interaktionen der N- und C-Schleifen sowie unterschiedlichen Raumbeanspruchungen von Seitenketten der Aminosäure-Reste innerhalb der Gelenkregion einzelner Kinasen verschieden große Substituenten in enger Nähe zu den Donor-Akzeptor-Atomen des jeweiligen Hemmstoffs untergebracht werden. Eine optimale Wasserstoffbrückenbindungsgeometrie resultiert in (hoch) potenten Liganden, auch dann, wenn andere Wechselwirkungen zwischen Enzym und Hemmstoff verhältnismäßig unvorteilhaft sind.

2. *Die Adenin-bindende Region (Purin-Bindungsstelle):*

Die zentrale Purin-Bindungsstelle kann zahlreiche Van-der-Waals-Kontakte eingehen, welche das ATP und andere Liganden ausnutzen. Hierfür verantwortlich sind die Reste lipophiler Aminosäuren, die in vielen Proteinkinasen konserviert vorliegen. Dennoch erlauben subtile Unterschiede im Volumen dieser Tasche, die von geringfügigen Abweichungen der Aminosäurereste herrühren, möglicherweise eine Modulation der Kinase-Inhibitor-Selektivität (vgl. ASKA-Technologie).^[19] Der Adeninanteil des natürlichen Kosubstrats ATP kommt tief in der Spalte zwischen den beiden Enzym-Domänen (N- und C-Schleife), der sogenannten Adenin-bindenden Region, zu liegen und wird durch die oben erwähnten lipophilen Aminosäuren umschlossen. Folglich befindet sich typischerweise nur das γ -Phosphat des ATP im katalytisch aktiven Enzymbereich, wodurch es für die Übertragung auf das Substrat zugänglich ist. Auch alle ATP-

kompetitiven Inhibitoren binden in diesem hydrophoben Bereich der Kinase und interagieren von dort aus mit der Gelenk-Domäne über Wasserstoffbrückenbindungen. Die lipophile Natur der Tasche und die daraus resultierende Eingrenzung des Liganden legen nahe, dass der hydrophobe Effekt die maßgebliche Triebkraft für die Bindung von Inhibitoren darstellt. Dies drückt sich in der linearen Beziehung zwischen der lipophilen Kontakt- oder Höhlenoberfläche und der Bindungsaffinität zahlreicher ATP-kompetitiver Liganden aus.

3. *Die Ribose-Bindungstasche:*

In einem Bereich am Rand der ATP-Bindungstasche befindet sich die Ribose-Bindungstasche, die zum Solvens hin geöffnet ist. Orientiert ist sie in Richtung der C-terminalen Domäne. In dieser Region gibt es Aminosäuren, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Wechselwirkungen mit der Ribose und mit bekannten Hemmstoffen eingehen. Wegen des partiell hydrophilen Charakters wird dieser Bezirk auch oft ausgenutzt, um lösungsverbessernde Gruppen von Inhibitormolekülen unterzubringen. Die Ribose-Bindungstasche enthält zudem unikale Reste, welche zur Beeinflussung der Selektivität von Leitstrukturen beitragen können. Allerdings sind die nahe zur Ribose gelegenen Aminosäuren unter den Kinasen meist konserviert und daher weniger zu selbigem Zweck geeignet.

4. *Die Hydrophobe Rückseitentasche (Hydrophobe Region I):*

Dieser Bereich befindet sich tief im Inneren der ATP-Bindungsregion. Die Hydrophobe Region I steht in keiner bindenden Wechselwirkung mit dem Kofaktor ATP. Die Ausdehnung dieses als Tasche ausgebildeten Gebietes wird definiert durch die Größe der lipophilen Seitenketten der umgebenden Aminosäuren, die weniger konserviert sind und von Kinase zu Kinase variieren können. Damit bietet sich diese Kavität der medizinischen Chemie als Ziel für das Design selektiver Hemmstoffe an. Man bezeichnet sie daher mitunter auch als „Selektivitätstasche“.^[20] Der Zugang zu dieser hydrophoben Tasche wird durch den sogenannten „Gatekeeper“-Rest kontrolliert.

5. *Oberflächen-exponierter Frontbereich (Hydrophobe Region II):*

Die Hydrophobe Region II liegt vor der Adenin-bindenden Region und ist ausgebildet als eine Art lipophile Kerbe, die sich zum Solvens hin öffnet. ATP geht hier, ebenso wie in der „Selektivitätstasche“, keine bindenden Wechselwirkungen ein. Somit ergeben sich auch hier Möglichkeiten zur Erhöhung der Bindungsaffinität und der Verbesserung der Selektivität für potentielle Hemmstoffe. Wenngleich sich eine optimale Ausmodellierung der weiträumigen Kerbe durch geeignete (lipophile) Reste nicht ganz trivial gestaltet, setzt die Medizinische Chemie hinsichtlich der Optimierung ihrer Leitstrukturen vermehrt auf zusätzliche effiziente Wechselwirkungen mit diesem nicht hochkonservierten Enzymbereich. Demzufolge besitzen viele in jüngster Zeit bekannt gewordene Hemmstoffe Substituenten, die diese Region adressieren und dabei vermutlich den Hemmstoff in der aktiven Bindungsstelle besser verankern, wodurch die Aktivität und die Selektivität der Verbindungen nachweislich gesteigert werden kann.

6. *Die Phosphat-Bindungsregion:*

Die Phosphat-Bindungsdomäne ist ebenfalls eine hochkonservierte Region der aktiven Bindungsstelle, was der wichtigen Rolle der entsprechenden Aminosäuren zugeschrieben werden kann, die diese sowohl in der Katalyse als auch in der Koordination des Triphosphats über zwei zweifach geladene Metallionen spielen. In den meisten Fällen werden die negativen Ladungen der Phosphatgruppen durch Magnesiumionen kompensiert. Diese hydrophile Region ist stark lösungsmittlexponiert und scheint für die Affinität eine eher untergeordnete, allenfalls modulierende Bedeutung zu haben. Es sind bislang nur sehr wenige Hemmstoffe beschrieben, die weit in diese Bindungsstelle hineinreichen, wofür wohl die folgenden zwei Gründe in Betracht kommen:

- Hohe Affinität kann auch ohne Kontakt zu diesen Aminosäure-Resten erreicht werden.

- Man vermutet, dass eine dahingehende Derivatisierung der Inhibitoren, jenen Raum des katalytischen Zentrums mit zu beanspruchen, die Spezifität der Verbindungen wegen der Komplementarität mit den hochkonservierten Zügen dieser Region vermindern würde.

Dennoch ist es vorstellbar, dass die räumlichen Unterschiede in der Phosphat-Bindungsstelle verschiedener Enzyme (induziert durch die Phosphorylierung der Aktivierungsstelle) der Wirkstoffforschung die Möglichkeit zur Einbeziehung von Spezifitätscharakteren bieten. Ein weiterer Vorbehalt, diese Region nicht durch Hemmstoffe zu adressieren, sind die dort befindlichen vielfach geladenen Aminosäuren. Die Einführung ionisierbarer Gruppen in Wirkstoffmoleküle, die mit den entsprechenden Aminosäureresten interagieren können, vermögen die Permeabilität dieser Moleküle durch biologische Membranen nachteilig zu beeinflussen. Eine adäquate Einfügung wasserstoffakzeptierender Gruppen in die Hemmstoffkandidaten könnte jedoch einige dieser potentiellen Interaktionsstellen erreichen. Innerhalb der Region der ATP-Bindungsstelle kommt dem sogenannten "Gatekeeper" (gk) eine sehr bedeutsame Rolle zu und ist der Bezugspunkt für die Aminosäuren der Gelenkregion, die entsprechend ihrer Position zu diesem Rest als gk+1 oder gk+3 bezeichnet werden. Die Größe der jeweiligen Seitenkette der verschiedenen Aminosäuren, die den "Gatekeeper" darstellen, ist entscheidend für die Zugänglichkeit der Hydrophoben Region I. Daher wird dieser Bereich wie erwähnt auch als „Selektivitätstasche“ bezeichnet (siehe Abbildung 1.7). Damit eröffnet sich zwar die Möglichkeit, einen Hemmstoff mit einer gewissen Selektivität zu versehen, da aber alle Proteinkinasen ein hochkonserviertes Motiv von möglichen Wechselwirkungen zwischen Hemmstoffmolekül und der Gelenkregion aufweisen, ist die Zahl der möglichen Grundstrukturen begrenzt, die das Adenin des nativen Substrates ATP ersetzen können.^[21] Eine zweidimensionale Übersicht des Aufbaus der Adenin-Bindungsregion (siehe Abbildung 1.8) und einen Gesamtüberblick aller bisher bekannten Leitstrukturen geben Ghose *et al.*^[22]

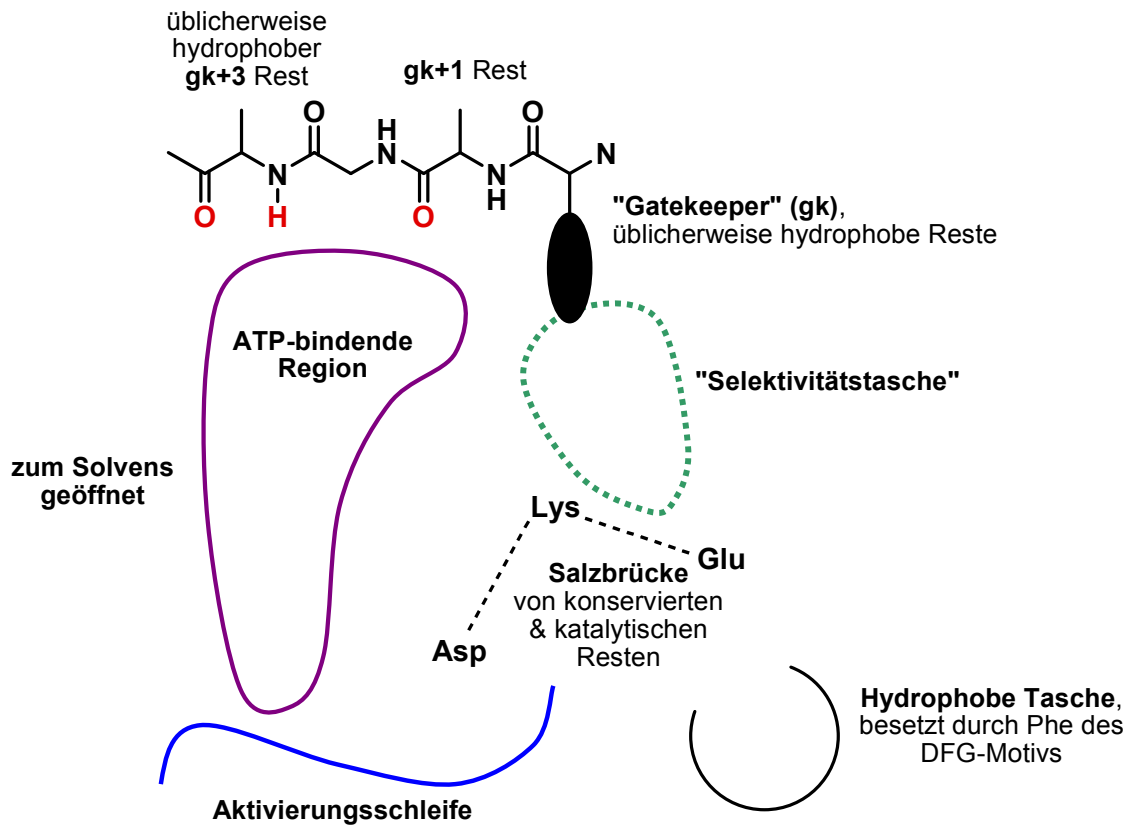


Abbildung 1.8 Zweidimensionale Darstellung der Bindungsstellen von Proteinkinasen.^[22-23]

1.2 Die p38 MAP Kinase

1.2.1 Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zu der Familie der Serin-/Threonin-Kinasen und sind in die unterschiedlichsten zellulären Prozesse, wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose involviert und an zellulären Antworten beteiligt.^[24] Derzeit sind drei verschiedene MAP Kinase-Kaskaden in Säugetierzellen bekannt, und zwar die durch die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38 MAP Kinase vermittelten Signaltransduktionswege.^[25-27] Die verschiedenen MAP Kinase-Kaskaden sind in vergleichbarer Weise aufgebaut. Eine Übersicht gibt Abbildung 1.9.

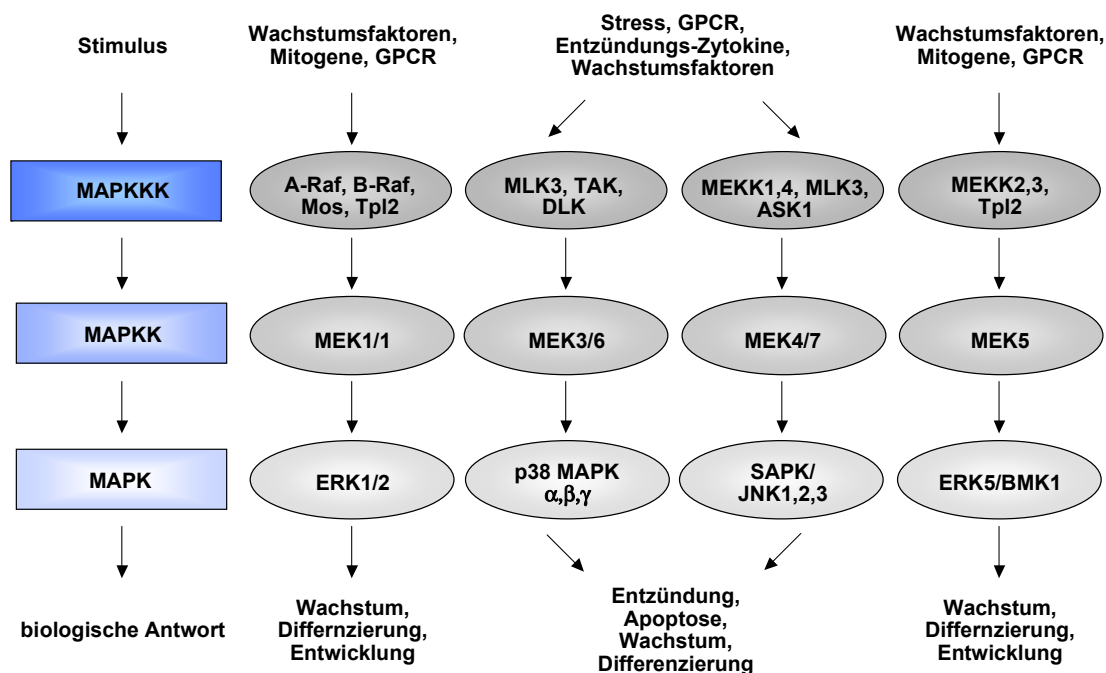


Abbildung 1.9 Illustration des allgemeinen MAP Kinase-Signaltransduktionsweges

Strukturell unterscheiden sich die drei Klassen von MAP Kinasen im Bereich der Phosphorylierungsstelle und der ATP-Bindungs tasche (Tabelle 1.1).^[27-29] Die betreffenden Aminosäuremotive sind auf den Aktivierungsschleifen der Kinasen lokalisiert und ermöglichen eine selektive Aktivierung der einzelnen Kinasen.^[25] Von der humanen p38 MAP Kinase sind derzeit vier Isoformen bekannt: p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ .^[30-31] Diese Subtypen besitzen unterschiedliche Homologien zu anderen MAP Kinasen, z.B. ist p38 α zu 50% homolog mit ERK2.^[30] Auch innerhalb der Subtypen der p38 MAP Kinasen ist die Sequenzhomologie sehr unterschiedlich: p38 β , p38 γ und p38 δ sind je zu 75%, 62% und 64% mit p38 α identisch.^[24]

Tabelle 1.1 Sequenzabschnitte verschiedener MAPK-Isoformen

MAPK-Isoform	ATP-Bindungsstelle	Phosphorylierungsstelle
p38 α	Thr ¹⁰⁶ -His ¹⁰⁷ -Leu ¹⁰⁸ -Met ¹⁰⁹	Thr ¹⁸⁰ -Gly ¹⁸¹ -Tyr ¹⁸²
p38 β	Thr ¹⁰⁶ -Thr ¹⁰⁷ -Leu ¹⁰⁸ -Met ¹⁰⁹	Thr ¹⁸⁰ -Gly ¹⁸¹ -Tyr ¹⁸²
p38 γ	Met ¹⁰⁹ -Pro ¹¹⁰ -Phe ¹¹¹ -Met ¹¹²	Thr ¹⁸³ -Gly ¹⁸⁴ -Tyr ¹⁸⁵
p38 δ	Met ¹⁰⁷ -Pro ¹⁰⁸ -Phe ¹¹⁰ -Met ¹¹¹	Thr ¹⁸³ -Gly ¹⁸⁴ -Tyr ¹⁸⁵
JNK3	Met ¹⁴⁶ -Glu ¹⁴⁷ -Leu ¹⁴⁸ -Met ¹⁴⁹	Thr ²²¹ -Pro ²²² -Tyr ²²³
ERK2	Gln ¹⁰³ -Asp ¹⁰⁴ -Leu ¹⁰⁵ -Met ¹⁰⁶	Thr ¹⁸³ -Glu ¹⁸⁴ -Tyr ¹⁸⁵

1.2.2 Aktivierung und Effekte der p38 MAP Kinase

Wie alle anderen Kinase-Kaskaden wird die p38 MAP Kinase-Kaskade ebenfalls durch extrazelluläre Signale aktiviert. Zu den Stimuli gehören entzündungsfördernde Zytokine, DNA-Zerstörung, oxidativer Stress oder UV-Licht. Die p38 MAP Kinase wird durch zweifache Phosphorylierung an Threonin¹⁸⁰ und Tyrosin¹⁸² durch eine in der Kaskade höherstehende Kinase (MAPKK) aktiviert. Das Thr-Gly-Tyr (TGY) Motiv der p38 befindet sich auf der Aktivierungsschleife. Durch die Phosphorylierung nimmt diese Schleife eine veränderte Konformation ein, so dass ATP am katalytischen Zentrum gebunden werden kann.^[29] Die Phosphorylierung fördert zum einen die enzymatische Aktivität der MAP Kinase, zum anderen aber auch deren Dimerisierung. Nur die dimere Form des Enzyms gelangt in den Zellkern, wo die MAP Kinase eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie ATF-1 und 2 (activation transcription factor-1 und 2) sowie den MEF 2C (myocyte enhancer factor 2C) aktiviert.^[32] Des Weiteren werden nachgeschaltete Kinasen durch Phosphorylierung, wie die MAP Kinase-abhängigen Proteinkinasen 2,3 und 5 (MAPKAPK2,3 und 5) sowie die MSK-1 (mitogen- und stress-activated protein kinase-1) aktiviert, über welche die p38 MAP Kinase zelluläre Antworten steuern kann. Die aktivierte MAPKAPK2 phosphoryliert Enzyme, die an die Adenosin/Uridin (AU)-reiche Region von mRNA binden, wodurch eine Stabilisierung von AU-reicher mRNA erfolgt, wie sie beispielsweise in der Matrize für IL-1 vorkommt. Zum anderen wird die Translation unmittelbar beeinflusst, indem AU-bindende Proteine, welche die Proteinbiosynthese regulieren, aktiviert werden. Über den letztge-

nannten Weg fördert die p38 MAP Kinase hauptsächlich die zelluläre TNF- α Produktion.^[33] Alles in allem handelt es sich bei der p38 MAP Kinase also um ein Schlüsselenzym für die Bereitstellung entzündungsfördernder Enzyme, die ihre Wirkung sowohl auf transkriptionischer als auch translatorischer Ebene entfalten. Der komplette Signaltransduktionsweg der p38 ist in Abbildung 1.10 dargestellt.^[25]

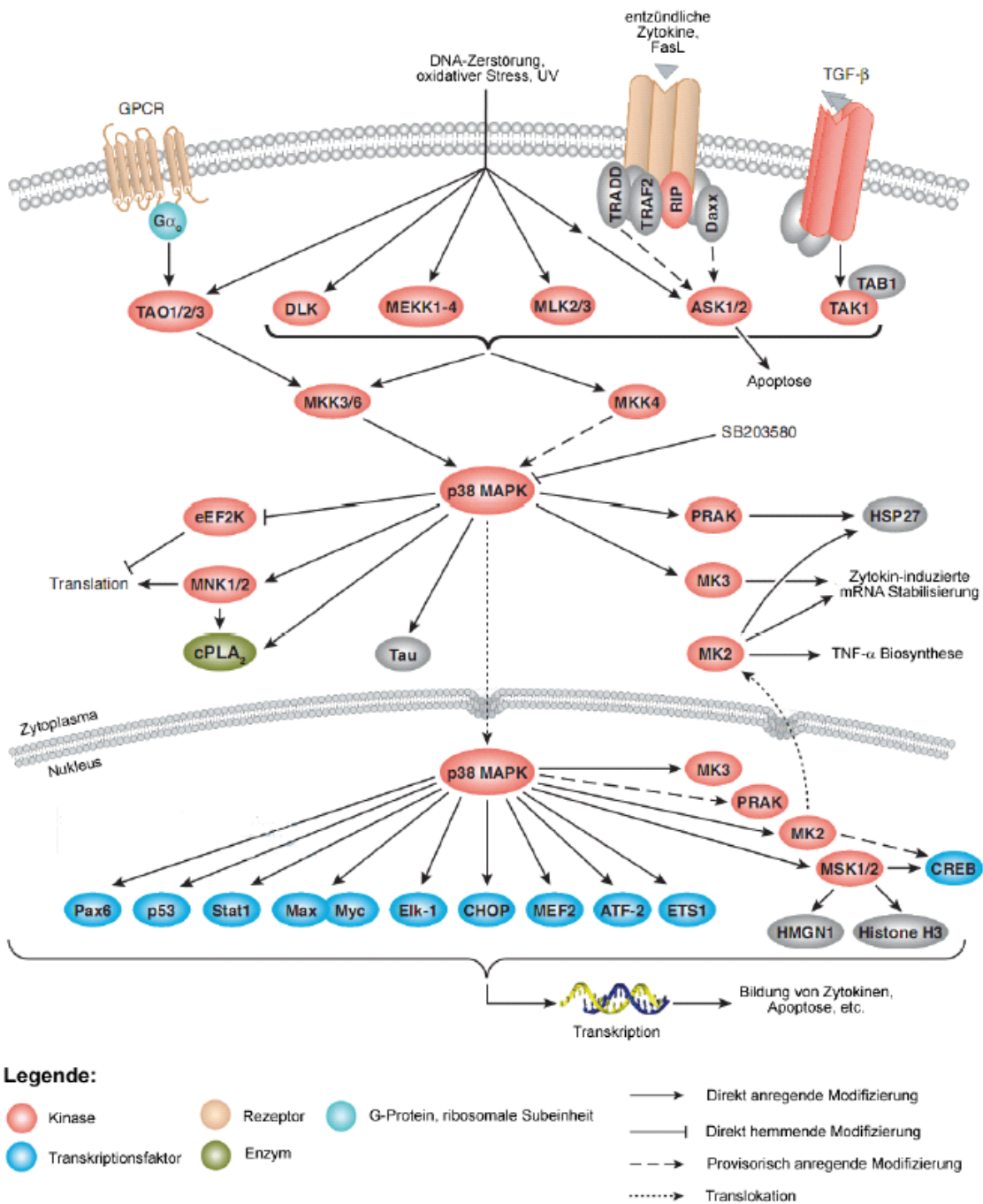


Abbildung 1.10 Signaltransduktionsweg der p38 MAP Kinase.^[23,34]

1.2.3 Identifizierung der p38 MAP Kinase als molekulare Zielstruktur

Die p38 MAP Kinase ist heute eine der am umfassendsten studierten Kinasen, und das auf Grund ihrer wichtigen Rolle als Schlüsselenzym in der Produktion von entzündungsfördernder Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β . Identifiziert als solches wurde die Kinase retrospektiv. Bereits 1960 stießen die antientzündlichen Eigenschaften bestimmter Imidazol-Derivate, die bei pharmakologischen Untersuchungen verschiedener heterozyklischer Verbindungen in Tiermodellen der Arthritis beobachtet werden konnten, auf großes Interesse. Der zu Grunde liegende Wirkungsmechanismus war zu dieser Zeit noch nicht bekannt. Lombardino *et al.*^[35] entdeckten in einer ersten systematischen Untersuchung 4,5-bisarylierter, *N*-unsubstituierter Imidazole, die gegenüber der Referenzsubstanz Indomethacin 5-fach stärkere Wirksamkeit des Flumizols im Rattenpfoten-Ödem-Testmodell zeigten. Aus diesen Arbeiten ging das in den Positionen 5 und 6 symmetrisch substituierte Imidazo[2,1-*b*]thiazol SK&F 81114 hervor (Abbildung 1.11), das sich besonders durch die Wirksamkeit in Modellen der akuten Entzündung auszeichnete.^[36-39] Durch den Austausch des Pyridin-2-yl-Substituenten gegen das 4-Isomer sowie durch asymmetrische Substituenten in den Positionen 4 und 5 des Imidazol-Rings konnte ein entscheidender Fortschritt erzielt werden. Diese Strukturmerkmale wurden zuerst in dem 1979 von Bender und Lantos^[36-38] entwickelten Imidazothiazol SK&F 86002 verwirklicht (Abbildung 1.11).^[40] Ohne dass der Wirkmechanismus oder die molekulare Zielstruktur dieser antirheumatisch wirksamen Verbindung bekannt gewesen war, stellte sie im Gegensatz zu Verbindungen vom Typ des SK&F 81114 ihre Effektivität vor allem in chronischen Entzündungsmodellen unter Beweis. Die erstmalige Entdeckung der p38 MAP Kinase als molekulare Zielstruktur für diese neue Klasse der Pyridin-4-yl-imidazole als entzündungshemmende Wirkstoffe gelang 1994 Lee und Young^[41], wodurch die genaue Erforschung dieser Enzym-Klasse wie auch die Suche nach selektiven, wirksamen und sicheren Hemmstoffen für dieses neue Target in Gang gesetzt wurden.

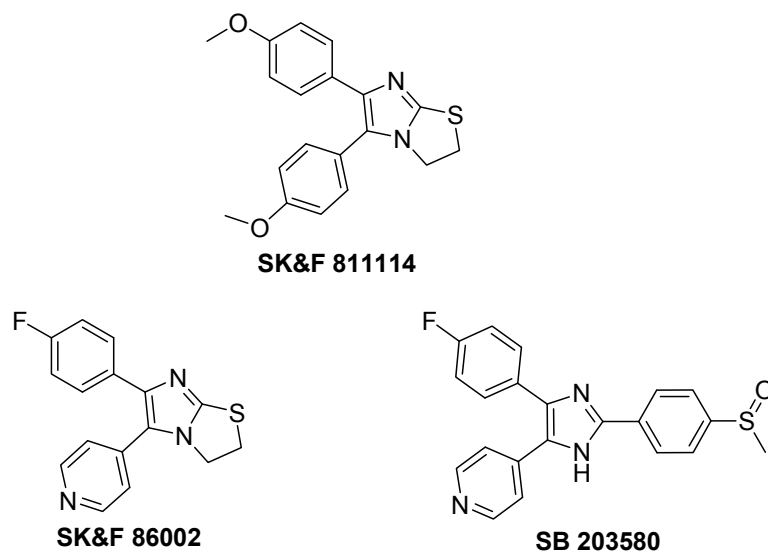


Abbildung 1.11 Strukturen der entzündungshemmenden Imidazothiazole SK&F 811114 und SF&F 86002 sowie der Standardverbindung aus der Klasse der Pyridinylimidazole SB 203580.

Von den vier derzeit bekannten Isoformen der p38 Familie (α , β , γ und δ) werden die p38 α - und β -Formen ubiquitär im menschlichen Organismus exprimiert. Die p38 γ -Form kommt vor allem in der Skelettmuskulatur und auch im Herzgewebe vor und spielt in der Pathophysiologie des Herzens eine wichtige Rolle. Über die Funktion der p38 δ -Form ist wenig bekannt. Sie wird hauptsächlich in der Lunge, den endokrinen Organen, den Nieren und im Dünndarm exprimiert.^[25,33,42] Wie andere MAP Kinasen besitzen auch die unterschiedlichen Isoenzyme gleichzeitig übergreifende physiologische Funktionen.^[25, 41] Tabelle 1.2 gibt einen Überblick.

Tabelle 1.2 Expressionsorte der p38 MAP Kinase Isoformen.^[25,41]

p38-Isoform	Zellulärer Expressionsort	Vorkommen in Gewebetypen
p38 α	alle Zelltypen	ubiquitär im menschlichen Organismus
p38 β	T-Zellen, Endothelzellen	
p38 γ	T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, Monozyten	Skelettmuskulatur, Herzgewebe
p38 δ	geringe oder keine Expression in Zellen des Immunsystems	Lunge, endokrine Organe, Niere, Dünndarm

Auf Grund der unterschiedlichen Expressionsorte (siehe Tabelle 1.2), der verschiedenen Aktivierungswege und ihrer Substratspezifität unterscheiden sich p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ in ihrer physiologischen Funktion.^[25,33,41] In denjenigen Zelltypen, die eine Rolle im Entzündungsgeschehen spielen, ist die p38 α die vornehmlich aktivierte Isoform und wird allgemein als wichtigste in der Signalübermittlung bei entzündlichen Prozessen angesehen.^[25]

Obgleich die Entzündung ein fundamentaler, physiologischer Prozess ist, der eine wesentliche Rolle für das Leben spielt, ist sie gleichzeitig eine der bedeutendsten Ursachen für die menschliche Morbidität und Sterblichkeit. Eine große Anzahl von Krankheiten haben ihren Ursprung in dem komplexen Prozess der Entzündung und im Besonderen in einer überaktiven Immunantwort, die bekanntesten beinhalten die Rheumatoide Arthritis^[42-43], Psoriasis, Multiple Sklerose^[44] sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.^[45] Die p38 α MAP Kinase stellt ein geeignetes Ziel für die Entwicklung eines entzündungshemmenden Arzneimittels dar.

1.2.4 p38 MAP Kinase Inhibitoren und Bindemodi

Seit der Identifizierung der p38 MAP Kinase als molekulare Zielstruktur besteht von Seiten der Pharmazeutischen Industrie ein unnachgiebiges Bestreben, neue, potente, selektive und unbedenkliche p38 α Inhibitoren zu entwickeln.^[46] Als Prototyp für p38 Hemmstoffe ging man vom fast 20 Jahre alten bizyklischen Pyridinyl-Imidazol SK&F 86002 aus (Abbildung 1.11), das wie beschrieben selbst zur Entdeckung der p38 MAP Kinase beitrug. Innerhalb der letzten sechs Jahre befanden sich p38 Hemmstoffe der Firmen Amgen, GlaxoSmithKline, Bristol-Myers Squibb, Boehringer Ingelheim, Scios, Pfizer und Vertex in der klinischen Prüfphase I. Nur drei Firmen (Boehringer Ingelheim, Scios und Vertex) berichteten über die Entwicklung neuer Hemmstoffe in klinischen Studien der Phase II.^[46]

Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick über die unterschiedlichen Strukturklassen und Bindungsmodalitäten der in den letzten Jahren veröffentlichten p38 Hemmstoffe vermitteln. Bis zum jetzigen Zeitpunkt können die bekannten Hemmstoffe in sechs chemische Klassen eingeteilt werden (Abbildung 1.12):

- Pyridinyl- bzw. Pyrimidinylimidazole und verwandte Strukturen, wie z. B. SB 203580
- Bizyklische 6,6-Heterozyklen und verwandte Strukturen, wie z. B. VX 745
- N,N'-Diarylarnstoffe und verwandte Strukturen, wie z. B. BIRB 796
- Substituierte Benzamide, wie z. B. die Verbindung von Bristol-Myers Squibb
- Diarylketone, wie z. B. die Verbindung von Leo Pharmaceuticals und Novartis
- Indolamide, wie z. B. SCIO 469.

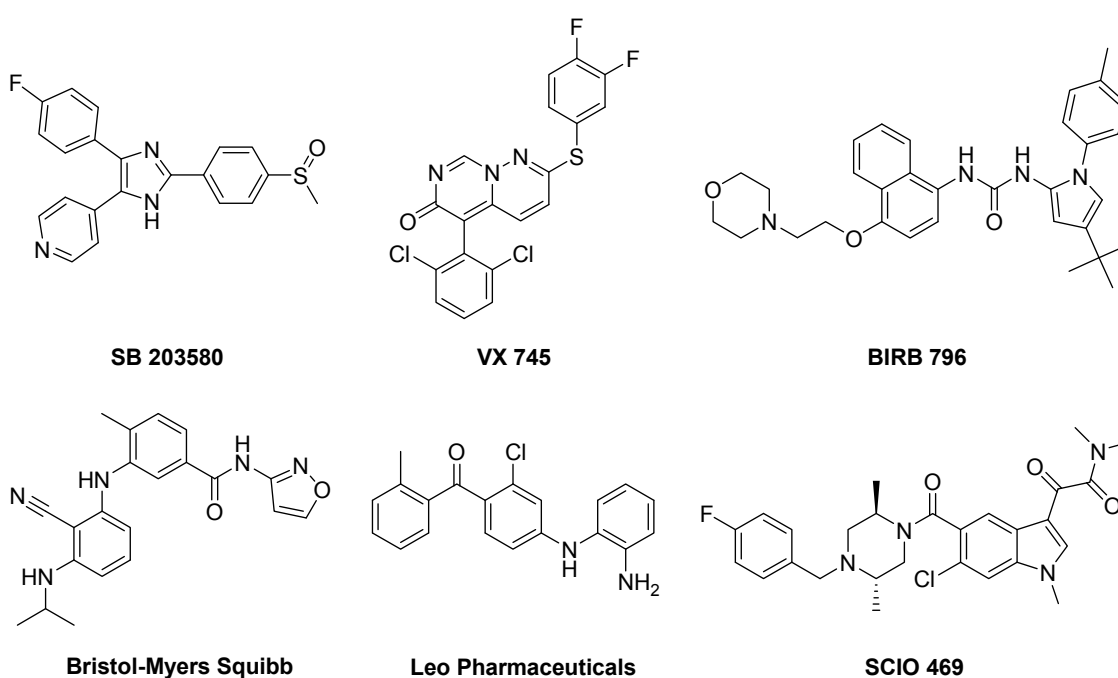


Abbildung 1.12 Übersicht der p38 MAP Kinase Hemmstoff-Klassen

Die Hemmstoffe zeigen jedoch nicht nur Vielfältigkeit in ihrer chemischen Struktur, sondern auch in der Wechselwirkung mit dem Enzym. Von den bisher vorgestellten Hemmstoffen sind drei allgemeine Bindungsmodi bekannt, wie in Abbildung 1.13 zu sehen: der „Tränen“-Bindemodus („Teardrop Binder“), der lineare („Linear Binder“) und der erweiterte Bindemodus („Extended Binder“).

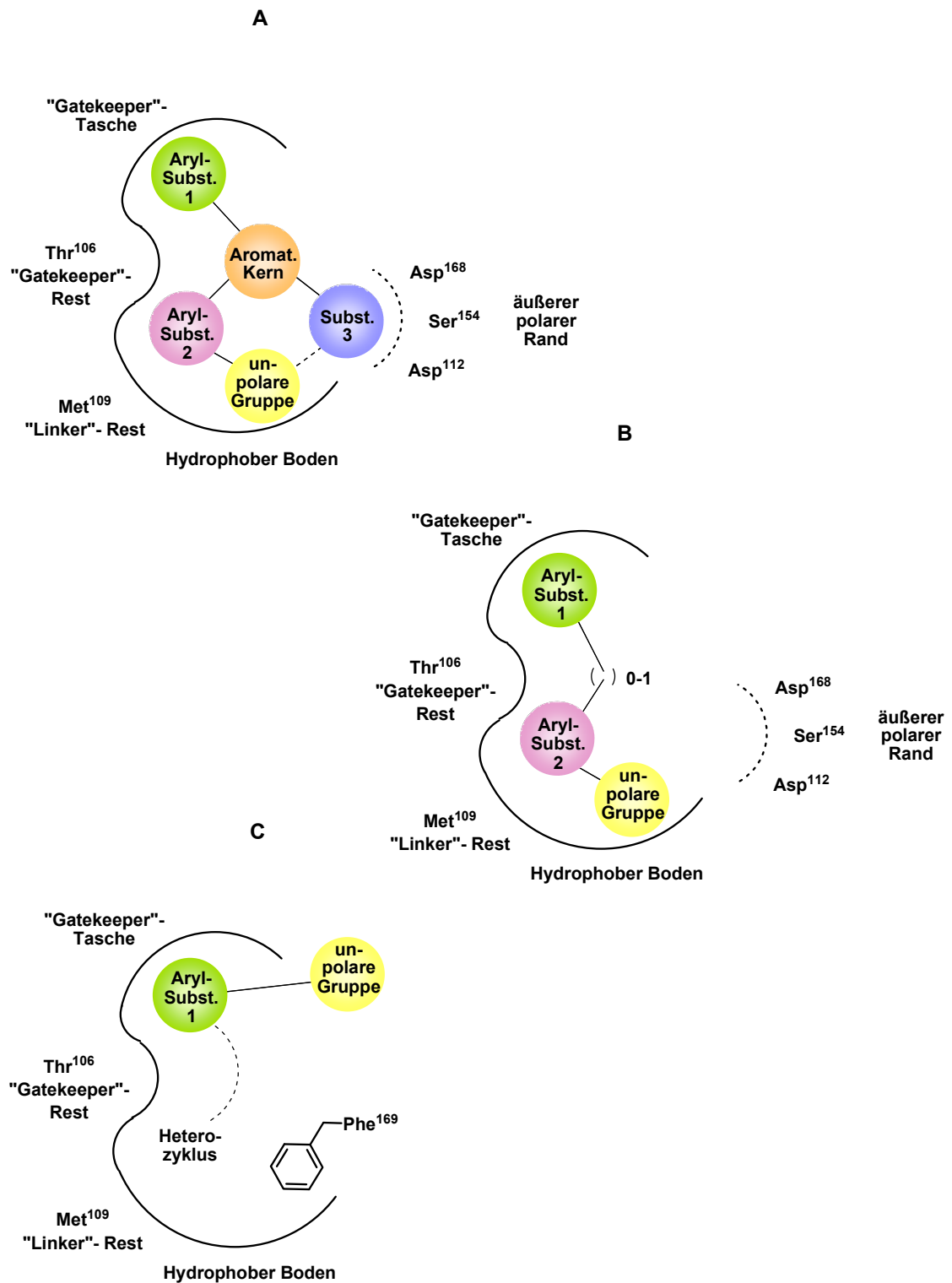


Abbildung 1.13 Schematische Darstellung der p38 α Bindemodi; A Bindemodus der "Teardrop Binder", B Bindemodus der "Linear Binder", C Bindemodus der "Extended Binder"; modifiziert nach Lee et al. ^[46]

Die Mehrzahl der bis heute veröffentlichten p38 Hemmstoffe einschließlich des Prototypen SB 203580 können zum „Tränen-Bindemodus“ gezählt werden. Einige Strukturbeispiele für „Teardrop Binder“ sind in Abbildung 1.14 gegeben.

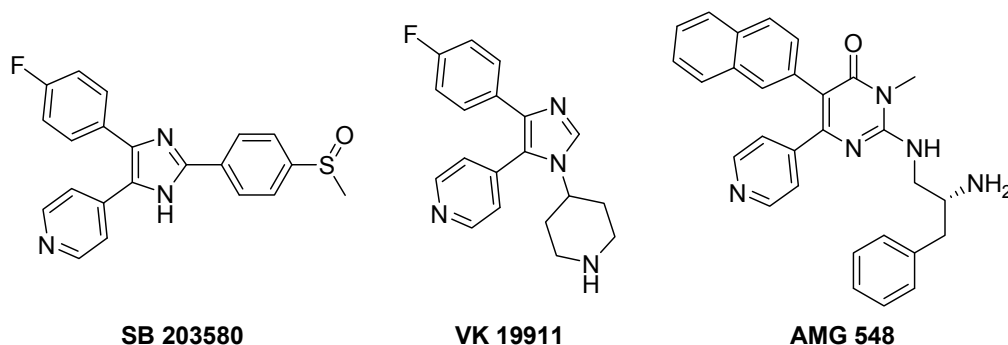


Abbildung 1.14 Strukturbeispiele für „Teardrop Binder“

Chemisch klassifiziert werden können die Verbindungen als diarylsubstituierte Arene. Die meisten Vertreter weisen einen fünfgliedrigen Kern auf, in der Regel ein Imidazol, andere einen sechsgliedrigen Ring wie Pyrimidin und Pyrazin. Beschrieben werden ferner kondensierte aromatische Systeme als Grundgerüst für ATP-kompetitive Inhibitoren. Charakteristisch für diesen Bindemodus ist die dreidimensionale Konformation der Inhibitoren, die sie bei der Bindung an das Enzym einnehmen. Im Falle von SB 203580 wird die hydrophobe Tasche vom 4-Fluorphenylring, der Spitze des „Tränentropfens“, ausgefüllt. Die Hydrophobe Region I der ATP-Bindungsstelle wird hier als „Gatekeeper“-Tasche bezeichnet, da sie die Eigenschaft besitzt, durch den „Gatekeeper“-Rest einen Liganden zu binden oder abzuweisen. Im Falle der p38 α MAP Kinase ist dieser Rest das Thr¹⁰⁶, dessen Seitenkette kleiner ist als bei den meisten Proteinkinasen. Dieser besagte Unterschied bewirkt die Selektivität des Hemmstoffs gegenüber den verschiedenen Isoformen.^[27] Außerdem wird dadurch eine größere „Gatekeeper“-Tasche oder Hydrophobe Region I gebildet, was die direkte Verbindung mit einem zweiten essenziellen Ring gestattet. Der weitere heterozyklische, aromatische Ring, bei SB 203580 ein 4-Pyridin-Ring, bildet die wichtige Wasserstoffbrückenbindung zum Amid-NH des Met¹⁰⁹ (sogenannter „linker residue“) in der Gelenkregion aus. Dieser und die verbleibenden Strukturelemente des Inhibitors bilden die große Wölbung der Tropfenform aus (Abbildung 1.13). Weitere wesentliche Interaktionspunkte des Prototypen sind die Wasserstoffbrücke zum Lys⁵³ über eines der beiden Imidazol-

Stickstoffatome und die π - π -Wechselwirkungen des 4-Methylsulfinylphenyl-Rings mit Tyr³⁵.^[27,47] Eine schematische Darstellung der Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Pyridinylimidazol ist in Abbildung 1.15 gegeben. Erste klinische Untersuchungen mit SB 203580 wurden jedoch eingestellt, da im Tierversuch eine massive Zunahme des Lebergewichts festgestellt wurde.^[48-49] Die Ursache hierfür liegt in der Toxizität durch die Interaktion der Pyridin-4-yl-imidazole mit dem Cytochrom P450 System (CYP 450). Verbleibt die C²-Position des Imidazolrings frei, so kann die Affinität zur p38 α MAP Kinase durch Substituenten mit lipophilen Eigenschaften am N¹ erhöht werden und damit auch die Aktivität gegenüber dem Enzym.

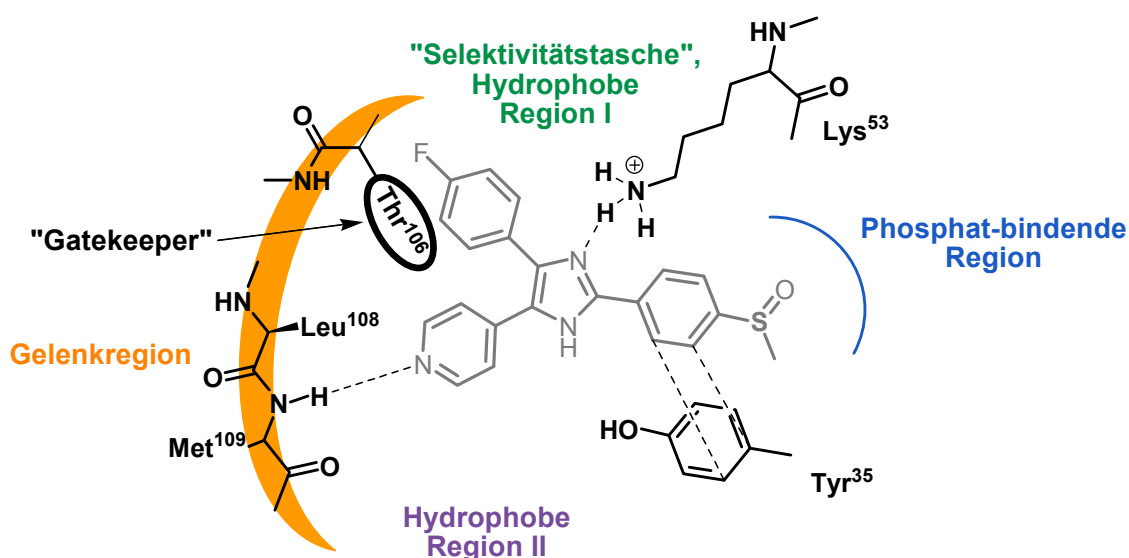


Abbildung 1.15 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Pyridinylimidazol SB 203580

Dieses Strukturmerkmal verfolgt die Verbindung VK 19911 (Abbildung 1.14), ein N¹-Piperidin-4-yl-Derivat. Sie hemmt die p38 α mit einem IC₅₀ von 60 nM und ist in seiner Potenz mit SB 203580 vergleichbar. Zurückführen lässt sich die hohe Hemmwirkung auf eine zusätzliche Salzbrücke des Piperidin-Stickstoffs zu Asp¹⁶⁸.^[50] Einen weiteren interessanten "Teardrop Binder" stellt die Verbindung AMG 548 dar, die den zyklischen Carbonylverbindungen zuzurechnen ist. Der Sauerstoff fungiert hierbei als Akzeptor für die vom Lys⁵³ ausgehende Wasserstoffbrücke, die eine zusätzliche Stabilisierung des Inhibitors in der ATP-Bindungstasche bewirkt. AMG 548 zeigt gute Wirksamkeit in verschiedenen Vollblutessays und ist ein selektiver p38 α Hemmstoff.^[41]

Der lineare Bindemodus hat im Gegensatz zum Modus der “Teardrop Binder“ nur drei Interaktionspunkte. Dennoch erreichen Verbindungen dieser Klasse einstellige nanomolare Aktivitäten gegenüber der p38 α MAP Kinase. Einige Beispielverbindungen zeigt die Abbildung 1.16.

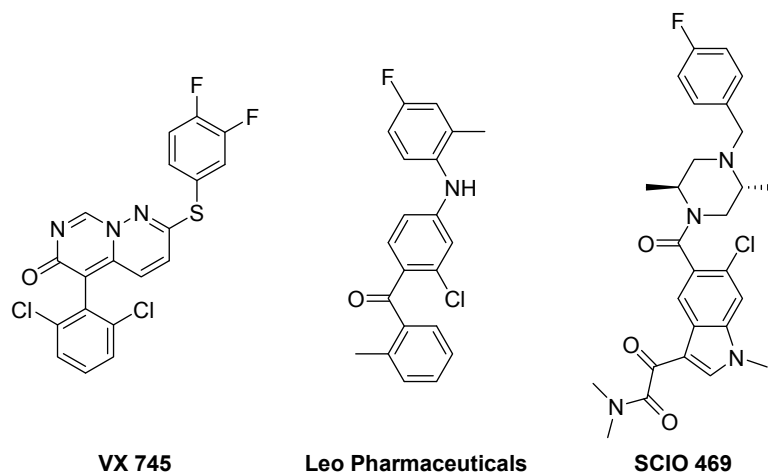


Abbildung 1.16 Beispielverbindungen für “Linear Binders“

Die Tatsache, dass der “Gatekeeper“-Rest der p38 α kleiner ist als bei den meisten anderen Kinasen, schafft nicht nur eine größere “Gatekeeper“-Tasche, sondern erlaubt auch Hemmstoffe gegen die p38 α MAP Kinase zu entwickeln, bei denen alle Template, die für die Wechselwirkungen verantwortlich sind, direkt miteinander verbunden werden. Anstelle des disubstituierten Heterozyklus, der die Reste für die Wechselwirkungen mit dem Enzym bei den “Teardrop Binders“ positioniert, sind hier die Ringsysteme nur über ein Atom miteinander verknüpft, wie z.B. ein Schwefelatom, ein Sulfonamid oder eine direkte C-C-Brücke. Die verbleibenden Interaktionspunkte sind die Wasserstoffbrückenbindung zur Gelenkregion, die Wechselwirkung mit der Hydrophoben Region I und die Besetzung der Hydrophoben Region II (siehe Abbildung 1.17).

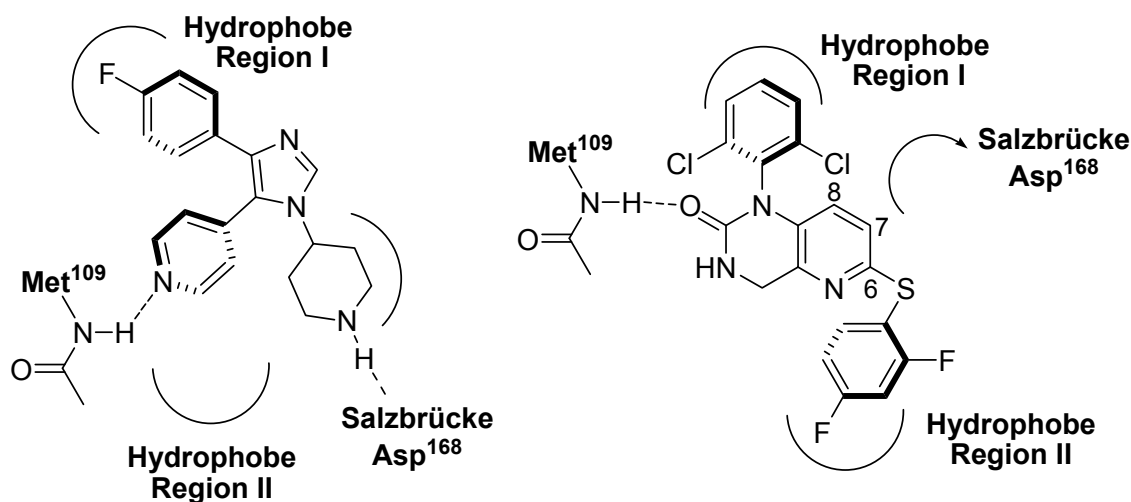


Abbildung 1.17 Vergleich der Besetzung der ATP-Bindungsstelle durch einen "Teardrop Binder" (VK 19911) und einen "Linear Binder", modifiziert nach Natarajan et al.^[51]

Die erste Verbindung mit diesem Bindemodus war VX 745 ($IC_{50} = 10 \text{ nM}$), die Vertex zusammen mit analogen Verbindungen im Jahr 1997 für die Anwendung als p38 MAP Kinase-Hemmstoffe patentieren ließ (Abbildung 1.17).^[51] VX 745 gelangte im Juli 2001 in Phase II der klinischen Zulassung. Dennoch musste die Studie nach kurzer Zeit wegen neurotoxischer Nebenwirkungen in Tierversuchen abgebrochen werden. Weiterhin berichteten Natarjan et al.^[51] über die Entwicklung von Inhibitoren, die Analoga von VX 745 darstellen.

Mit dem Grundgerüst der Benzophenone entwickelte LEO Pharmaceuticals eine neue Strukturklasse von MAP Kinase-Inhibitoren. Als wichtigstes Interaktionsprinzip gilt eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Keton-Sauerstoff und dem Met¹⁰⁹-Amid-NH. Der Phenyl-Rest reicht in die "Gatekeeper"-Tasche und der über das Stickstoffatom angeknüpfte Ring bildet Wechselwirkungen zu Thr³⁵ aus.^[52] Die schematische Darstellung der Wechselwirkungen des Enzyms mit einer Verbindung von LEO Pharmaceuticals im Vergleich mit dem Pyridinylimidazol SB 203580 ist in Abbildung 1.18 dargestellt.

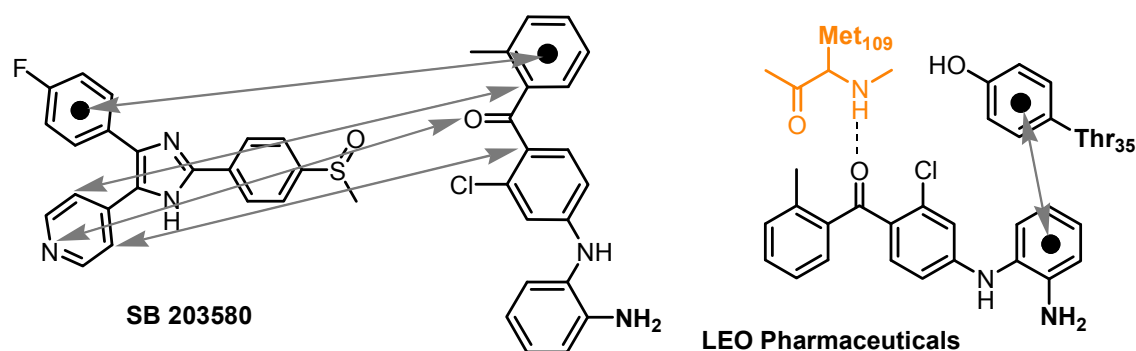


Abbildung 1.18 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen des Enzyms einer Verbindung von Leo Pharmaceuticals im Vergleich mit dem Pyridinylimidazol SB 203580; modifiziert nach Ottoson et al.^[52]

SCIO 469 (Abbildung 1.16) zählt wie die oben beschriebenen Benzophenone zu den “Linear Binder“. Die Verbindung trägt am C³ als Substituent ein Oxalsäureamid, als zentraler Baustein fungiert nichtracemisches *trans*-2,5-Dimethylpiperazin. Das Sauerstoffatom des Amids bildet die Wasserstoffbrücke zum Amid-NH des Met¹⁰⁹, der Phenylring füllt die “Gatekeeper“-Tasche aus. Der Hemmstoff befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Studien und soll als Schmerzmittel für die Behandlung von Multiple Myelom und der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden.

Für die Gruppe der “Extended Binder“ sind in Abbildung 1.19 einige Strukturbeispiele gegeben. Anhand einiger Kinasestrukturen ohne Ligand konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungsschleife eine Konformation einnehmen kann, in der das DFG-Motiv der zur Adenin-bindenden Region gerichtet ist und als sogenannte DFG-out Konformation bezeichnet wird.

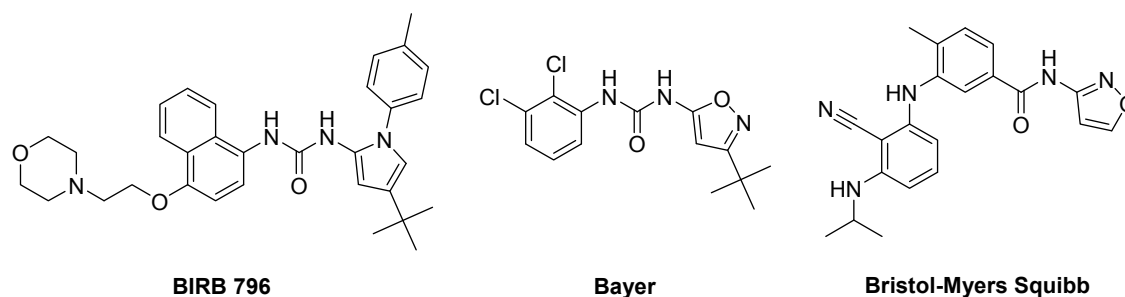


Abbildung 1.19 Strukturbeispiel für “Extended Binder“

Die p38 α MAP Kinase liegt zunächst in der DFG-in Konformation vor, bei der die Aminosäure Phe¹⁶⁹ verborgen bleibt und nicht in Kontakt mit der Adenin-bindenden Region steht, wenn die Kinase in Komplex mit den oben beschriebenen "Teardrop Binders" bzw. "Linear Binders" steht oder ohne Ligand ist. Doch existiert bei p38 α nur eine geringe Energiebarriere für diese Art der konformellen Änderung. Deren Ausbildung wurde zuerst bei BIRB 796 in Komplex mit der Kinase entdeckt. Der prominente Vertreter dieser Substanzklasse weist eine Hemmwirkung im unteren nanomolaren Bereich gegenüber p38 α auf und ist selektiv gegenüber JNK2. Bis zur Einstellung in Phase II der klinischen Studien wurde die Verbindung für die Anwendung bei Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und Psoriasis getestet.^[46] Die neuartige Substanz besetzt die DFG-out Tasche sowie die Hydrophobe Region I, wodurch sie zur Klasse der allosterischen Inhibitoren zählt (Abbildung 1.20).

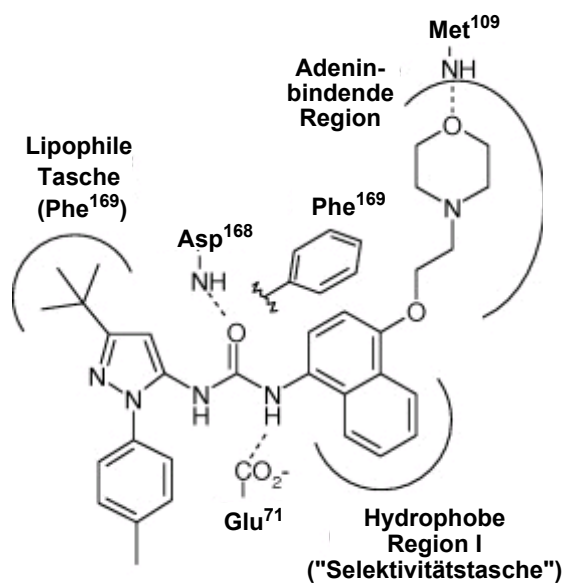


Abbildung 1.20 Schematische Darstellung der Wechselwirkungspunkte von BIRB 796 mit der p38 MAP Kinase, modifiziert nach Goldberg et al.^[53]

Ein wichtiges Charakteristikum der Bindung an das Enzym ist, wie in der schematischen Darstellung des Bindemodus in Abbildung 1.20 gezeigt, die Gegenwart eines Amids oder Harnstoffes, deren Carbonyl eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asp¹⁶⁸ und deren NH eine ebensolche zum Carboxylat von Glu⁷¹ bilden. Dies trägt zur Stabilisierung der DFG-out Konformation bei. Zum Amid-NH des Met¹⁰⁹ bildet BIRB 796

eine Wasserstoffbrücke über den Morpholin-Sauerstoff aus und der Carbozyklus liegt in der "Gatekeeper"-Tasche. Die Aminosäure Phe¹⁶⁹, die vor dieser Konformationsänderung eine hydrophobe Tasche in unmittelbarer Umgebung der ATP-Bindungstasche besetzt, gibt diese nun für die lipophile *tert*-Butyl-Seitenkette von BIRB 796 frei. Eine räumliche Überlappung des Phenylalaninrestes im DFG-Motiv mit den Phosphatgruppen des ATPs verhindert dadurch dessen Bindung an das Enzym. Der viel diskutierte Bindemodus unterscheidet sich damit explizit von den bisher genannten Inhibitoren und ist in Abbildung 1.21 verdeutlicht.

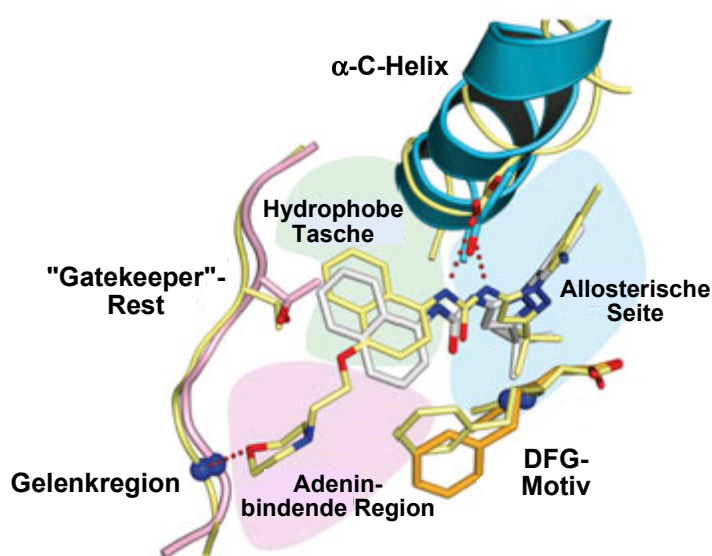


Abbildung 1.21 Interaktionen von BIRB 769 und einer analogen Verbindung ohne Morpholinrest mit p38α; modifiziert nach Simard *et al.*^[54] BIRB 796 in Gelb, Wasserstoffbrückenbindungen rot gepunktet (PDB Code 1KV2).

Goldberg *et al.*^[53] beschreiben ausgehend von BIRB 796 die Optimierung von Inhibitoren dieser Klasse. Verbindungen, die nach dem gleichen Bindemodus mit der p38 MAP Kinase interagieren, wurden von Bayer und Bristol-Myers Squibb entwickelt (siehe Abbildung 1.19).

Neben der ATP-Bindungsstelle und der allosterischen Modulation gibt es weitere Möglichkeiten, die Aktivität von Proteinkinasen zu hemmen. Bei Enzymklassen wie Proteasen hat der Einsatz von Substrat-kompetitiven Hemmstoffen erfolgreich Anwendung gefunden. Einer der wenigen Inhibitoren dieser Klasse ist der Naturstoff Erbstatin und dessen Analoge, die nach Levitski *et al.*^[55] eine Selektivität gegenüber der IGF-1 Rezep-

tor-Kinase zeigen. Ein weiterer Typus eines Hemmstoffes ist der irreversible Inhibitor. Jedoch macht die pharmazeutische Industrie wenig Gebrauch von diesem Hemmprinzip, da eine unspezifische, irreversible Bindung an ein weiteres Enzym neben der eigentlichen Zielstruktur zu bedenklicher Toxizität führen kann. Eine Klasse von irreversiblen Inhibitoren stellen die 6-Acrylamido-4-anilinaquinazoline dar, die die EGFR Tyrosin-Kinase blockieren.^[56]

Die letztgenannten Möglichkeiten zur Hemmung konnten noch nicht erfolgreich auf die p38 MAP Kinase angewendet werden und obwohl schon eine große Anzahl an Inhibitoren für dieses Enzym existiert^[57], bleibt es auf Grund der beachtlichen Bedeutung eine geeignete Zielstruktur für die Entwicklung neuartiger Verbindungen. Mit Hilfe einiger im Folgenden vorgestellten Methoden des Struktur- bzw. Liganden-basierten Wirkstoffdesigns wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, neue Leitstrukturen der p38 MAP Kinase zu finden.

1.3 Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Leitstrukturen in der Wirkstoffforschung

1.3.1 Methoden des Wirkstoffdesigns

Heute sind viele Strategien zur Entwicklung neuer Leitstrukturen bekannt.^[58] Sie reichen von wissensbasierten Annäherungen, die sich aus der Literatur und Patenten abgeleiteten Datensätzen bedienen, über das Liganden-basierte Design bis zum Zusammenspiel von HTS (high-throughput screening) und der Kombinatorischen Chemie. Einen Überblick gibt die Abbildung 1.22. Die schon vorhandene große Anzahl von Arzneimitteln darf nicht darüber hinwegtäuschen, dass es weiterhin therapeutische Lücken gibt und viele Erkrankungen nicht kausal therapiert werden können.

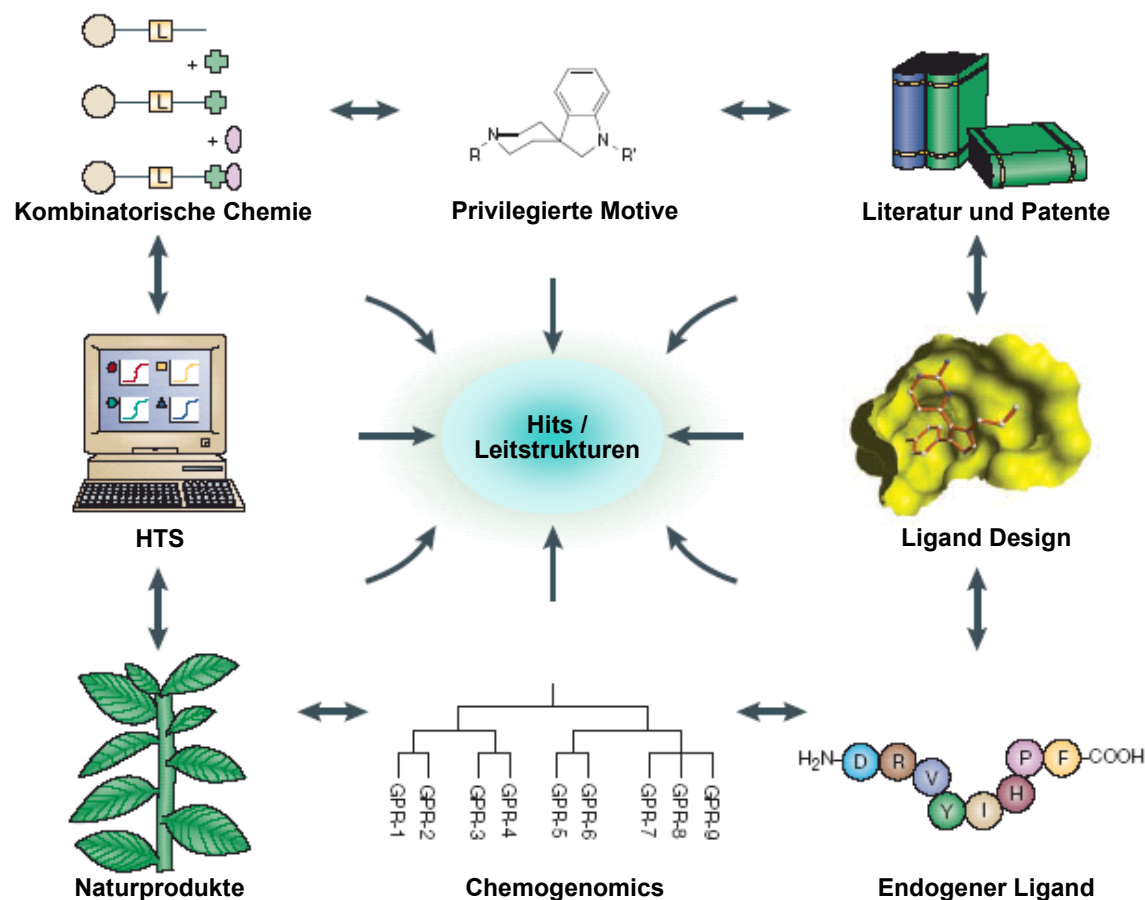


Abbildung 1.22 Überblick über die zahlreichen Strategien zur Entdeckung neuer Leitstrukturen.^[39]

Früher war gewöhnlich zuerst der Wirkstoff bekannt, über dessen Wirkung im Organismus die Targetstruktur entdeckt wurde und gänzlich neue Arzneistoffe waren häufig Zufallstreffer.

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign ist eine junge Disziplin, die auf Methoden und Technologien beruht, die seit den 80er-Jahren des 19. Jahrhunderts zur Verfügung stehen. Mit diesem Verfahren verfügen Medizinische Chemiker über ein Werkzeug, um Hypothesen zur Struktur und zum molekularen Wirkungsmechanismus eines neuen Arzneistoffs entwickeln zu können. Diese Hypothesen sind eine Grundvoraussetzung für die rationale Wirkstoffentwicklung, die zumindest potenziell zu optimalen Arzneistoffen führen kann. Über die letzten 20 Jahre hinweg hat sich die Wirkstofffindung zum modernen Drug Design auf molekulare Ebene verlagert. Dieser Paradigmenwechsel in der Arzneistoffentwicklung beruht zum einen auf der Molekularmedizin, die mit der Untersuchung der Signalübertragungswege, die in Zusammenhang mit Krankheiten

stehen, neue Wege zum Auffinden und Optimieren neuer Medikamente eröffnet, zum anderen auf den Ergebnissen der Genomforschung. Die Genomprojekte und die daraus folgenden Forschungsprojekte haben eine umfassende Kenntnis von Mechanismen biologischer Prinzipien auf der Basis von dreidimensionalen Strukturen bereitgestellt. Unter den strukturell charakterisierten Proteinen befindet sich eine zunehmende Zahl neuer potenzieller Zielstrukturen (Targets). Nachdem solche biologischen Targets gefunden wurden, beginnt in der Regel die Suche nach sogenannten Leitstrukturen, die eine spezifische Interaktion mit dem Target zeigen und deshalb zur kausalen Therapie genutzt werden können. Während die Wirksubstanzen früher direkt im Tierversuch oder an isolierten Organen getestet wurden, finden seit den 80er-Jahren zunehmend die Prüfungen direkt an den isolierten Zielstrukturen statt. In den 90er-Jahren hat man den Durchsatz dieser Verfahren durch die Automatisierung in Laboren drastisch gesteigert und das Hochdurchsatzscreening etabliert.

1.3.2 Biomolekulares Screening

Die biologische Evaluierung von großen Molekülsammlungen war bis zur Etablierung der Technik des High-throughput screening (HTS) der Engpass bei der Suche nach neuen Wirkstoffen. Durch die molekularen Testmodelle mit Enzymen, Rezeptoren, Bakterien, Zellen bzw. Zellbestandteilen zusammen mit der Automatisierung ist die biologische Prüfung Tausender von Testsubstanzen pro Tag möglich. Die Entwicklung effizienter Essays ist demnach maßgeblich an der Durchführbarkeit eines HTS beteiligt. Als Beispiel ist der Prozess für die Enzymfamilien der Kinasen im Detail von Ahsen und Bömer beschrieben.^[60] Um die Vielfalt an Strukturen zu erhöhen, bediente man sich der Kombinatorischen Chemie. Ursprünglich wurde das Prinzip der Kombinatorischen Synthese ausschließlich zum Aufbau von Biopolymeren wie Proteine, DNA, RNA oder Zuckern angewendet. Mittlerweile wird es auch zur Synthese von Substanzbibliotheken kleiner, pharmazeutisch interessanter Moleküle eingesetzt.^[61] Die Vielzahl der Verbindungen unterscheidet sich in der Art und Anordnung der Bausteine. Die Methode liefert einen großen Fundus an Testsubstanzen, und diese breite Basis soll die Qualität der späteren Entwicklungskandidaten erhöhen. Dennoch können nur wenige in einem High-throughput screening identifizierte Hits als neue Leitstruktur klassifiziert werden.

Gründe hierfür sind, dass in der Regel bei einer einzigen Testkonzentration mit Hilfe eines einzigen Essays getestet wird, womit in der Folge quantitative Aussagen über die Wirkstärke (Potenz) und Selektivität der Testsubstanzen nicht möglich sind. Ferner werden viele für die Wirksamkeit und die therapeutische Sicherheit einer Substanz notwendigen pharmakologischen Parameter, wie die Zellmembranpermeabilität sowie die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung, Ausscheidung (ADME) und Toxikologie, nicht oder nur unzureichend einbezogen. Bei modernen, molekularen Testsubstanzbibliotheken soll dies stärker berücksichtigt werden, um bei einem Screening möglichst Moleküle mit günstigen Eigenschaften für die Optimierung zu finden. Die aus den Screenings gewonnenen Daten werden mit Hilfe von chemoinformatischen Methoden analysiert und die erhaltenen Hits anhand ihrer molekularen Eigenschaften gefiltert. Substanzen, die beispielsweise auf Grund reaktiver Gruppen (z.B. Nitrogruppen) als ungeeignet für die Weiterentwicklung anzusehen sind, können auf diese Weise von der Hitliste gestrichen werden. Als ein weiterer Anhaltspunkt wird Lipinskis "Rule of Five" herangezogen.^[62] Die tatsächlichen Erfolge bei Hochdurchsatzscreenings und der Nutzen der kombinatorischen Chemie in der Forschung sind nur schwer direkt nachprüfbar. Erfolgsberichte über marktreife Entwicklungssubstanzen aus Laboratorien der Pharmaindustrie sind selten. Durch kombinatorische Synthesen und das Screening kombinatorischer Bibliotheken werden aber ständig neue aktive Verbindungen, wie z.B. Kinase-Inhibitoren gefunden und publiziert.^[63] Die Optimierung eines Hits bis zu einem Arzneistoff und dessen Markteinführung dauert etwa 10 bis 15 Jahre. Die Kosten für eine solche Entwicklung sind sehr hoch und häufig scheitern vielversprechende Kandidaten in sehr späten Phasen des Zulassungsprozesses. Einen Überblick gibt die Abbildung 1.23. Die enorme Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Computer ließ die Frage aufkommen, inwieweit die Arzneistoffentwicklung auf die virtuelle Ebene verlagert werden kann, um die Arzneistofffindung effektiver zu gestalten und die enormen Kosten zu reduzieren.

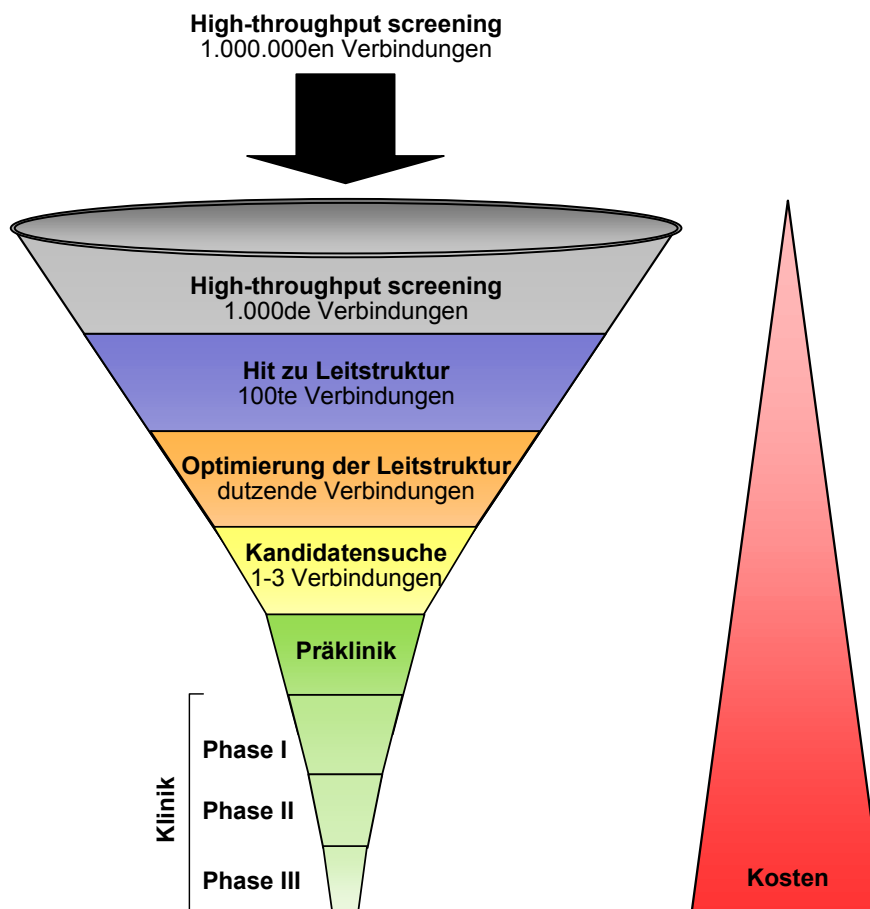


Abbildung 1.23 Verfahren der Arzneistoffentwicklung mittels HTS^[64]

1.3.3 Virtuelles Screening

Manchen Forschern gilt die struktur- und computergesteuerte Auswahl von Stoffen aus virtuellen Substanzbibliotheken als Königsweg der Arzneistofffindung. Häufig wird virtuelles Screening im Zusammenhang mit Chemoinformatik diskutiert.^[65] Der eigentliche Ursprung liegt im Proteinstruktur-basierten Substanz-Screening oder Docking.^[66] Mittlerweile wurden sehr unterschiedliche Methoden und Werkzeuge für die digitale Suche nach neuen Wirkstoffen entwickelt und es besteht eine Vielzahl an verfügbaren Docking-Algorithmen (Abbildung 1.24).

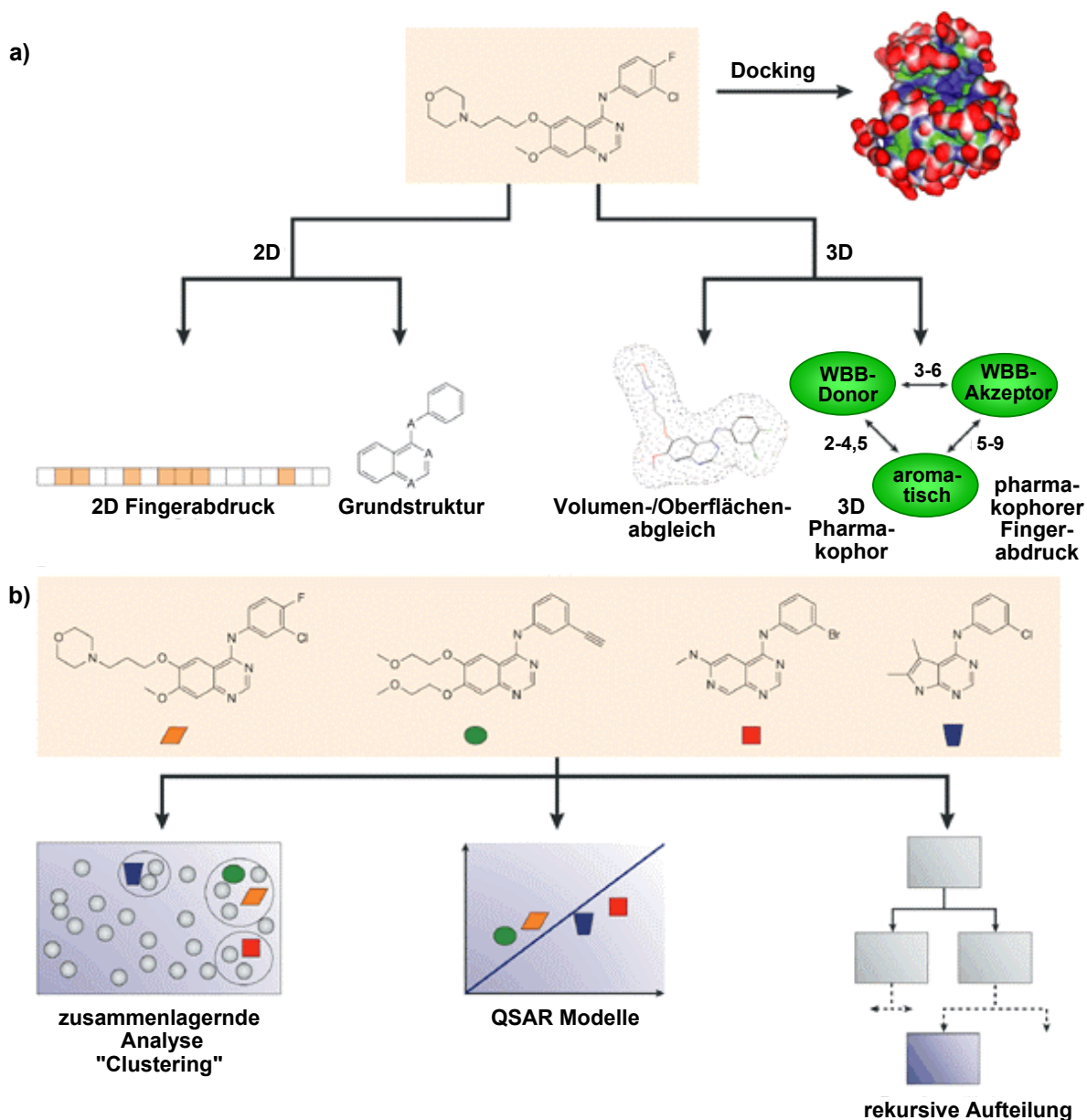


Abbildung 1.24 Übersicht über verschiedene Methoden und Werkzeuge für das virtuelle Screening; a) Ein bekannter Proteinkinase Hemmstoff ist als molekulare Vorlage gezeigt. Für einzelne Vorlagen ist die Ähnlichkeitssuche der bevorzugte Ansatz und gängige Werkzeuge sind z.B. 2D und 3D Strukturabfragen, Pharmacophormodelle, 2D und 3D Fingerabdrücke, Volumen-/Oberflächenabgleich oder komplexe, molekulare Beschreibungen; b) Methoden, die generell mehrere Moleküle als Vorgaben benötigen, einschließlich 2D oder 3D QSAR- (Quantitative Structure-Activity- Relationship) Modelle und verschiedene zusammenlagernde und aufteilende Methoden, modifiziert nach Bajorath.^[67]

Auf zwei unterschiedliche Ansatzmöglichkeiten und einige Methoden soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.3.3.1 Direktes Drug Design

Grundlage solcher Projekte zum rationalen Entwurf von Wirkstoffen ist die exakte Kenntnis von den makromolekularen Rezeptorproteinen, z.B. durch Kristallstrukturanalysen. Im Idealfall liegen auch Daten vom entsprechenden Target vor, das mit einem Hemmstoff in Wechselwirkung steht. Hierzu werden Methoden verwendet und entwickelt, die die Interaktion zwischen einem Liganden und seinem Zielmolekül beschreiben. Im Zuge der Fortentwicklung der Proteinkristallographie und der NMR-Technologie wurde die 3D-Struktur vieler Moleküle oder Ligandenkomplexe aufgeklärt, als Grundlage zur Weiter- und Neuentwicklung von Wirkstoffen. Inzwischen lässt sich die 3D-Struktur von Proteinen mit Hilfe entsprechender Computerprogramme mit zunehmender Genauigkeit vorhersagen. Im Laufe der vergangenen 20 Jahre haben die Kenntnisse über dreidimensionale Proteinstrukturen und die Wirkstoff-Protein-Interaktionen exponentiell zugenommen und wachsen weiterhin mit großer Geschwindigkeit.

Basis des direkten Drug Design ist also die bekannte Struktur des biologisch relevanten Zielmoleküls. Von dessen räumlicher Struktur und der Elektronendichteverteilung der Bindungsstelle ausgehend wird am Computer ein möglichst passgenauer Wirkstoff entworfen und gegebenenfalls später optimiert. Der Aufbau eines Moleküls beginnt meist mit einer Basisstruktur, beispielsweise einem Ringsystem, an das verschiedene Strukturen angefügt werden und so freie Bindungstaschen oder Interaktionspunkte des Targets belegt werden können. Unter Berücksichtigung der vorhandenen Aminosäuren, die für bindende Kontakte infrage kommen, und des Volumens sowie der Beschaffenheit von vorhandenen Enzymtaschen können somit viele Leitstrukturen produziert werden. Allerdings erfüllen diese nach Synthese und biologischer Testung nicht unbedingt die Erwartungen an einen Arzneistoff. Stellt sich eine Leitstruktur aber als vielversprechender Ligand heraus, kann dieser *in silico* weiterentwickelt werden. Dabei wird besonders auf die Optimierung von Eigenschaften Augenmerk gelegt, die für Arzneistoffe essenziell sind, zum Beispiel ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Wasser-

löslichkeit und ausreichender Lipophilie. Um mögliche toxische Eigenschaften der Molekülstrukturen früh in der Entwicklungsphase abschätzen zu können, gibt es bereits Modelle wichtiger Cytochrom P450 Proteine (CYP), mit deren Hilfe man vorab zu klären versucht, ob eine neue Struktur als Ligand für ein bestimmtes CYP-Isoenzym in Frage kommt und damit ein bestimmtes Metabolisierungsmuster besitzt. Die Auswertung von Datenbanken mit Informationen zur Toxizität bekannter Substanzen oder spezieller Partialstrukturen erlaubt ebenso hypothetische Aussagen zum toxischen Potenzial neuer Strukturen. Dennoch bleibt eine experimentelle Bestätigung unerlässlich.

1.3.3.2 Indirektes Drug Design

Liegen noch keine ausführlichen Informationen zur dreidimensionalen räumlichen Struktur eines Targets vor, beginnt die Suche nach neuen Wirkstoffen in der Regel mit der Sichtung der schon bekannten Strukturen. Von diesen werden nur Substanzen betrachtet, von denen aus pharmakologischen Experimenten bekannt ist, dass sie an ein und derselben Zielstruktur mit identischem Wirkungsmechanismus angreifen. In dieser Serie von Wirkstrukturen wird der Pharmakophor bestimmt. Der Begriff Pharmakophor wurde 1909 von Paul Ehrlich für das molekulare Muster geprägt, das die biologische Aktivität einer Droge (pharmacoon) trägt (phoros).^[68] Heute wird dieser Begriff auf die dreidimensionale Architektur der funktionellen Gruppen innerhalb einer Leitstruktur ausgedehnt, die für die spezifische Wirkung verantwortlich ist. Um den Pharmakophor bestimmen zu können, müssen alle Moleküle in vergleichbaren, energetisch günstigen Konformationen überlagert werden. Möglich ist das heute am Computer mit Hilfe entsprechender Molecular-Modelling-Software. Als Nächstes wird auf der Grundlage der ersten Überlagerung berechnet, mit welchen funktionellen chemischen Gruppen die Moleküle besonders günstige Wechselwirkungen eingehen können. Hierzu stehen spezielle Programme, wie z.B. das Grid-Programm^[69] zur Verfügung, welches auf der Auswertung von strukturell aufgeklärten Kristallstrukturen von Ligand-Rezeptor-Komplexen basiert. Mit solchen Algorithmen können Wechselwirkungsfelder berechnet werden, die sowohl Aussagen zur potentiellen Struktur der Rezeptorbindungsstelle ermöglichen als auch, in Kombination mit bekannten experimentell bestimmten Affinitäten, die Anwendung von statistischen Verfahren zur Optimierung einer Strukturklasse

erlaubt. Mit Kraftfeldparametern, die die Stärke der Wechselwirkungen beschreiben, können nun diejenigen Bereiche in der Umgebung des Moleküls identifiziert werden, wo die höchsten Wechselwirkungsenergien mit einer bestimmten funktionellen Gruppe berechnet werden. Wenn alle Moleküle einer Serie in einem Raumsegment vergleichbare Wechselwirkungsfelder aufweisen, können diese Felder als pharmakophore Elemente angesehen werden. Letztendlich ist die Kenntnis eines Pharmakophors die Voraussetzung für die Suche nach völlig neuen Wirkstoffen aus Moleküldatenbanken, deren Wirksamkeit durch virtuelles Screening *in silico* vorausberechnet werden kann. Eine Reihe von zwischengeschalteten sogenannten Filtern soll verhindern, dass hierbei Moleküle aus Datenbanken ausgewählt werden, die sich aus praktischen Gründen gar nicht als Wirkstoffe eignen. Dabei können die oben genannten Kriterien für die Erreichung des Optimierungsziels beim direkten Drug Design zur Anwendung kommen und die bereits aufgeführte "Rule of five"^[62]. Sind die Bedingungen erfüllt, wird ein solches Molekül als "drug-like" bezeichnet und für das Screening akzeptiert.

1.3.3.3 Virtuelle Rezeptormodelle

Darüber hinaus können ebenfalls von noch nicht aufgeklärten Zielproteinen entsprechende Rezeptormodelle entwickelt werden, die für die Suche nach neuen Leitstrukturen dienen können. Da die Interaktionsfelder im dreidimensionalen Raum in der Umgebung der Substanzen liegen und daher die räumlichen Eigenschaften der Moleküle widerspiegeln, bezeichnet man die Methode als 3D-QSAR-(quantitative structure-activity relationship)-Verfahren.^[70] Eine wichtige Einschränkung dieser Herangehensweise ist, dass der Pharmakophor nur Strukturelemente beschreiben kann, die in den für seine Ableitung benutzten Molekülen bereits vorhanden sind. Somit können für völlig neue Substanzen, die keine Derivate der Ausgangsstrukturen mehr sind, keine Voraussetzungen gemacht werden. Daher ist es notwendig, auf der Grundlage der Aminosäuresequenz des Targets, die durch die Genomprojekte zugänglich wurde, ein neues Modell zu entwickeln, um die Grenzen des 3D-QSAR-Verfahrens überschreiten zu können. Die Methoden, die direkt aus der Primärstruktur eines Proteins die dreidimensionale räumliche Struktur berechnen, stehen noch am Anfang ihrer Entwicklung und sind nicht standardmäßig nutzbar. Für die Erstellung entsprechender Modelle werden Homologie-

Verfahren angewendet, bei denen Kristallstrukturen von funktionell verwandten Proteinen als Matrix für die Modellierung des unbekanntes Proteins eingesetzt werden. Aufgeklärte Proteinstrukturen sind in großer Anzahl in der Brookhaven Protein Data Bank (PDB-Databank) hinterlegt. Für die Suche nach neuen Leitstrukturen ist die genaue Kenntnis der Gestalt der Bindungstasche von größter Bedeutung. Eine Überprüfung der Verlässlichkeit des entwickelten Modells erfolgt zunächst durch einen Vergleich mit der 3D-QSAR-Überlagerung und des daraus abgeleiteten Pharmakophors. Dazu werden verschiedene bekannte Hemmstoffe virtuell in die Bindungstasche gelegt. Eine Optimierung der Bindungsgeometrie in der Bindungstasche mit Hilfe einer Moleküldynamiksimulation ergibt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus der 3D-QSAR-Analyse. Die gefundenen Interaktionspunkte zu den Aminosäuren der Bindungsstelle entsprechen den bereits zuvor vermuteten Wechselwirkungen des Pharmakophors. Ein solches Ergebnis bestätigt den Realitätsgehalt eines erstellten Modells, das dann für eine Suche nach anderen Liganden im Rahmen eines virtuellen Screenings verwendet werden kann.

1.3.3.4 Abstraktion von Molekülstrukturen

Häufig ist es nicht möglich, die großen zur Verfügung stehenden Moleküldatenbanken durch einen direkten Vergleich der einzelnen Strukturen mit dem Pharmakophor zu analysieren. Daher werden Verfahren eingesetzt, die der dreidimensionalen Struktur keine Bedeutung mehr beimessen, sondern vielmehr kommen aufbereitete Darstellungen des Pharmakophors für die Suche zum Einsatz. Eine Möglichkeit dafür bietet das FTREES-Verfahren.^[71] Die einzelnen funktionellen Teilstrukturen werden in "Features" übersetzt. Daraus wird ein "Feature tree" zusammengesetzt, der dann als Suchanfrage für den Vergleich mit allen entsprechend behandelten Molekülstrukturen in der jeweiligen Datenbank dient. Passende Strukturen werden aus der Datenbank herausgesucht und anschließend in das Rezeptormodell automatisch eingedockt. Die Affinität des Moleküls zur Zielstruktur kann berechnet und neue Leitstrukturen gefunden werden.

Mit der Durchführung eines virtuellen Screening wird erreicht, dass nur potenziell wirksame Moleküle synthetisiert werden, was ein wesentlicher Grund für den Einsatz theoretischer Verfahren ist, da so die Kosten für die Entwicklung eines neuen Arzneimittels

gesenkt werden sollen. Die Synthese und anschließende Testung einer Auswahl der durch virtuelles Screening ermittelten Moleküle ist jedoch unerlässlich. Auch bleibt das Risiko bestehen, dass auf Grund von Interaktionen mit anderen Enzymen oder Arzneistoffen toxische Nebenwirkungen auftreten. Die theoretischen Verfahren sind somit wie die experimentellen eine Hilfe bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Angesichts der gleichen Aufgabestellung und Ziele erscheinen Ansätze sinnvoll, die beiden Methoden sowie alle angewendeten Werkzeuge, zu verflechten und sie sollten als vielversprechend für die Zukunft angesehen werden, um den langwierigen Prozess der Arzneistoffentwicklung zu verkürzen.^[67]

Das moderne Drug Design stellt somit ein multidisziplinäres Arbeitsgebiet dar, dem auf der Suche nach neuen Wirkstoffen die Technologien der kombinatorischen Chemie, der Gentechnik, der Pharmakologie und der Computertechnik zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit fanden viele der vorgestellten Methoden ihre Anwendung. Ein virtuelles Screening, bei dem ein innovatives Verfahren zur Abstraktion von Molekülen eingesetzt wurde, diente zur Identifizierung von neuen potentiellen p38 MAP Kinase-Hemmstoffen. Die Kombinatorische Chemie wurde genutzt, um die gewählte Leitstruktur in geeigneter Weise zu modifizieren. Unter Einbeziehung des Liganden-basierten Desigs wurde versucht, eine weitere neue Hemmstoffklasse für das Target zu entwickeln. Ein biologisches Testsystem wurde genutzt, um die inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen aufzeigen zu können und Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten. Docking Algorithmen dienten zur Ermittlung von wahrscheinlichen Binde-modi der verschiedenen Substanzklassen. Auf die verschiedenen Punkte soll im Weiteren näher eingegangen werden.

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe des Struktur- bzw. Liganden-basierten Wirkstoffdesigns neue Leitstrukturen der p38 α MAP Kinase identifiziert werden. Durch Struktur-basiertes Design erzielte die Firma Cresset mittels FieldScreen-Technologie im Rahmen des Macrocept-Projektes verschiedene Treffer, sogenannte "Hits", die als Ausgangspunkt für die Entwicklung potentieller Hemmstoffe durch medizinisch-chemische Methoden dienen sollten. Die Aufgabe bestand darin, für die gewählte Struktur (**p7**), die in Abbildung 2.1 dargestellt ist, synthetische Zugänge zu erarbeiten, welche eine möglichst variable Substitution der Reste R₁ und R₂ erlauben. Als Ziel wurde verfolgt, durch eine geeignete Wahl der Substituenten eine gezielte Modifikation der Leitstruktur der 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole zu erhalten, um Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten zu können. Über die Optimierung der Ausgangsverbindung wurde versucht, Kandidaten mit besseren Hemmeigenschaften gegenüber der p38 α MAP Kinase zu finden und den Bindemodus der Substanzklasse zu untersuchen.

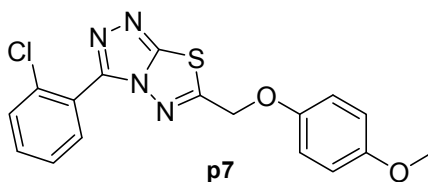


Abbildung 2.1 Ausgangsverbindung (**p7**) zur Entwicklung neuer Hemmstoffe für die p38 α MAP Kinase im Rahmen des Macrocept-Projektes

3 Ausgangspunkt

3.1 Das Macrocept Projekt

Dieses Projekt wurde als Teil des Framework-Programms 6 von der Europäischen Union finanziert. Konzipiert wurde es für kleine bis mittelständige Firmen sowie Universitäten oder außeruniversitäre Forschungseinrichtungen und sollte die Möglichkeit eröffnen, sehr kosten- und zeitintensive Grundlagenforschung zu betreiben. Beteiligt waren Cresset BioMolecular Discovery Ltd (Letchworth, UK), Epi-Stem Ltd (Manchester, UK), Synovo GmbH (Tübingen), Università Degli Studi Di Perugia (Perugia, I), Institute of Molecular Genetics (Prag, CZ), William Harvey Research Institute (London, UK) und die Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Durch die Kooperation konnten alle Bereiche der Pharmaforschung vom Design, der Synthese, der biologischen Testung, der Pharmakologie und Toxikologie *in vitro* sowie *in vivo* bis zum Entwicklungskandidaten abgedeckt werden (Abbildung 3.1).

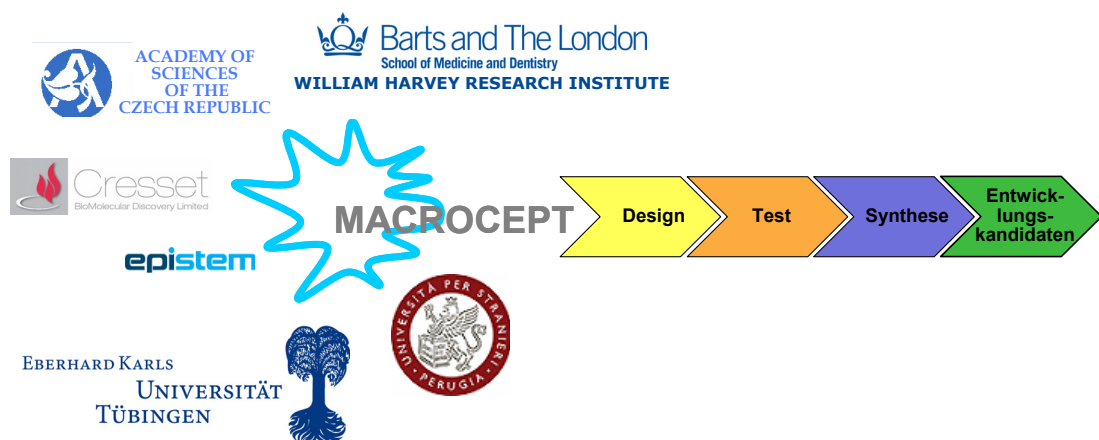


Abbildung 3.1 Beteiligte Institutionen und Zielsetzungen des Macrocept Projektes

Eine der Aufgaben der Projektteilnehmer bestand in der Entdeckung und Optimierung neuer Leitstrukturen für die p38 MAP Kinase. Schon bekannte p38 MAP Kinase-Hemmstoffe sind eine weit verbreitete Wahl als Datensatz für die retrospektive Validierung von vielen virtuellen Screening Methoden.^[5,33,72-74] Außerdem wurden Moleküldynamiksimulationen^[52] und Docking^[75] genutzt, um die Bindemodi für die bekannten Inhibitoren zu erklären. Dennoch gibt es kaum Beispiele für den Gebrauch von *in silico* Methoden für das *prospective* Screening von p38 MAP Kinase-Hemmstoffen. Dieser Ansatz diente als Ausgangspunkt für einen Teil dieser Arbeit.

3.2 Die FieldScreen Suche

In der Anfangsphase wurde von der Firma Cresset ein auf Liganden basierendes virtuelles Screening, die sogenannte FieldScreen Methode, auf 1.2 Millionen marktübliche Substanzen angewendet. Der gesamte involvierte Prozess bei der Durchführung einer FieldScreen Suche ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Der erste Schritt (A) erfordert die Identifizierung eines bekannten, aktiven Liganden und dessen Übertragung in eine entsprechende dreidimensionale Konformation. Idealerweise stammen die dafür benötigten Informationen aus Röntgenstrukturanalysen. Die FieldScreen-Suchanfrage wird durch die Zuordnung eines sogenannten "field point pattern" (FPP) zum Liganden erstellt (B). Das neu generierte Oberflächenmotiv wird als Anfrage in der FieldScreen-Datenbank mit allen darin enthaltenen Oberflächenmotiven verglichen (C). Aus der Suche resultieren verschiedene Moleküle, die die beste Bewertung beim Abgleich mit allen Molekülkonformationen erhalten haben und als dreidimensionale Überlagerungen oder als zweidimensionale Strukturen aufgezeigt werden (D). Außerdem wird die Ähnlichkeit der Moleküle zu der ursprünglichen Suchanfrage angegeben.

Da die Annahme gilt, dass nicht die dreidimensionale Anordnung der Atome des betrachteten Liganden, sondern neben anderen auch die elektrostatischen Eigenschaften der molekularen Oberfläche die entscheidende Bedeutung für die biologische Aktivität haben, ist deren Berücksichtigung der wichtigste Punkt der neuartigen "eXtended Electron Distribution" XED-Methode von Cresset. Die Methode liefert eine genaue Beschreibung von Molekülen im Hinblick auf ihre Oberflächeneigenschaften für den

Vergleich mit erstellten Oberflächenmotiven bekannter Inhibitoren und ermöglicht, durch die Analyse von großen Datenbanken chemischer Verbindungen neuartige Leitstrukturen zu finden.

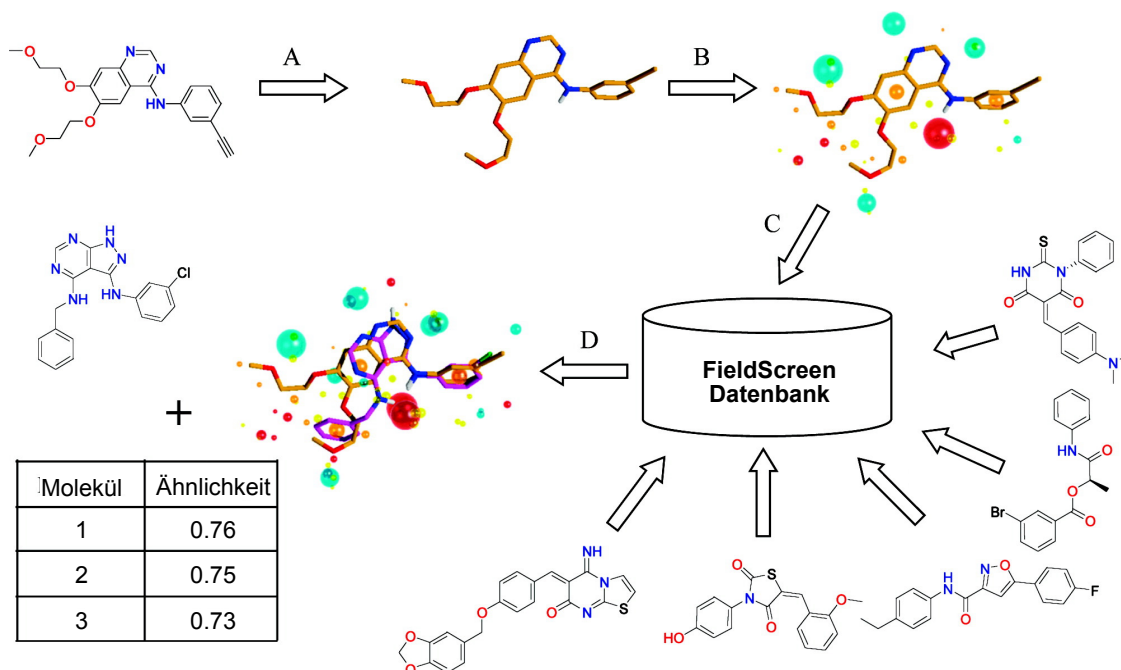


Abbildung 3.2 Darstellung des gesamten Prozesses für die Durchführung einer FieldScreen Suche nach Cheeseright et al.^[76]

Die Vorgehensweise erlaubt eine Reduktion der kompletten Oberflächenbeschreibung auf die lokalen Extrema, die sogenannten "field points" und damit eine wesentliche Vereinfachung des Datenabgleichs. Die Abbildung 3.3 zeigt die einzelnen Schritte der Erstellung der "field points", die je nach Farbgebung elektrophile (rot), nukleophile (blau), hydrophobe (orange) Bereiche als auch Van-der-Waals-Kräfte (gelb) beschreiben können. Die Größe der Kugeln reflektiert die Stärke der Wechselwirkungsenergie. Das in Abbildung 3.4 gegebene Beispiel dient zudem zur Veranschaulichung der Beziehung zwischen einigen chemischen Gruppen und einem typischen Bild der generierten "field points". Große Kugeln bzw. "field points" werden von geladenen Gruppen, wie z.B. Ammonium- oder Carboxylat-Reste erhalten. Die Amidgruppe stellt einen Wasserstoffbrückenbindungs-Donor (WBB-Donor) dar. Die gemischten hydrophoben und elektrostatischen Eigenschaften einer Phenyl-Gruppe spiegeln sich in einer Kombination aus positiven "field points" für aromatische "in-plane" WBB-Donoren,

Punkte für π -Elektronen-Wolken oberhalb und unterhalb der Ebene des Ringes sowie einem hydrophoben Punkt in der Mitte des Ringes wider.

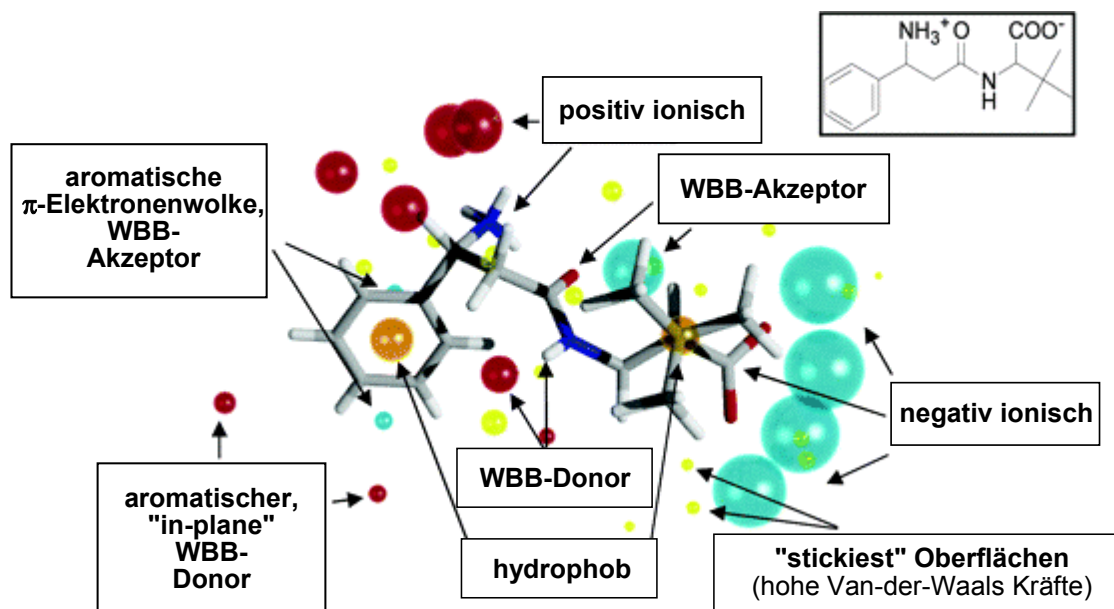


Abbildung 3.3 Veranschaulichung der Beziehung zwischen chemischen Gruppen und den generierten "field points" ^[77]

Die "field points" dienen nun zu der Durchsuchung der FieldScreen-Datenbank, bei der die Überlagerung dieser Punkte von jeder Struktur mit dem Oberflächenmotiv der Ausgangsverbindung vollzogen wird. An zwei Molekülen ist dieser Abgleich in Abbildung 3.4 demonstriert.

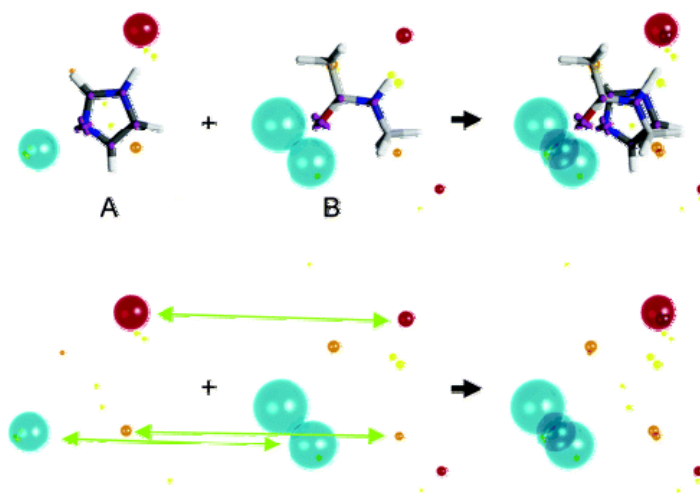


Abbildung 3.4 Demonstration einer Überlagerung der "field points" von zwei Strukturen ^[77]

Wie zuvor erwähnt benötigt die FieldScreen-Methode, die molekulare bzw. elektrostatische Ähnlichkeiten vergleicht, einen aktiven Liganden, idealerweise in einer bioaktiven Konformation, der als Suchanfrage verwendet werden kann. Dazu wurde die Vielzahl der Liganden überprüft, die mit der p38 MAP Kinase kokristallisiert wurden. In diesem Fall sollten Substanzen nachgeahmt werden, die mit der aktiven Form des Proteins interagieren und man schloss folglich alle Liganden aus, die zu alternativen Protein-Konformationen binden. Der Vorzug bei den verbleibenden Liganden wurde denen gegeben, die zu den hochaktiven “drug-like“ Verbindungen gehören und starke Wechselwirkungen mit Lys⁵³ und der Gelenkregion eingehen. Um die Auswahl verschiedener Chemotypen sicherzustellen, wurde zusätzlich eine visuelle Inspektion der die vorangegangenen Kriterien erfüllenden Verbindungen durchgeführt. Die Entscheidung fiel auf die in den pdb Codes 1m7q, 1yw2 und 1ouk dargestellten Liganden (siehe Abbildung 3.5).

Der Ligand von pdb-ID 1m7q ist ein einstellignanomolarer Hemmstoff der p38 MAP Kinase.^[78] Die Verbindung geht ausgeprägte Wechselwirkungen mit der Gelenkregion ein und besetzt die „Selektivitätstasche“. Außerdem enthält sie eine Piperazin-Teilstruktur, die zur Zucker- und Phosphat-bindenden Region ausgerichtet ist, aber nicht nennenswert zur Bindung beiträgt. Da diese Gruppe das von dem Ligand abgeleitete elektrostatische Feld stark verändert, wurde dieser Teil des Moleküls zu einer einfachen Dimethylamin-Teilstruktur geschnitten. Trotz möglicher Beeinflussung der Resultate einer solchen Suchanfrage wurde dies von Cresset durchgeführt, um Hits im virtuellen Screening zu fördern, die mit der Gelenkregion der p38 MAP Kinase interagieren, da eine Zunahme des Anteils der Felddescription abgeleitet von dieser wichtigen Region in Relation zur Größe des ganzen “field point pattern“ (FPP) erreicht wird.

Der Ligand von pdb-ID 1yw2^[79] bindet, wie auch der von 1m7q, in einer Protein-Konformation, in der die Amidbindung zwischen Met¹⁰⁹ and Gly¹¹⁰ eine Orientierung einnimmt, so dass das Amind-NH nahe zum Liganden zu stehen kommt und zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung befähigt ist. In diesem Punkt zeigen beide Liganden ein starkes negatives Feld zum Protein, wodurch sich große negative “field points“ dicht bei der Carbonylgruppe in 1m7q und dem Pyrimidin in 1yw2 ergeben. Allerdings fehlt dem Liganden von 1yw2 die N-H-Gruppierung von 1m7q und weist stattdessen ein aromatisches Wasserstoffatom auf, welches ein kleineres positives Feld

in Richtung der Gelenkregion ergibt. Die Haupteigenschaften des Liganden von 1yw2 sind die starken negativen “field points“, die im Zusammenhang mit dem Isoxazolone-Rest stehen, der im Protein-Ligand-Kokristall stark mit Lys⁵³ interagiert. Dies wird als eine wichtige Eigenschaft für p38 MAP Kinase-Hemmstoffe angesehen.

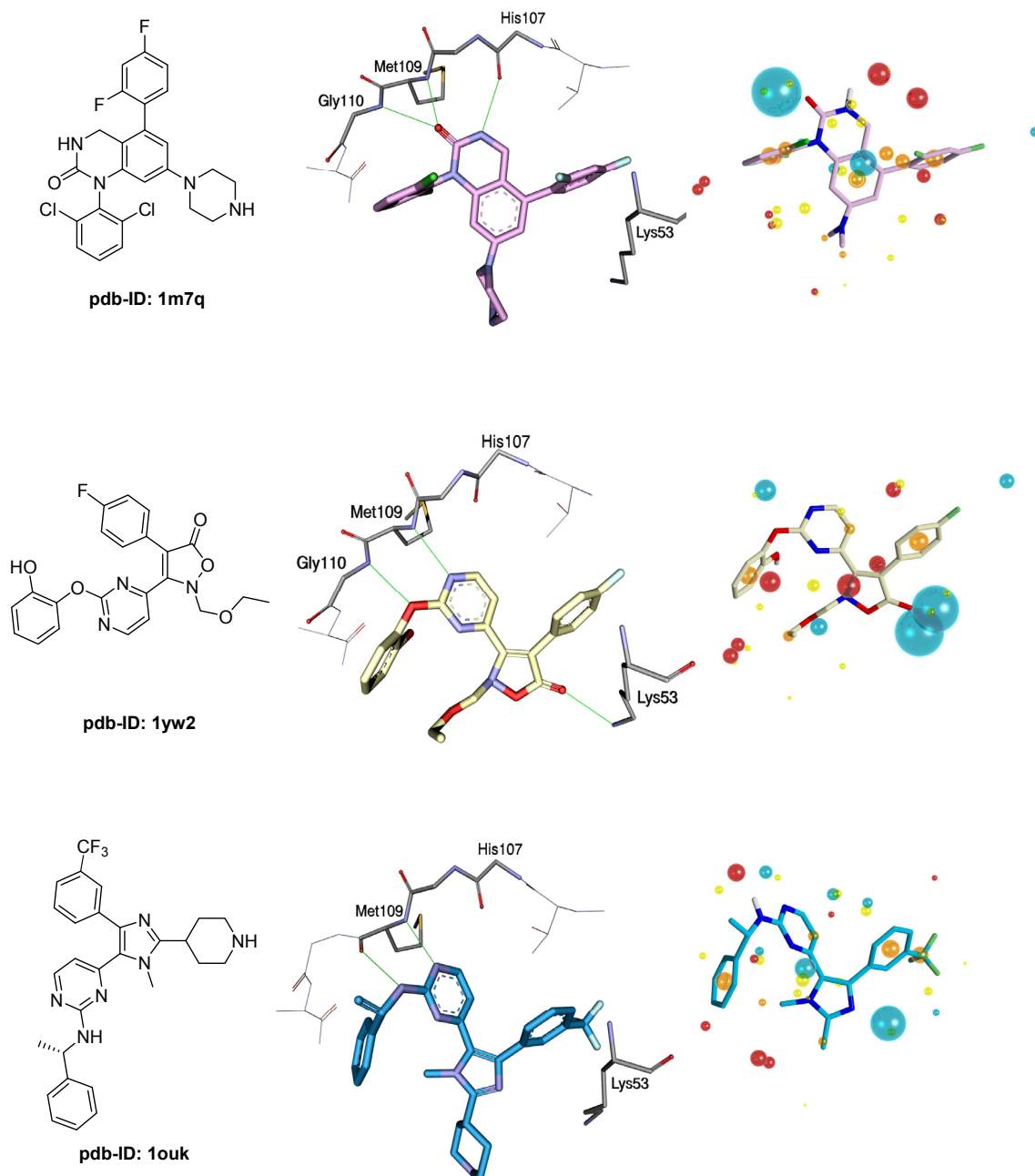


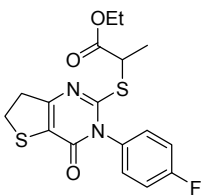
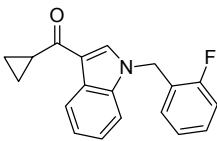
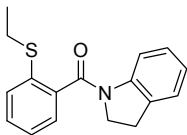
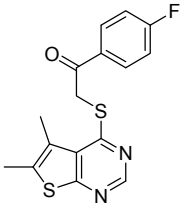
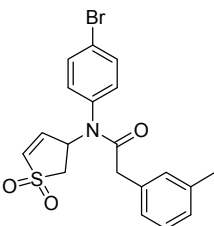
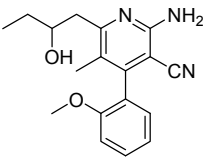
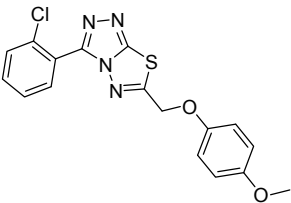
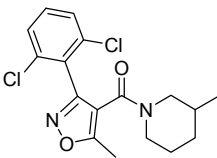
Abbildung 3.5 Ausgewählte Liganden aus den pdb Codes 1m7q, 1yw2 und 1ouk dargestellt als zwei-dimensionale Strukturen, in Interaktion mit der p38 MAP Kinase und in Überlagerung mit den generierten “field points“. [81]

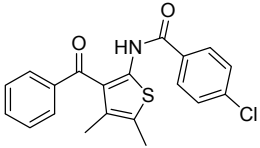
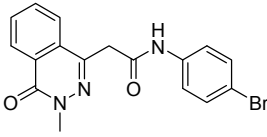
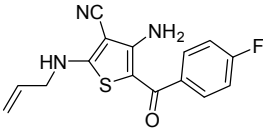
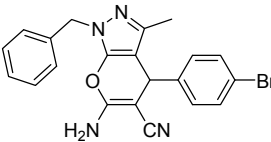
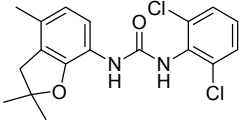
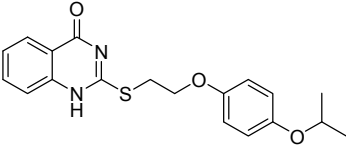
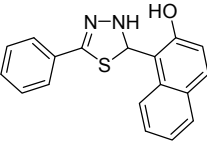
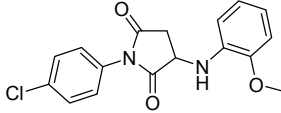
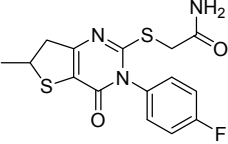
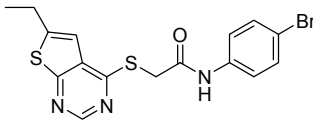
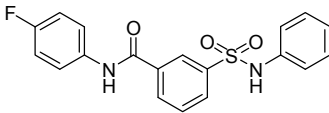
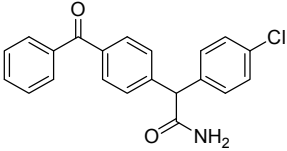
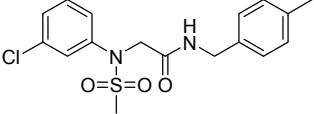
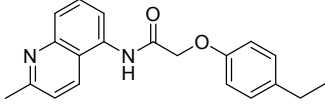
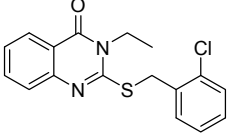
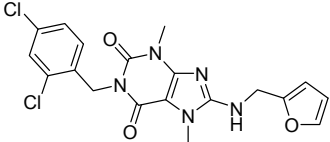
Der letzte Ligand, auf den die Wahl für das virtuelle Screening fiel, war der aus dem pdb-Code 1ouk.^[80] Im Unterschied zu den anderen ausgewählten Hemmstoffen bindet dieser Ligand an eine geringfügig andersartige Konformation des Proteins. In der kokristallisierten Struktur ist die Amidbindung zwischen Met¹⁰⁹ und Gly¹¹⁰ so orientiert, dass die Carbonyl-Gruppe des Met¹⁰⁹ in Richtung Ligand zeigt und in Wechselwirkung mit ihm steht. Folglich ist das Feldmuster des Liganden eher positiv (wie von einem Aminopyridin erwartet) und liefert ein gutes Gegenstück zu den anderen ausgewählten Suchanfragen. In einer ähnlichen Weise, wie für den Liganden von 1m7q beschrieben, wurde das sehr polare Piperidin zu einer Methyl-Gruppe reduziert, um den Schwerpunkt von der Zucker- und Phosphat-bindenden Region auf die Gelenkregion zu setzen. Jede dieser als Protein-Ligand kokristallisierten Verbindungen wurde somit extrahiert und begutachtet. Da die drei gewählten Suchanfragen eine fassettenreiche Zusammenstellung von "field point" Mustern zu dem Protein repräsentieren, war es gut vorstellbar, dass sie deutlich unterschiedliche Hit-Listen liefern würden. Eine Übersicht gibt Abbildung 3.5.^[81] Bei Bearbeitung der Resultate der FieldScreen-Experimente wurde von Cresset beschlossen, jede der drei Suchanfragen identisch zu behandeln und eine festgelegte Anzahl von jeder Liste weiterzuverfolgen. Von zunächst je 250 Resultaten jeder Ergebnisliste musste eine Auswahl von 50-100 Molekülen für die biologische Untersuchung getroffen werden. Die Zusammenfassung der drei Listen sollte die Auswahl für den Kauf der Substanzen erleichtern. Dabei konnten nur vier Verbindungen in mehr als einer Hitliste gefunden werden. Die verbleibenden 746 Verbindungen wurden basierend auf ihren 2D Strukturen gebündelt. Bei den daraus resultierenden 96 Clustern und 311 Einzelverbindungen fand eine Beurteilung hinsichtlich ihrer 2D und 3D Überlagerungen in Bezug auf die ursprüngliche Suchanfrage statt. Bei der optischen Überprüfung der 407 Verbindungen wurden folgende Ausschlusskriterien angewendet:

- ähnliches Grundgerüst bereits als p38 MAP Kinase Inhibitor bekannt
- der Abgleich der 3D Anordnung gegenüber der Suchanfrage ergab keine Wechselwirkung mit der Gelenkregion
- das Molekül erschien den medizinischen Chemikern als nicht "drug-like" (z.B. zu viele zweiwertige Schwefelatome oder Nitrogruppen)

Nach Abschluss der Beurteilung konnten 58 Cluster als potentielle p38 MAP Kinase-Hemmstoffe identifiziert werden. Um die biologische Analyse zu beschleunigen, war es opportun, aus diesen Clustern je ein Molekül auszuwählen, das dem Mittelpunkt des Clusters entsprechend der angewandten 2D Methode am nächsten stand. Eine Auswahl der Verbindungen, die gekauft und in einem Enzym-Assay^[82] auf ihre reale Hemmwirkung gegen die p38 MAP Kinase untersucht wurden (siehe Abschnitt 5), ist mit den erhaltenen Testergebnissen in Tabelle 3.1 gegeben. Von den insgesamt 58 Verbindungen zeigten elf eine Hemmung der p38 MAP Kinase größer als oder gleich 20%.

Tabelle 3.1 Strukturen der gefundenen Verbindungen, die bei einer Konzentration von 10 μM auf ihre Hemmwirkung getestet wurden (p1-p24); ^a Hemmung bei 10 μM

Verb.	Struktur	% ^a	Verb.	Struktur	% ^a
p1		23	p2		23
p3		4	p4		24
p5		2	p6		20
p7		68	p8		14

p9		31	p10		15
p11		46	p12		40
p13		66	p14		23
p15		21	p16		20
p17		4	p18		14
p19		15	p20		26
p21		1	p22		4
p23		28	p24		-

Die initialen Hits wurden einer Patent- und Literaturrecherche unterzogen. Auf Grund dieser Ergebnisse und den Erkenntnissen aus den bestimmten biologischen Aktivitäten fiel die Wahl auf die Verbindungen 3-(2-Chlorophenyl)-6-((4-methoxy-phenoxy)-methyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (**p7**) und 6-Amino-1-benzyl-4-(4-bromophenyl)-3-methyl-1,4-dihydropyrano[2,3-*c*]pyrazole-5-carbonitril (**p12**), die als Ausgangspunkte für eine weitere Entwicklung vom Hit zur Leitstruktur dienen sollten. Im folgenden Abschnitt wird auf die Substanzklasse der 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole näher eingegangen.

4 Chemie und Optimierung

4.1 Darstellung 3,6-disubstituierter [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole

4.1.1 Grundgerüst der [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole

Das Grundgerüst der [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole wurde erstmals von Kanaoka *et al.*^[83] 1957 beschrieben. Über die letzten Jahre hinweg erfuhr die Chemie dieser Substanzklasse wachsendes Interesse, da sich die Grundstruktur als wertvoll für die Entwicklung von Pestiziden erwies.^[84] Des Weiteren finden sich viele dieser Verbindungen im Bereich der Medizinischen Chemie wieder, da sie mit antimikrobiellen, antiviralen und antikanzerogenen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden.^[85-88] Manjunath *et al.*^[89] berichteten über die Testung von 3,6-disubstituierten Triazolo [3,4-*b*][1,3,4]thiadiazolen in einem Rattenmodell für entzündliche Reaktionen.^[90] Dabei zeigten verschiedene, ausgewählte Substanzen eine bedeutende antiinflammatorische Aktivität. Amir *et al.*^[91] beschrieben ebenso die antiinflammatorischen sowie analgetischen Eigenschaften von in Position 6 substituierten 1,2,4-Triazol[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-Derivaten von Naproxen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben dem pharmakologischen Profil auch eine Übersicht über die Effekte auf biochemische Parameter erstellt. Die Naproxen-Derivate zeigten in Bezug auf die Aktivität von Leberenzymen und anderen Blutwerten sowie im pathologischen Befund der Leberzellen keine Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die in Abbildung 4.1 gezeigte Grundstruktur ist ein anneliertes Ringsystem bestehend aus einem 1,2,4-Triazol- und einem 1,3,4-Thiadiazol-Grundkörper. Von dieser Grund-

struktur ausgehend sollte in den Positionen 3 und 6 variiert werden, um Moleküle mit einer besseren Hemmeigenschaft gegenüber der p38 MAP Kinase zu erhalten. Hierzu war zu Beginn der Arbeit die Entwicklung einer Synthesestrategie durchzuführen.

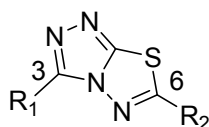


Abbildung 4.1 Grundstruktur 3,6-disubstituierter [1,2,4]Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole

4.1.2 Retrosynthese und entwickelte Synthesestrategien

Die retrosynthetische Betrachtung der im virtuellen Screening ausgewählten Substanz **p7** ließ zunächst auf eine einfache Synthese schließen (Abbildung 4.2).

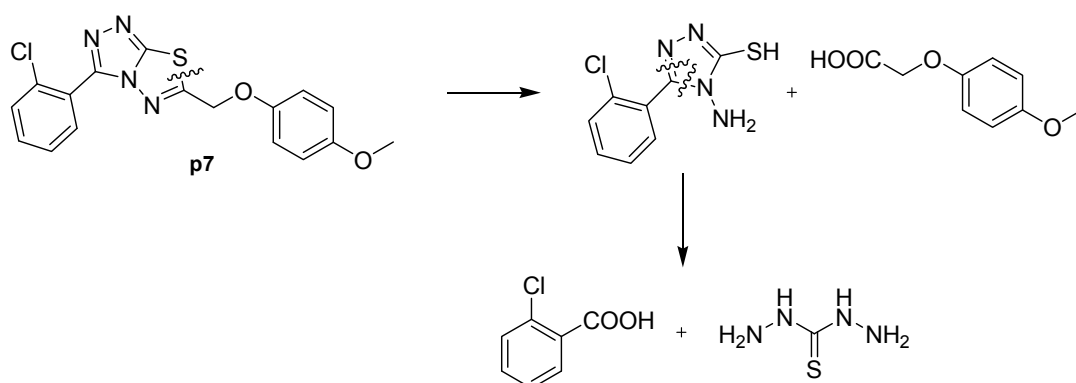


Abbildung 4.2 Retrosynthetische Betrachtung am Beispiel der Verbindung **p7**

Die Literaturrecherche bestätigte, dass zuerst der zentrale Triazol-Baustein synthetisiert werden muss, um zu der Zielverbindung zu gelangen. Im einfachsten Fall kann dies, wie später in Abschnitt 4.1.3 genauer beschrieben, von einem Carbonsäure-Derivat ausgehend realisiert werden. Durch eine abschließende Ringschluss-Reaktion zwischen dem Triazol-Baustein und einem weiteren Carbonsäure-Derivat können die in Position 3 und 6 verschieden substituierten Endverbindungen erhalten werden. Die Totalsynthese ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

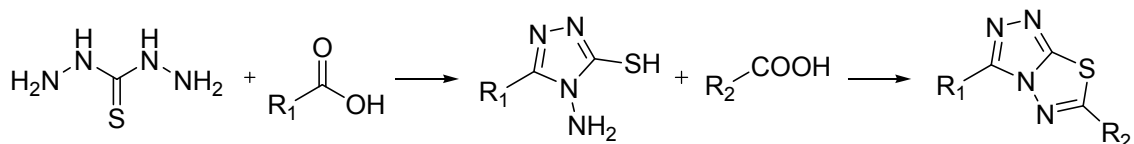


Abbildung 4.3 Totalsynthese von 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazolen

4.1.3 Der zentrale Triazol-Baustein

Das 1,2,4-Triazol zählt zu den elektronenarmen Heterozyklen und besteht aus einem fünfgliedrigen aromatischen Ring, der drei Stickstoffatome enthält, von denen zwei benachbart zueinander stehen.^[92] Die erste Syntheseroute, die zu diesem Ringsystem führt, wurde 1885 von Bladin *et al.*^[93] beschrieben. Von der Grundverbindung dieser Substanzklasse können zwei Tautomere formuliert werden, das 1*H*-Tautomer und das 4*H*-Tautomer (Abbildung 4.4).

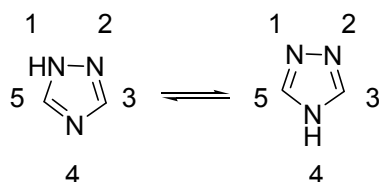


Abbildung 4.4 Tautomere des 1,2,4-Triazols

Ähnlich verhält es sich mit den in dieser Arbeit vorrangig behandelten in Position 5 substituierten 4-Amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiolen. Auch bei diesen Strukturen können zwei tautomere Formen beschrieben werden:

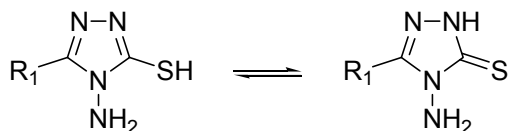


Abbildung 4.5 Tautomere Formen der in Position 5 substituierten 4-Amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiole

Der 1,2,4-Triazol-Grundkörper ist die Teilstruktur einer großen Anzahl biologisch aktiver Substanzen, die ein umfangreiches Wirkungsspektrum besitzen, einschließlich fungizider, antibakterieller, analgetischer und antiinflammatorischer Aktivitäten.^[94-97]

Als zwei bedeutsame Substanzen seien Fluconazol und Ribavirin genannt, die wegen ihrer antimykotischen bzw. virostatistischen Wirkung therapeutisch eingesetzt werden.^[98]

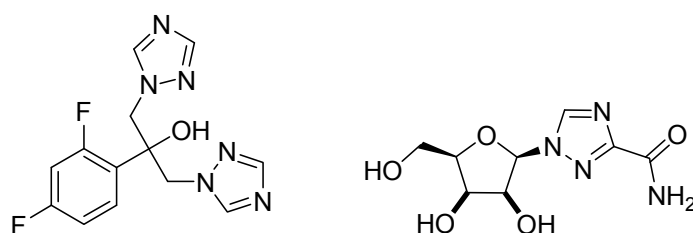


Abbildung 4.6 Strukturen von Fluconazol und Ribavirin

Über die Chemie der Produktklasse der 1,2,4-Triazole wurde umfassend in mehreren Publikationen rezensiert.^[99-102] Sie dienen nicht nur in der von uns verfolgten Synthesestrategie als wichtiger Zwischenbaustein, sondern fungieren auch als Startmaterial für eine Fülle unterschiedlichster chemischer Reaktionen. Eine einfache Suche mit SciFinder Scholar erbringt über 1200 Reaktionen, die solche Derivate nutzen. Als Baustein der kombinatorischen Chemie eröffnen sie durch Verknüpfung und Variation mit verschiedenen nieder- oder höhermolekularen Resten die Möglichkeit der Synthese einer Vielzahl von Verbindungen, mit Hilfe derer neue Wirkstoffe gefunden oder optimiert werden können. Wie in Abbildung 4.7 veranschaulicht, konnte nach verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Methoden vorgegangen werden, um zum zentralen Molekül zu gelangen.

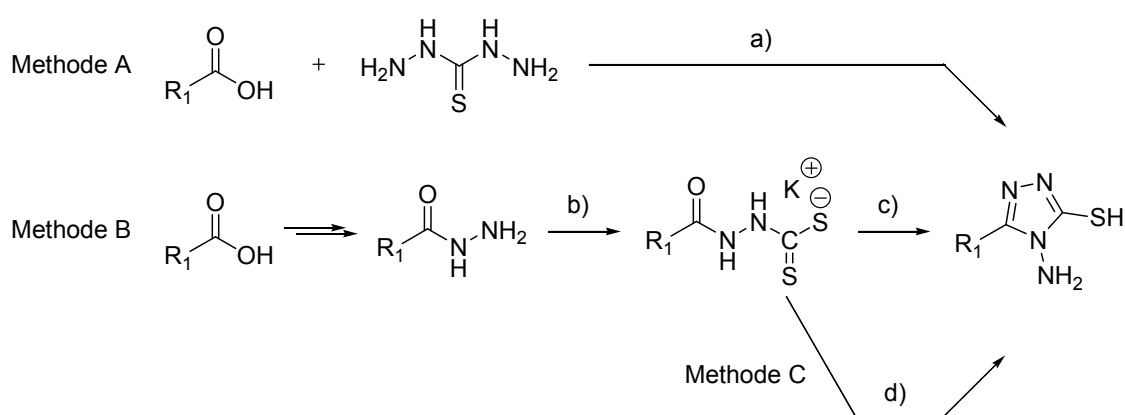


Abbildung 4.7 Synthesestrategien zu den in Position 5 substituierten 4-Amino-4H-1,2,4-triazol-3-thiolen; a) erwärmen bis zur Schmelztemperatur (160-180 °C), b) CS₂, KOH in EtOH, RT, 16 h; c), Hydrazin, H₂O, Rückfluss, 6 h; d) Hydrazin, MW.

In dieser Arbeit wurde die direkte, von Bayer *et al.*^[103] 1960 publizierte Synthese der 1,2,4-Triazole verfolgt (Abbildung 4.7, Methode A). Demnach wurden verschiedene flüssige, aliphatische Carbonsäuren, wie Ameisensäure, Essigsäure oder Propionsäure mit Thiocarbohydrazid zur Reaktion gebracht, indem die äquimolaren Mischungen beider Edukte zum Sieden gebracht wurden. So konnten die unterschiedlich substituierten 1,2,4-Triazole in Ausbeuten von 75-79% erhalten werden. Analog zu dieser Methode wurde von Invidiata *et al.*^[104] eine Fusion von Thiocarbohydrazid mit festen Carbonsäure-Derivaten durch Erwärmen bis zum Erreichen der Schmelztemperatur zwischen 160-180 °C beschrieben. Dennoch konnte mit diesem Verfahren keines der angestrebten Derivate in Ausbeuten größer als 10% hergestellt werden. Grund hierfür ist die Sublimation der als Startmaterial eingesetzten Säuren, die einen vollständigen Ablauf der Reaktion und damit die Bildung der Zielverbindungen verhinderte.

Simicus *et al.*^[105] berichteten, dass die Kondensation von Estern geeigneter sei, als die Verwendung der freien Säuren. Die Autoren konnten die Triazole im Falle von zyklischen Resten in Position 5 in Ausbeuten zwischen 27-60% erhalten. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass eine Reaktionszeit von 14 h benötigt wird und die Ester zuvor hergestellt werden müssen. Da Methanol oder Ethanol im Vergleich mit Wasser bessere Abgangsgruppen darstellen, war eine hohe Umsetzung zu den gewünschten Produkten zu erwarten. Jedoch konnten die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit nicht auf die *ortho*-substituierten Reste übertragen werden. Auch die Versuche schlugen fehl, die eingesetzten Säuren zunächst durch gängige Methoden mittels CDI oder der *in situ* Darstellung des Säurechlorids durch Phosphorylchlorid zu aktivieren sowie die Umsetzung der beiden Edukte in hochsiedenden Lösungsmitteln, beispielsweise 1,4-Dioxan, 1-Pentanol oder DMSO durchzuführen (siehe Abbildung 4.8).

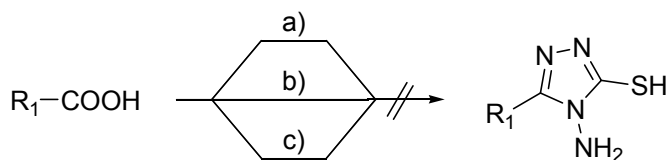


Abbildung 4.8 Übersicht der fehlgeschlagenen Ansätze die Carbonsäuren nach Aktivierung zum 1,2,4-Triazol umzusetzen; a) CDI, THF; b) $POCl_3$, Rückfluss; c) 1,4-Dioxan, Rückfluss; 1-Pentanol, Rückfluss, DMSO, 150 °C.

Parallel zu den genannten Strategien wurde die Syntheseroute von Reid und Heindel^[106] nachvollzogen, um das wichtige Intermediat zu erhalten. Diese Darstellung der in Position 5 substituierten 4-Amino-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiole ist die 1976 in der Literatur erstmals beschriebene Methode (Abbildung 4.7, Methode B). Als Edukte konnten ebenso verschiedene, kommerziell erhältliche Säure-Derivate eingesetzt werden. Alle Hydrazide wurden der bekannten Prozedur von Deeb *et al.*^[107] folgend dargestellt. Die Reaktion mit Carbondisulfid verlief quantitativ und die dabei entstandenen Salze wurden ohne weitere Aufarbeitung in einer anschließenden Ringschlussreaktion mit Hydrazin zum entsprechenden 1,2,4-Triazol umgesetzt. Für den letzten Schritt der Syntheseroute berichteten Joshi *et al.*^[108], dass der Einsatz von Mikrowellenstrahlung erfolgreich verlief und der Ringschluss in kürzerer Zeit durchgeführt werden kann (Abbildung 4.7, Methode C). Dennoch beinhaltet dieser synthetische Ansatz fünf Schritte und die erzielten Totalausbeuten für die wichtige Zwischenstufe waren nicht zufriedenstellend. Folglich wurde weiterhin nach einer Möglichkeit gesucht, die Methode von Bayer *et al.*^[103] auf den Bereich der für uns interessanten festen carbo- und heterozyklischen Säuren zu erweitern.

Die Entwicklung einer neuen Methode half, das Problem der Sublimation zu lösen. Als technische Lösung wurde die Reaktion aus den zuvor als Reaktionsgefäß verwendeten Kolben in ein Kugelrohr verlagert. Neben dem Vorteil der schnelleren sowie präziseren Temperaturregelung konnte auch die Sublimation durch den Verschluss mittels einer Fritte und der gleichmäßigen Erwärmung des gesamten Reaktionsgefäßes weitestgehend verhindert werden. Unerfreulicherweise wurden in der Serie der verschieden substituierten Benzoesäuren in der *ortho*-Position nur sehr kleine Substituenten wie Fluor toleriert, wahrscheinlich auf Grund sterischer Hinderung. Der Einfluss des *ortho*-Substituenten auf die Acidität der Benzoesäuren konnte sich möglicherweise ebenso nachteilig auf den Verlauf der Reaktion auswirken. Auch im Fall von Isonicotinsäure und 4-Fluorbenzoesäure, die beide einen sehr hohen Schmelzpunkt über 180 °C haben, war Methode A (Abbildung 4.7) nicht geeignet. Sie lieferte keine Bildung des entsprechenden 4-Amino-5-(pyridin-4-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiols oder nur sehr geringe Ausbeuten von wenigen Prozent des 4-Amino-5-(4-fluorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiols in Abhängigkeit zu den Schmelzpunkten von 319 °C gegenüber 184 °C. Der Grund dafür ist, dass ein Erhitzen der Reaktionsmischung über 180 °C eine Zersetzung des Thio-

carbohydrazid verursacht. Dennoch konnten Arylessigsäure-Derivate und andere Carbonsäure-Derivate mit mehr Abstand zwischen dem zyklischen Rest und der Säurefunktion (Aryl-X-COOH) mit allen Typen von Aryl-Substituenten unter Erzielung besserer Ausbeuten als bei allen anderen durchgeführten Synthesestrategien umgesetzt werden. Abbildung 4.9 zeigt den wahrscheinlichen Reaktionsmechanismus. Da in diesem Fall keine Aktivierung der Säuren stattfindet, kann unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine Bildung des Anhydrids zur Steigerung der Carbonylaktivität vermutet werden, die den nukleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des Stickstoffs begünstigt. Die gebildeten Endprodukte liegen in Form des Thioltautomers vor, was anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren leicht durch das Vorhandensein der Signale eines Wasserstoffs des Thiols bei 5-6 ppm und der zwei Wasserstoffe der Aminogruppe bei 13-14 ppm erkennbar ist.

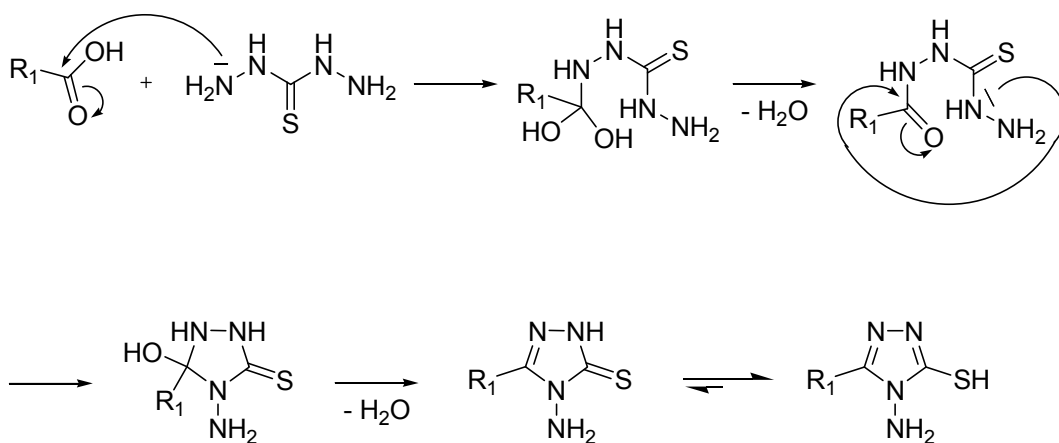
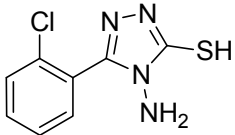
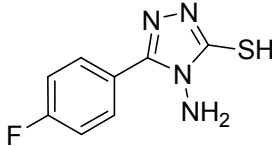
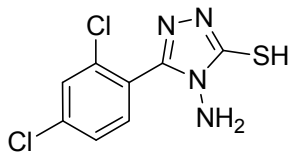
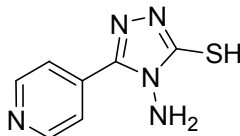
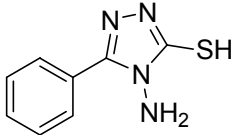
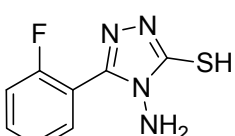
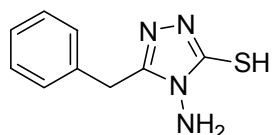
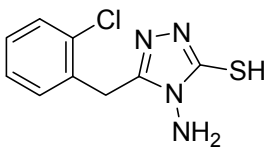
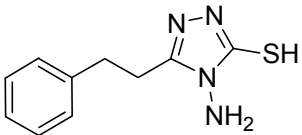
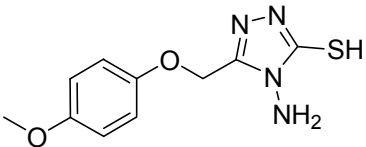


Abbildung 4.9 Wahrscheinlicher Reaktionsmechanismus zu den 4-Amino-5-substituierten-4H-1,2,4-triazole-3-thiolen.

In Tabelle 4.1 sind alle im Rahmen der Arbeit synthetisierten in Position 5 substituierten 4-Amino-4H-1,2,4-triazol-3-thiole zusammengefasst und die jeweilig gewählte Methode sowie die erreichten Totalausbeuten (Ausbeuten berechnet über alle Syntheseschritte der jeweiligen Methode zur besseren Vergleichbarkeit) angegeben.

Tabelle 4.1 Strukturen der synthetisierten 1,2,4-Triazol-Derivate mit der jeweiligen Totalausbeute der durchgeführten Syntheseroute

Verb.	Struktur	Methode	Ausbeute [%]
11		B	59
12		B	60
13		B	61
14		B	64
15		A	61
16		A	58
17		A	67

Verb.	Struktur	Methode	Ausbeute [%]
18		A	66
19		A	63
20		A	62

4.1.4 Synthese der 3,6-disubstituierten Triazol[3,4-b][1,3,4]thiadiazole

Die Annelierung des Thiadiazol-Rings mit dem Triazol-Kern ist durch eine Ringschluss-Reaktion sowohl unter Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure, Triethylorthoformat als auch mit Phosphorylchlorid beschrieben.^[109] Da die Methode unter Verwendung von dem letztgenannten Reagenz sehr gute Ergebnisse erbrachte, wurden im Folgenden immer verschiedene Carbonsäure-Derivate mit den in Abschnitt 4.1.3 dargestellten 1,2,4-Triazol-Derivaten in Phosphorylchlorid durch mehrstündiges Erhitzen auf Siedetemperatur zur Reaktion gebracht.

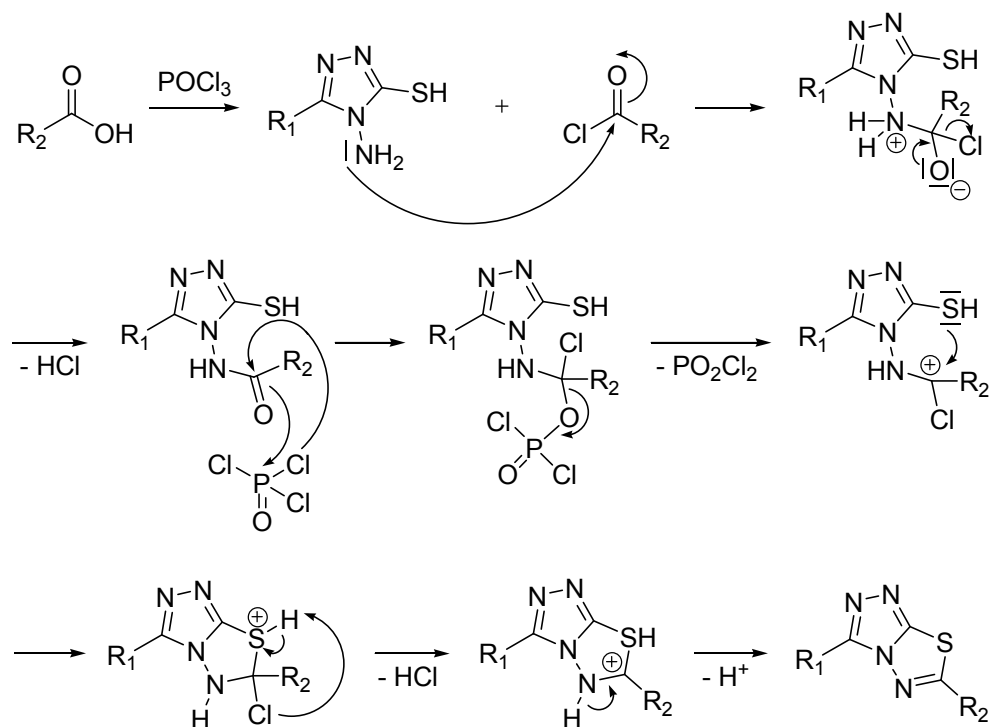
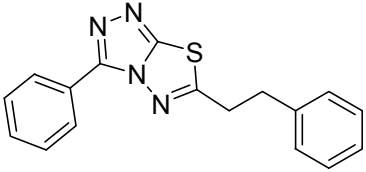
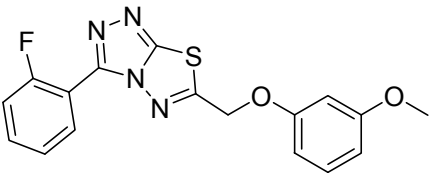
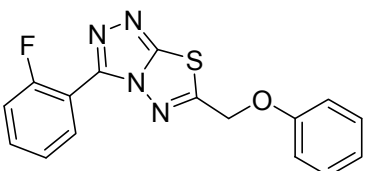
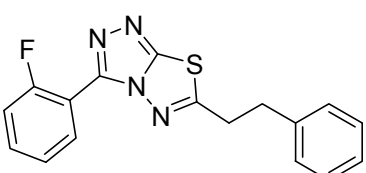
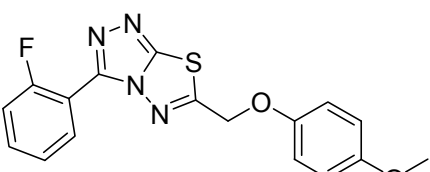
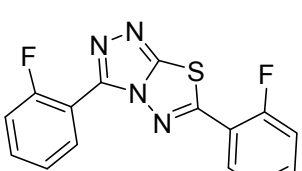
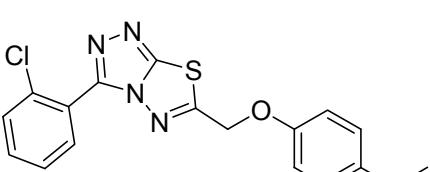


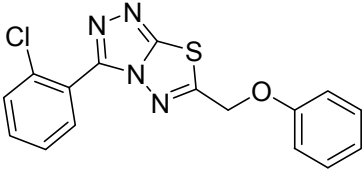
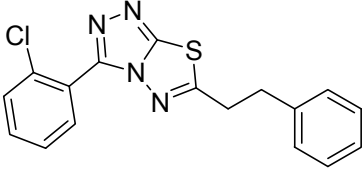
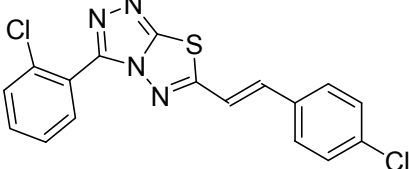
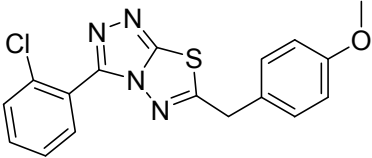
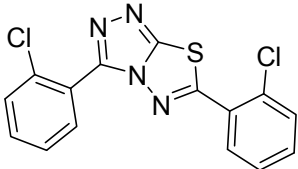
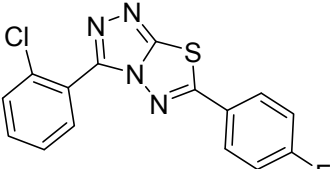
Abbildung 4.10 Wahrscheinlicher Reaktionsmechanismus zur Bildung des Grundgerüsts der $[1,2,4]Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole$; a) $POCl_3$, Rückfluss, 7 h.

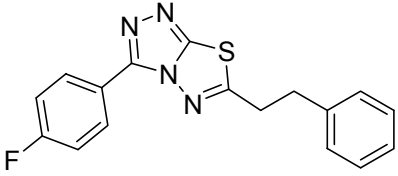
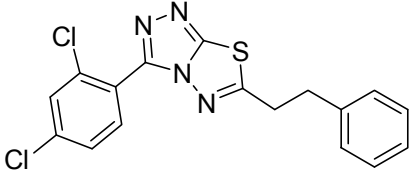
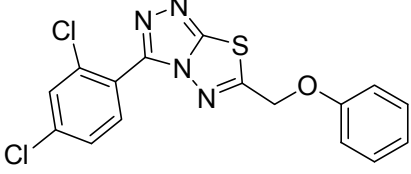
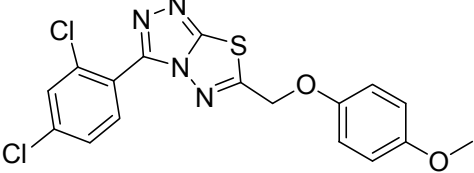
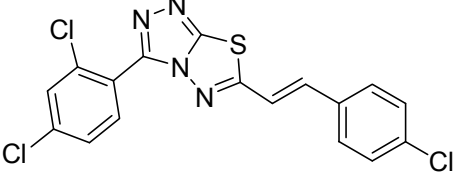
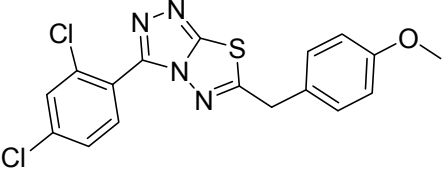
Die Produkte kristallisierten in guten Ausbeuten und sehr hoher Reinheit aus. Die synthetisierten Derivate sind in Tabelle 4.2 mit den entsprechenden Ausbeuten aufgeführt.

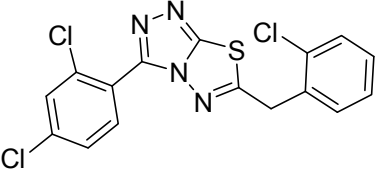
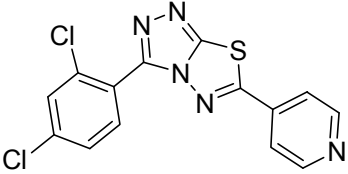
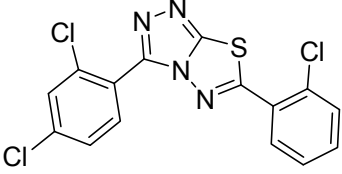
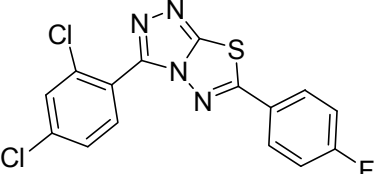
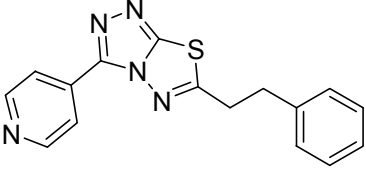
Tabelle 4.2 Synthetisierte Derivate der $[1,2,4]Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole$ mit den erreichten Ausbeuten

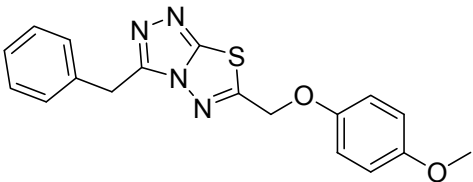
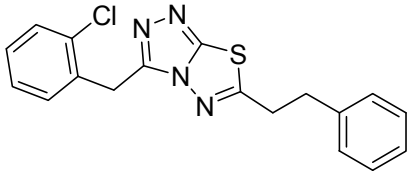
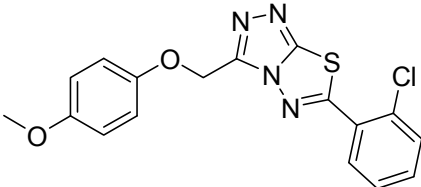
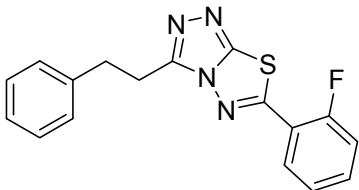
Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
21		74
22		70

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
23		71
24		70
25		71
26		69
27		75
28		73
29 = p7		75

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
30		77
31		72
32		89
33		82
34		76
35		77

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
36		73
37		75
38		71
39		73
40		70
41		67

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
42		70
43		62
44		68
45		70
46		62

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
47		79
48		72
49		74
50		67

Erhaltene Kristalle konnten direkt ohne eine weitere Aufreinigung zu der Erstellung von Röntgenkristallaufnahmen verwendet werden. Als Beispiel ist in Abbildung 4.11 die Kristallstruktur von Verbindung **33** dargestellt.^[110]

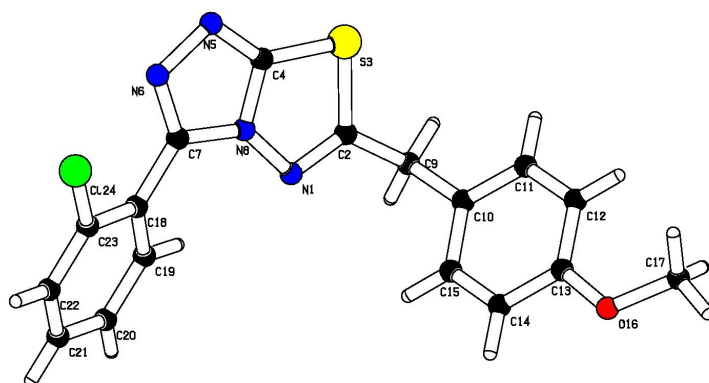


Abbildung 4.11 Kristallstruktur von Verbindung 33

Die Synthese der 3,6-disubstituierten Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole diente dazu, gewünschte Zielverbindungen für die biologische Testung zu erhalten. Die Substanzen wurden nach dem in Abschnitt 4 beschriebenen Verfahren auf ihre biologische Aktivität gegen die p38 α MAP Kinase geprüft.

4.2 Darstellung der 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole

4.2.1 Grundgerüst der Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole

Im zweiten chemischen Teil der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole beschrieben. Der Austausch des [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-Kerns gegen den Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol-Grundkörper eröffnet die Möglichkeit einer weiteren Substitution in Position 6, in der nun an Stelle des dreifach gebundenen Stickstoffes ein Kohlenstoffatom steht. Das Grundgerüst ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Das Pharmakophor eines Pyridin-Rests in direkter Nachbarschaft zu einem 4-Fluorphenylsubstituenten, das schon bekannte p38 MAP Kinase-Hemmstoffe, wie z.B. SK&F 86002 oder SB 203580 (siehe Abschnitt

1.2.3) tragen, kann jetzt realisiert werden. Erste Studien durch Molekular-Modelling ließen den Schluss zu, dass die Einführung dieses Substitutionsmusters zu der bekannten Wechselwirkung mit Met¹⁰⁹ und der Belegung der „Selektivitätstasche“ führen könnten.

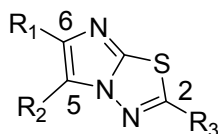


Abbildung 4.12 Grundgerüst der 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole

Über die Synthese und die biologischen Aktivitäten von alkyl- bzw. arylsubstituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazolen existieren mehrere Veröffentlichungen.^[111-116] Das Ringsystem des Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiodiazols wurde von Matsukawa und Ban^[117] durch Kondensation von in 5-Stellung alkyl- bzw. arylsubstituierten 2-Amino-thiadiazolen mit α -Halogenketonen erstmals 1953 erhalten. Aktuell ist ein Patent vom April 2009, das Mitglieder dieser Substanzklasse als Proteinkinase-Inhibitoren beschreibt.^[118]

Allerdings gab es bis zu diesem Zeitpunkt keine synthetischen Arbeiten über [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole, die einen Pyridin-Rest in Position 5 oder 6 tragen. Dennoch wurde die Darstellung dieser Verbindungen verfolgt und eine retrosynthetische Betrachtung mit anschließender Entwicklung verschiedener Synthesestrategien durchgeführt.

4.2.2 Retrosynthese und entwickelte Synthesestrategien

Die retrosynthetische Betrachtung und die Recherche nach beschriebenen Synthesen dieser Verbindungsklasse ließen schnell erkennen, dass die wenigen bekannten Methoden alle auf einer sehr ähnlichen Reaktionsabfolge beruhen (siehe Abbildung 4.13). Ohne Ausnahme bauen alle diese Strategien auf dem zentralen Intermediat, einem in Position 5 substituierten 2-Amino-1,3,4-thiadiazol auf. Die Synthese dieser Verbindungsklasse ist zentrales Thema des folgenden Abschnitts.

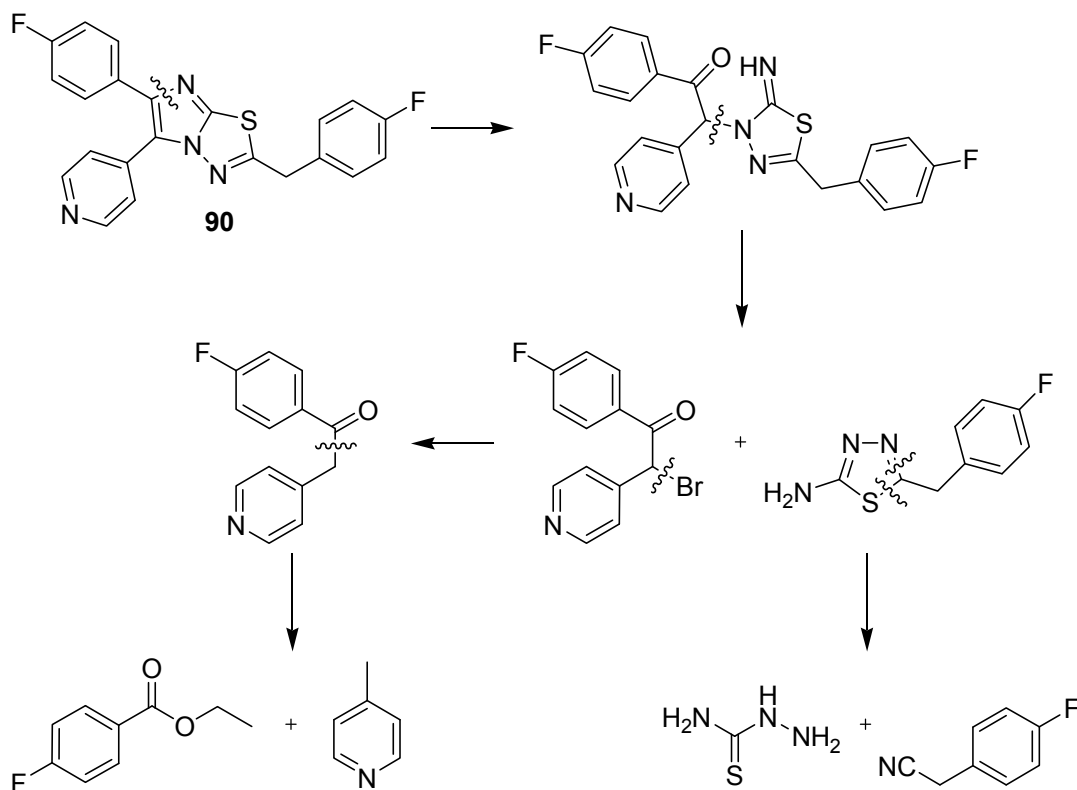


Abbildung 4.13 Retrosynthetische Betrachtung am Beispiel der Verbindung **90**

4.2.3 Der zentrale Thiadiazol-Baustein

Thiadiazole zählen wie auch die Triazole zu den heterozyklischen aromatischen Verbindungen. Das 1,3,4-Thiadiazol ist ein fünfgliedriger, elektronenarmer Heterozyklus, der zwei benachbarte Stickstoffatome sowie ein Schwefelatom enthält. Die erste Verbindung dieser Produktklasse wurde 1882 von Emil Fischer entdeckt.^[119] Heute findet sich der 1,3,4-Thiadiazol-Grundkörper in einer großen Anzahl biologisch aktiver Substanzen als Teilstruktur wieder.^[120-121] Einige Strukturbeispiele sind in Abbildung 4.14 gegeben. *N*-(5-sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamid, besser unter dem Namen Acetazolamid bekannt, ist ein Carboanhydrasehemmer, der als Arzneistoff bei Glaukom oder Ödemen eingesetzt wird. Antikarzinogene Eigenschaften besitzt das 1,3,4-Thiadiazol-2-amin. In der Landwirtschaft finden die 1,3,4-Thiadiazol-Derivate *N*-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin und 1-Methyl-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-harnstoff als Insektizid bzw. Herbizid Verwendung.

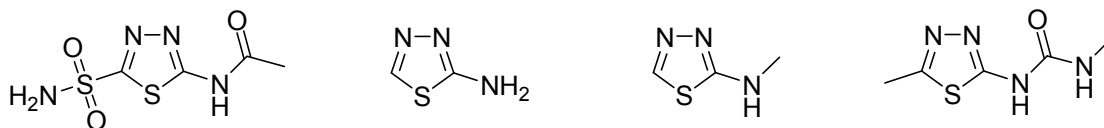


Abbildung 4.14 Strukturen von *N*-(5-sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamid (Acetazolamid), 1,3,4-Thiadiazol-2-amin, *N*-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin und 1-Methyl-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)harnstoff

Die in dieser Arbeit als wichtige Zwischenprodukte benötigten, in Position 5 verschiedenen substituierten 1,3,4-Thiadiazole tragen in Position 2 alle als funktionelle Gruppe einen Amino-Rest (siehe Abbildung 4.15).

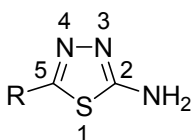


Abbildung 4.15 Grundstruktur der verschieden substituierten Thiadiazol-Bausteine

Auch bei diesen Strukturen können zwei tautomere Formen beschrieben werden:

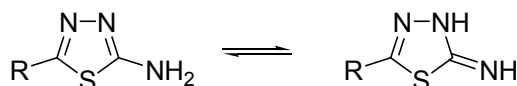


Abbildung 4.16 Tautomere Formen der in Position 5 substituierten 1,3,4-Thiadiazol-2-amine.

Eine Möglichkeit, die Zielstruktur zu erhalten, wurde von Merck in einem Patent beschrieben.^[122] In Trifluoressigsäure werden äquimolare Mengen Thiosemicarbazid und das entsprechend substituierte Nitril zur Reaktion gebracht (Abbildung 4.17, Methode A). Nitrile rechnet man zu den analogen Derivaten der Carbonsäuren, da der Kohlenstoff in derselben Oxidationsstufe wie in der Carboxylgruppe vorliegt. Durch die Substitution der drei Wasserstoffatome der Essigsäure durch Fluoratome ist die Trifluoressigsäure eine stärkere organische Säure mit einem pK_s -Wert von 0.26. Dies ermöglicht den Einsatz anstelle einer Mineralsäure, wie der konzentrierten Schwefelsäure, die zur Verseifung zum Säureamid und anschließender Decarboxylierung der Edukte führen könnte.

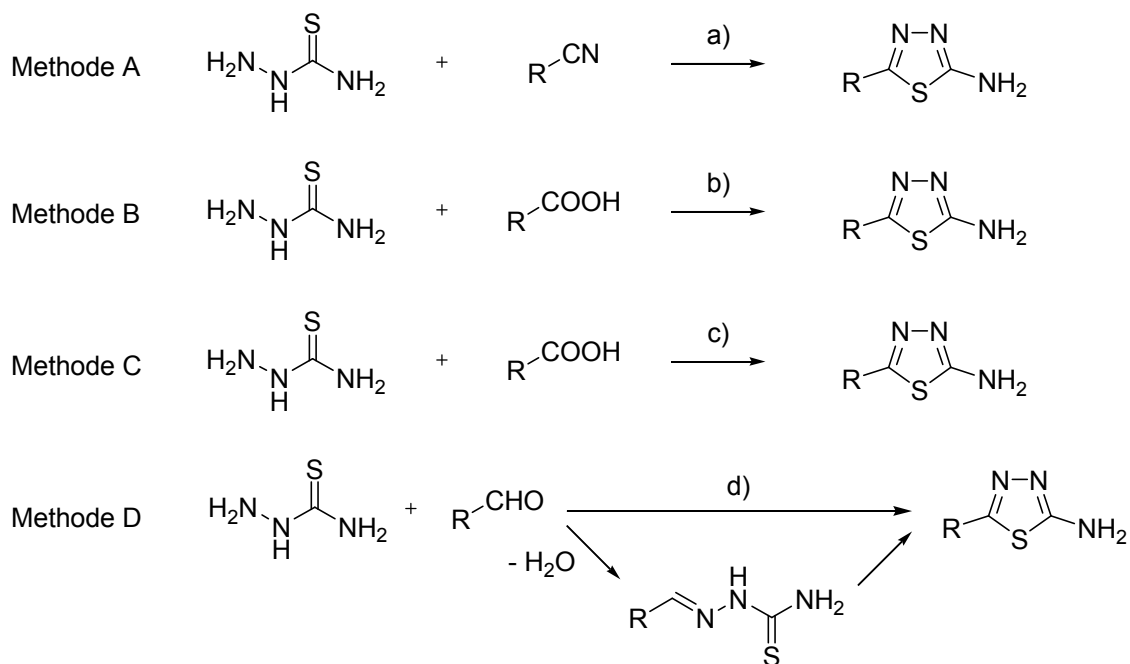


Abbildung 4.17 Darstellung von Thiadiazol-Derivaten durch Umsetzung von Thiosemicarbazid mit Nitrilen oder Carbonsäuren; a) Trifluoressigsäure, 4 h, 80-90 °C; b) konzentrierte Schwefelsäure, 7 h, 80-90 °C; c) POCl_3 , 5 h, 70 °C; d) 1. Ethanol/Wasser (1:1), 60 °C; 2. Wasser, FeCl_3 , 45 min, 80-90 °C.

Die von Spillane *et al.*^[123] und Shukla *et al.*^[124] angewendete Methode geht auf Chubb und Nissenbaum^[125] zurück und nutzt konzentrierte Schwefelsäure als Säurekatalysator und als wasserziehendes Reagenz (Abbildung 4.17, Methode B). Der Reaktionsmechanismus, nach dem die Reaktionen Methode B vermutlich ablaufen, ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Nach Aktivierung der Carbonsäure durch Bildung des Acyliumions greift das freie Elektronenpaar des Stickstoffs nukleophil an. Das zunächst gebildete Zwischenprodukt, ein in Position 2-substituiertes Hydrazinocarbothioamid, wird durch einen nukleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des Stickstoffs am Carbonyl-Kohlenstoffatom der entsprechenden Säure mit anschließender Wassereliminierung erhalten. Danach erfolgt der Ringschluss zum fünfgliedrigen Heterozyklus durch erneuten nucleophilen Angriff des Schwefels an der Carbonyl-Funktion des Zwischenprodukts mit darauffolgender Aromatisierung durch Wasserabspaltung.

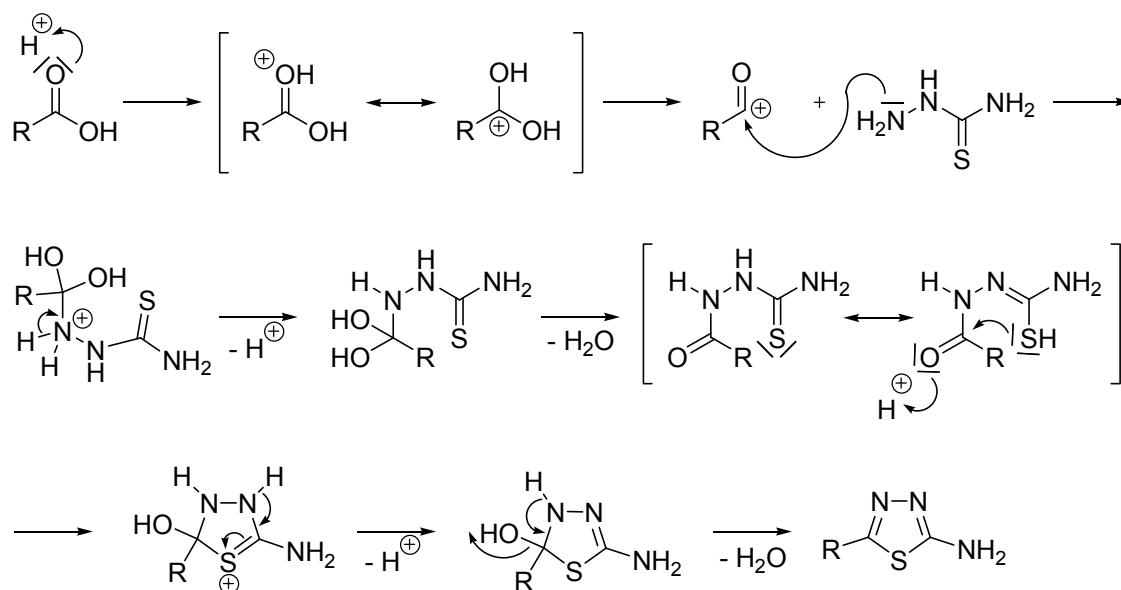


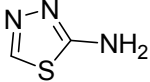
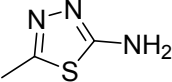
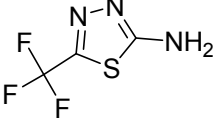
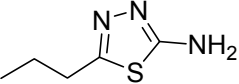
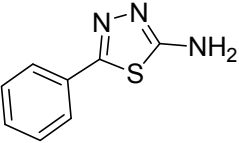
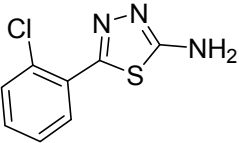
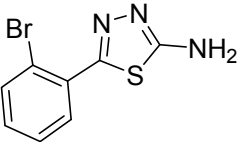
Abbildung 4.18 Wahrscheinlicher Reaktionsmechanismus zum Thiadiazol-Kern

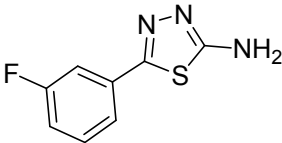
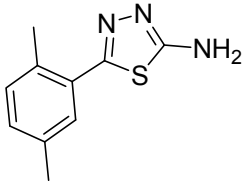
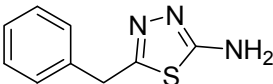
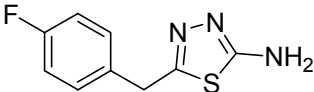
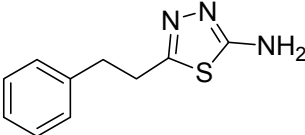
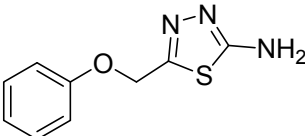
Nach ähnlichem Verfahren verläuft die Synthese nach Carvalho *et al.*^[126], bei der Phosphorylchlorid zum Einsatz kommt und die Reaktion über die Bildung des Säurechlorids und nachfolgendem Ringschluss verläuft (Abbildung 4.17, Methode C). Diese Vorgehensweise wurde von YuyeYu^[127] auch unter Zuhilfenahme von Mikrowellenstrahlung beschrieben. Da es zu Beginn wie auch im Fortgang der Reaktion zu einer starken Aufschäumung kam, wurde dieser Ansatz nicht durchgeführt.

Ausgehend von Aldehyden können nach Jatav *et al.*^[128] und Shaban *et al.*^[129] Thiadiazole auf eine andere Weise dargestellt werden (Abbildung 4.17, Methode D). Nachdem das Thiosemicarbazid und der Aldehyd zum Thiosemicarbazon reagiert haben, kann es im Anschluss mit Eisen(III)chlorid in Wasser bei 80-90 °C über 45 min zum Produkt oxidativ cyclisiert werden. Im ammoniakalischen Milieu fällt das Amin aus und kann leicht durch Filtration abgetrennt werden.

Mit Hilfe der vorgestellten vier Methoden A-D (Abbildung 4.17) konnten die gewünschten Thiadiazole in guten Ausbeuten synthetisiert werden. Eine Zusammenfassung der dargestellten Verbindungen, der gewählten Syntheseroute und der erzielten Ausbeute gibt Tabelle 4.3. Auch hier sind zur besseren Vergleichbarkeit der Methoden die Ausbeuten als Totalausbeuten zu verstehen, die über alle Syntheseschritte hinweg an Endprodukt erreicht werden konnten.

Tabelle 4.3 Synthetisierte Thiadiazol-Derivate mit der gewählten Syntheseroute und der erzielten Ausbeute

Verb.	Struktur	Methode	Ausbeute [%]
51		C	61
52		B	53
53		B	63
54		B	61
55		D	62
56		D	60
57		D	61

Verb.	Struktur	Methode	Ausbeute [%]
58		D	64
59		D	59
60		A	64
61		A	68
62		B	67
63		B	66

4.2.4 Synthese der 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole

Der aus der retrosynthetischen Betrachtung entwickelten Synthesestrategie folgend wurde der Thiadiazol-Kern für das Ringsystem des Imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazols als Grundstein genutzt. Abbildung 4.19 stellt den dazugehörigen Reaktionsweg dar.

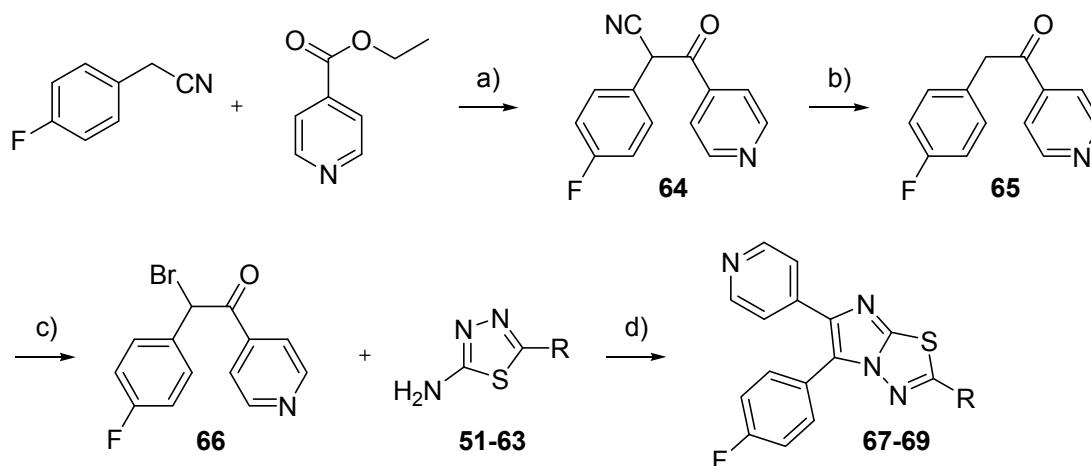


Abbildung 4.19 Übersicht der Totalsynthese von in Position 2 unterschiedlich substituierten 5-(4-Fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole; a) Natriumethoxid-Lösung, 21%ig in Ethanol, Rückfluss, 2 h; b) 48%ige HBr, Rückfluss, 16 h, Eisbad, konzentrierter NH_3 ; c) Br_2 , Eisessig, RT, danach 80 °C, 3 h; d) EtOH, Rückfluss, 18 h.

Verbindung (**64**) wurde ausgehend von 2-(4-Fluorophenyl)acetonitril und Isonicotinsäureethylester in Ethanol unter Zugabe von Natriumethanolat durch Erwärmen unter Rückfluss dargestellt. Hierbei findet zunächst eine Deprotonierung des Nitrils in α -Stellung zur funktionellen Gruppe durch die eingesetzte Base statt, mit anschließendem nukleophilen Angriff des gebildeten Carbanions an dem Carbonyl-Kohlenstoffatom des entsprechenden Esters (siehe Abbildung 4.20).

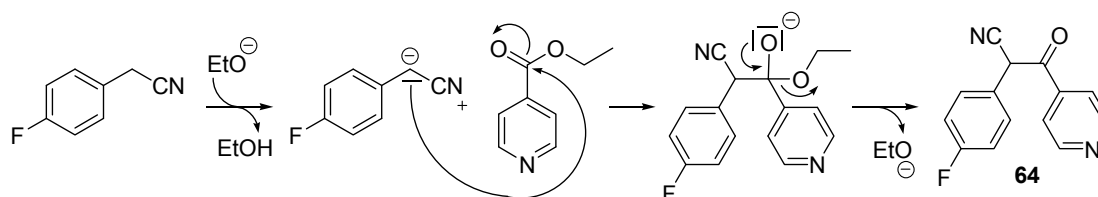


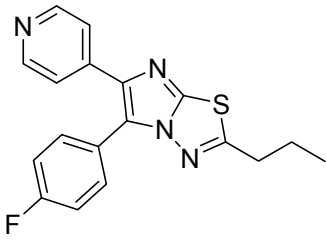
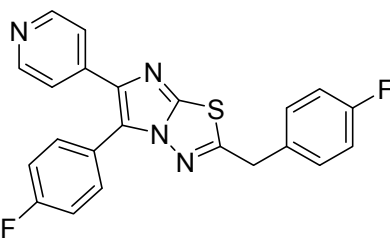
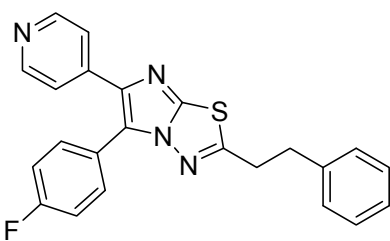
Abbildung 4.20 Mechanismus zur Bildung der Verbindung (**64**)

Durch Erwärmen unter Rückfluss von Verbindung (**64**) in 48%iger HBr entsteht das 2-(4-Fluorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)ethanon (**65**) in einer Ausbeute von 58%.^[130] Die Bromierung in α -Stellung des Ketons wurde durch tropfenweise Zugabe von einem Äquivalent Brom zu einer Lösung aus der Verbindung (**65**) in Eisessig bei Raumtemperatur und anschließender Erwärmung auf 80 °C für 3 h durchgeführt. Die Umsetzung ist nahezu quantitativ.^[131] Der Mechanismus verläuft über eine säurekatalysierte Enolisierung mit anschließender elektrophiler Addition des Halogens an die entstandene Dop-

pelbindung. Durch die Verringerung der eingesetzten Menge an Eisessig gegenüber der Originalvorschrift entfiel zumeist das Einengen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurde das gewünschte Produkt in Form von leicht gelblichen Kristallen direkt abfiltriert. Eine Verbesserung der Reinheit und ein schnelleres Trocknen der Substanz konnte durch das Waschen des Rückstandes mit kleinen Mengen Eisessig, Diethylether und *n*-Hexan erreicht werden.^[132]

Nach dem Syntheschema schloss sich die Kondensation der in 5-Stellung alkyl- bzw. arylsubstituierten 2-Amino-thiadiazolen mit den α -Halogenketonen an. Alle drei auf diesem Wege hergestellten Derivate konnten in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten werden (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Synthetisierte in Position 5 variabel substituierte (4-Fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
67		61
68		58
69		57

Gleichzeitig wurde versucht, nach analoger Strategie, die für die 5-(4-Fluorophenyl)- und 6-(Pyridin-4-yl)-substituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole erfolgreich war, eine Synthese des Konstitutionsisomeres zu verwirklichen (Abbildung 4.21).

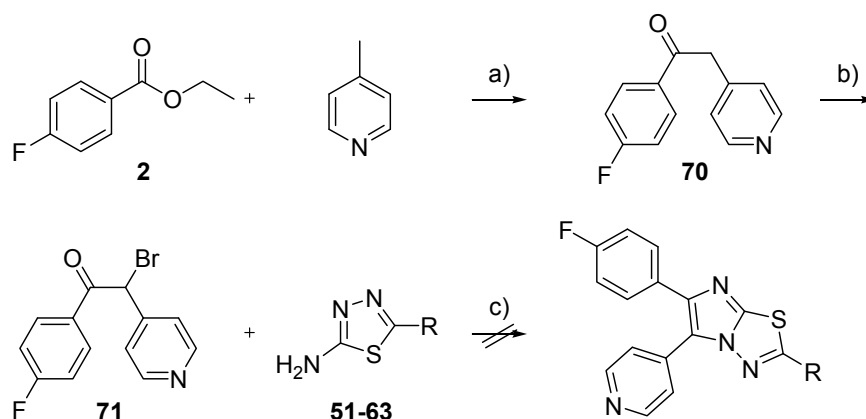


Abbildung 4.21 Übersicht der Totalsynthese von in Position 2 unterschiedlich substituierter 5-(4-Fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole; a) NaHMDS 2.0 M in THF, THF, 0 °C danach RT; b) Br₂, Eisessig, RT, danach 80 °C, 3 h; c) EtOH, Rückfluss, 18 h.

Zunächst schien sich die abgewandelte Methode zu bewähren. Die Darstellung von 1-(4-Fluorophenyl)-2-(pyridin-4-yl)ethanon gelang über die Umsetzung von 4-Methylpyridin mit 4-Fluorbenzoesäureethylester in THF bei 0 °C unter Einwirkung der Base NaHMDS (Natriumhexamethyldisilazan) mit nahezu quantitativer Ausbeute.^[130] Die Deprotonierung der Methylgruppe des γ -Picolins durch NaHMDS und der anschließende nukleophile Angriff am Carbonyl-Kohlenstoffatom erfolgt in analoger Weise zu dem in Abbildung 4.20 veranschaulichten Mechanismus. Die Bromierung dieses Ketons wurde auf die gleiche Weise realisiert wie bei der entsprechenden Verbindung mit umgekehrtem Substitutionsmuster. Der Versuch, aus den Verbindungen (**71**) und (**51-63**) in Ethanol in oben beschriebener Weise das Kondensationsprodukt darzustellen, schlug jedoch fehl.

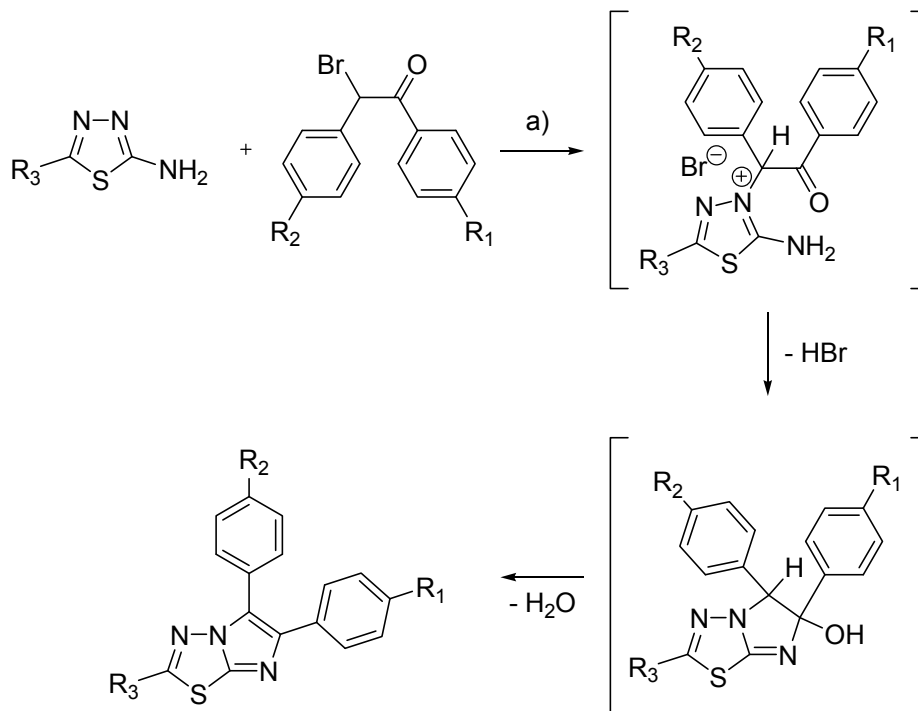


Abbildung 4.22 Mechanismus der Ringschluss-Reaktion nach Gadad *et al.*^[133]

Von Gadad *et al.*^[133] wurde der Ablauf der Ringschluss-Reaktion, wie in Abbildung 4.22 dargestellt, beschrieben. Die in der Veröffentlichung von Kolavie *et al.*^[134] gezeigte Synthese beinhaltet die Zugabe von Natriumcarbonat nach Ablauf der zur Zyklisierung nötigen Reaktionszeit, um die freie Base zu erhalten (Abbildung 4.23, Methode A). Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, die beiden Reaktionspartner in DMF über drei Stunden bei 150 °C umzusetzen. Nach Neutralisation mit 20%iger NaOH kristallisieren die Zielverbindungen aus und können abgetrennt werden (Abbildung 4.23, Methode B).^[135] Doch gelang eine Isolierung des gewünschten Produktes nicht. Neben einer großen Anzahl von Nebenprodukten konnte das debromierte Keton identifiziert werden. Auch verlief die Umsetzung in Aceton nicht unter Bildung der gewünschten Verbindungen (Abbildung 4.23, Methode C).^[136] Adreani *et al.*^[138] berichteten von der Bildung sowie einer Isolierung des Salzes aus Aceton und einer anschließenden Zyklisierung in 2 N Salzsäure (Abbildung 4.23, Methode D).^[137] Auch die Isolierung eines derartigen Zwischenproduktes konnte in diesem Fall nicht erzielt werden. Ebenso schlug eine Identifizierung in der Reaktionslösung mittels LC-MS fehl. Daher blieb der direkte Zusatz von wasserentziehenden Mitteln zum Reaktionsansatz, um die Bildung des Produktes zu erzielen, ohne Erfolg. Durch die Variation von Reaktionstemperatur

und Reaktionszeit sowie der eingesetzten Lösungsmittel konnte auch keine Verbesserung des Synthese-Ergebnisses erzielt werden. Der Versuch, das gewünschte Endmolekül durch Umsetzung in der Mikrowelle zu synthetisieren, wie durch Wang *et al.*^[139] für einige Derivate beschrieben, schlug ebenfalls fehl (Abbildung 4.23, Methode E). Die von Kidwai *et al.*^[140] für die Kondensation von α -Bromacetophenonen mit 1,3,4-Thiadiazolen eingesetzte ionische Flüssigkeit [bmim]PF₆ (1-Butyl-3-methyl-imidazoliumhexafluorophosphat) ließ die Reaktion in unserem Falle ebenso erfolglos verlaufen (Abbildung 4.23, Methode F). In Abbildung 4.23 sind verschiedene fehlgeschlagene Syntheseansätze dargestellt.

Auffällig war, dass bei der massenspektrometrischen Untersuchung der verschiedenen Reaktionsansätze immer das ursprüngliche Keton in hohen Konzentrationen detektiert werden konnte, was auf eine Debromierung des Eduktes bei den gegebenen Reaktionsbedingungen deutete. Da solches beim 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)-2-(pyridin-4-yl)ethanon nicht beobachtet werden konnte, ist ein Einfluss der elektronischen Verhältnisse des Pyridin-Rests naheliegend.

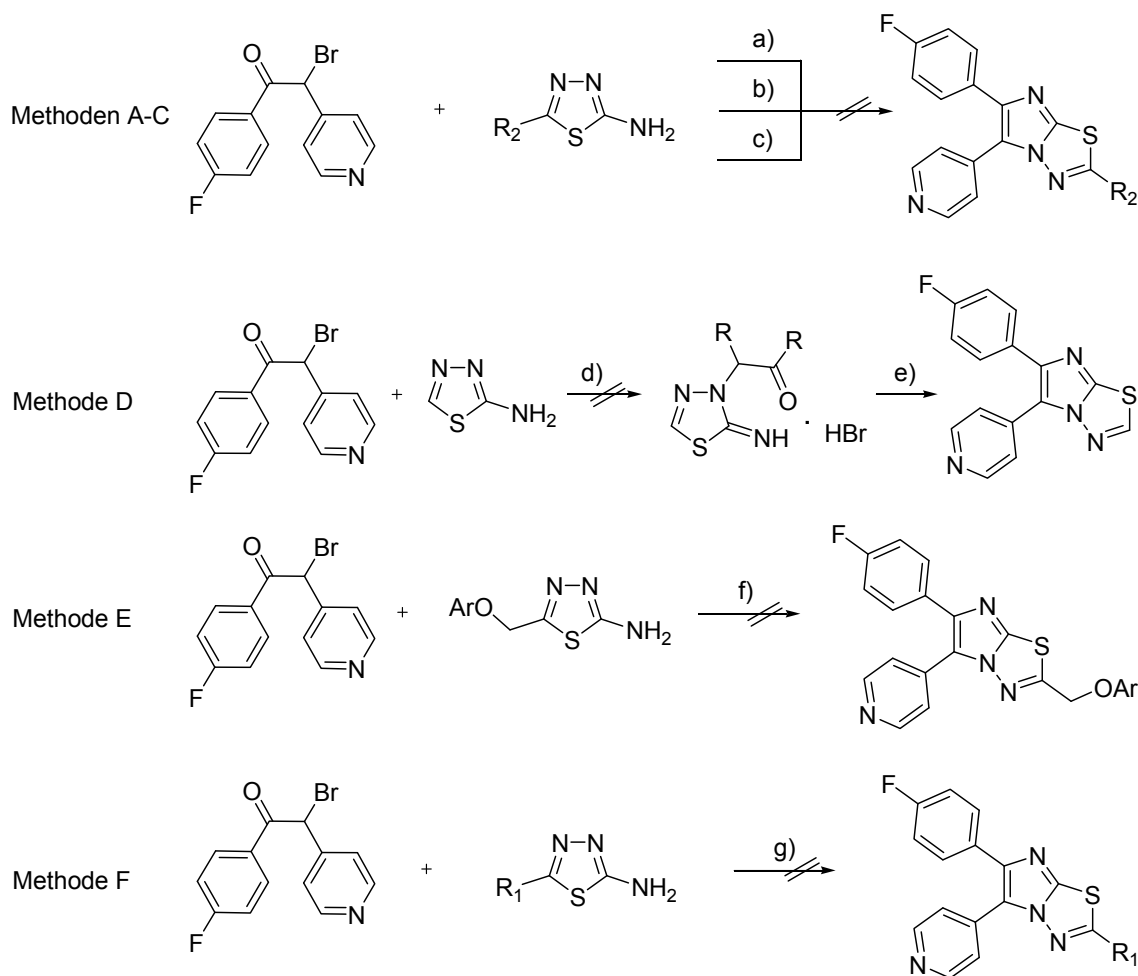


Abbildung 4.23 Nachverfolgte Synthesestrategien, die im Falle des gewünschten Substitutionsmusters nicht zum gewünschten Produkt führten; a) EtOH oder Isoamylalkohol, 18 h Rückfluss, Neutralisation mit NaHCO_3 , Extraktion mit Diethylether;^[133-134] b) DMF, 3 h, 150 °C, Neutralisation mit 20%iger NaOH;^[135] c) Aceton, 7 h, °C, H_2O , 100 °C, 14 h, Neutralisation;^[136] d) Aceton, 2-3 h, Rückfluss; e) 2 N HCl, 1 h, Rückfluss, Fällung mit 15%igem NH_3 ;^[137] f) EtOH, MW;^[139] g) [bmim]PF₆, NEt_3 oder Na_2CO_3 , 1 h, 60 °C.^[140]

Nach diesen nur wenig erfolgversprechenden Ergebnissen wurde die Synthesestrategie verworfen, über die Kondensation von 2-Aminothiodiazolen mit dem in α -Stellung bromierten 1-(4-Fluorphenyl)-2-(pyridin-4-yl)ethanon zur Zielverbindung zu gelangen.

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die erfolgreich durchgeführte Kondensation von 4-Amino-4H-1,2,4-triazol-3-thiolen mit verschiedenen Carbonsäure-Derivaten auf das Syntheseproblem entsprechend zu übertragen, wie in Abbildung 4.24 veranschaulicht.

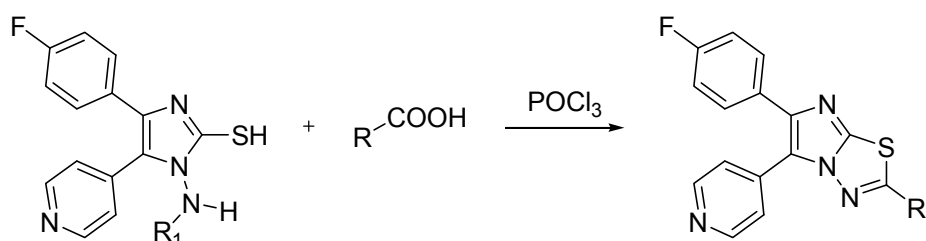


Abbildung 4.24 Theoretische Übertragung der Synthesestrategie zur Darstellung von 3,6-disubstituierten Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazolen auf die 2-substituierten 6-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole.

Hierzu bot die von Lagoja *et al.*^[141] veröffentlichte Methode eine erste Möglichkeit zur Realisierung des Vorhabens. Von den Autoren wird die Synthese von *N*-Aminoimidazolin-2-thionen durch die Umsetzung von Hydrazinen mit α -Bromketonen und Kaliumthiocyanat in Aceton bei 30 °C beschrieben (Abbildung 4.25).

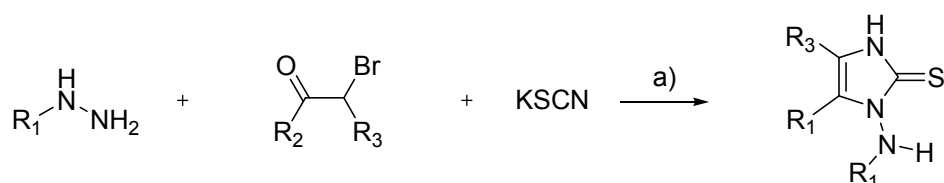


Abbildung 4.25 Synthesestrategie nach Lagoja *et al.*^[141]; a) Aceton, 4 h, 30 °C

Um das für die in Abbildung 4.24 dargestellte Synthese benötigte Edukt zu erhalten, wurde die Reaktionsvorschrift entsprechend abgewandelt. Vorteil an dieser Reaktion ist, dass als Edukt das stabile α -Bromketonen (R₂ = Pyridin, R₃ = 4-Fluorophenyl) einzusetzen ist. Zunächst wurde versucht, Hydrazin mit dem Reaktionspartner umzusetzen, wie in Abbildung 4.26 gezeigt. Nachdem das nicht zum gewünschten Ziel führte, fiel die Wahl auf Acetohydrazid. Dadurch sollte nach Entfernung des Acetylrests durch Erwärmen unter Rückfluss in konzentrierter Salzsäure und Ethanol das 1-Amino-4-(4-fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)-1*H*-imidazole-2-thiol synthetisiert werden.^[142] Da kein Produkt gewonnen werden konnte, wurde versucht, Verbindung (72) direkt in Phosphorylchlorid zu einem Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol umzusetzen. Auch der Ansatz schlug fehl, obwohl ein Ablauf der Reaktion nach einem Vilsmeier-Mechanismus zu erwarten gewesen wäre und die entsprechende Umsetzung von der Verbindung mit einer Methylgruppe an Stelle des Pyridin-Rests von Pyl *et al.*^[143] beschrieben worden ist (Abbildung 4.26).

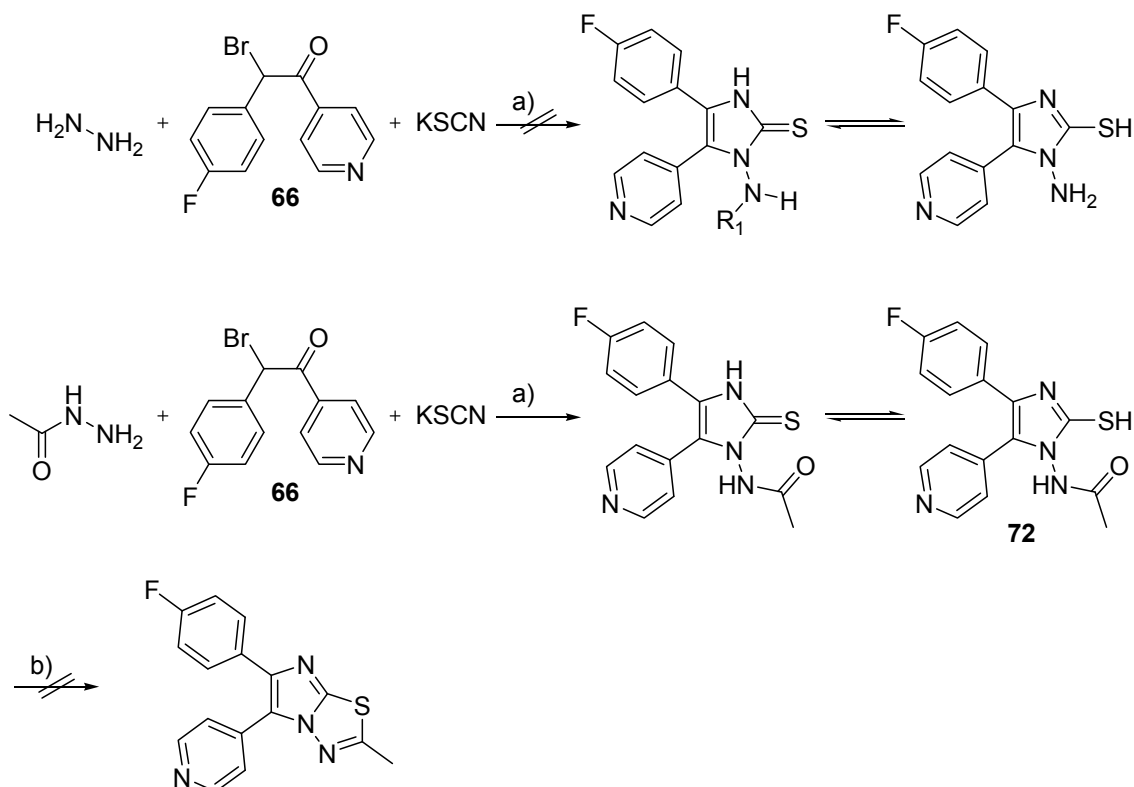


Abbildung 4.26 Synthesestrategie modifiziert nach Lagoja *et al.*^[141] a) Aceton, 4h, 30 °C; b) POCl_3 , 20 min, Rückfluss.^[143]

Eine optionale Herangehensweise war die Aminierung des 4-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)-1*H*-imidazol-2(3*H*)-thion bzw. 4-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)-1*H*-imidazol-2-thiol. Zum einen wurde dies nach einer Vorschrift von Parlanti *et al.*^[144] mit *o*-(4-Chlorobenzoyl)hydroxylamin versucht, zum anderen mit *o*-(Diphenylphosphinyl)hydroxylamin und *o*-(Sulfonsäure)hydroxylamin^[145-148] mit der Modellverbindung von Wagner^[149] (siehe Abbildung 4.27). Bei der gewählten Struktur befindet sich eine Methylgruppe am Schwefelatom, um Nebenreaktionen mit der Thiolgruppe zu verhindern. Bei weiterer Verfolgung der Synthesestrategie hätte eine geeignete Schutzgruppe für die Thiofunktion entwickelt werden müssen. Da in allen Fällen kein aminiertes Produkt nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Gedanke nicht weiter verfolgt.

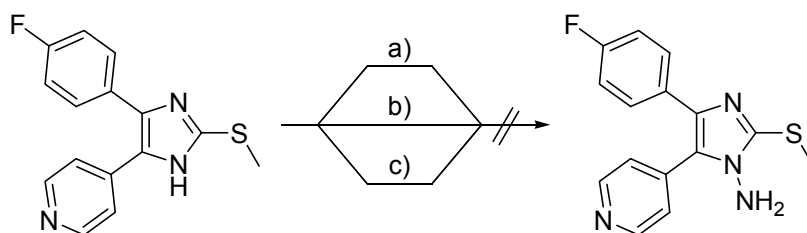


Abbildung 4.27 Durchgeführte Aminierungsreaktionen am 4-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)-1H-imidazol-2(3H)-thion bzw. 4-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)-1H-imidazol-2-thiol; a) *O*-Benzoylhydroxylamin; b) *o*-(Diphenylphosphinyl)-hydroxylamin; c) *o*-(Sulfonsäure)hydroxylamin.^[144-148]

Da die Synthese von in Position 2 variierten 6-(4-Fluorophenyl)-[2,1-*b*][1,3,4] thiadiazolen ohne Probleme in guten Ausbeuten gelang (Abbildung 4.28), wurde erwogen, den Pyridinyl-Substituenten erst zuletzt in das Molekül einzuführen.

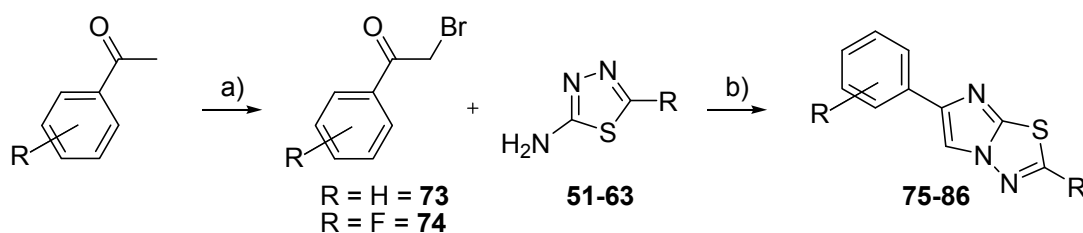
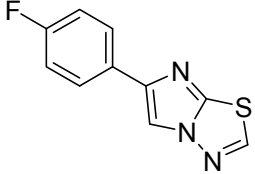
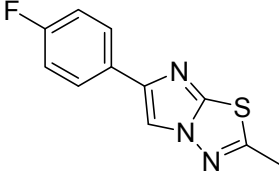
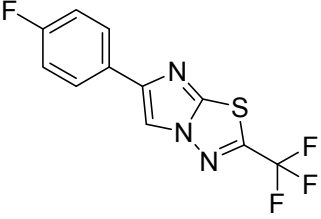
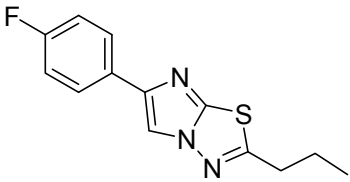
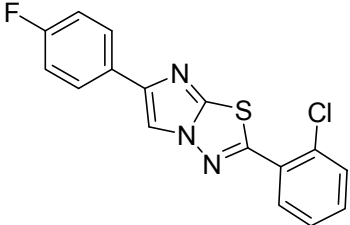
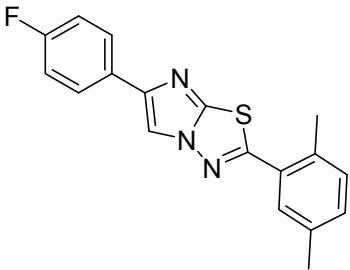


Abbildung 4.28 Darstellung von in Position 2 variierten 6-(4-Fluorophenyl)-[2,1-*b*][1,3,4] thiadiazolen; a) DCM, RT, Br₂; b) EtOH, Rückfluss, 14 h.

Nach Bromierung des 4-Fluoracetophenons bzw. Acetophenons wurde wie oben beschrieben, die α -Halogenketone mit den entsprechenden 2-Aminothiadiazolen in Ethanol unter Reflux zur Reaktion gebracht. Ein Vorteil dieser Reaktion ist, dass es nach Abkühlen der Ansatzmischung auf Raumtemperatur zur Auskristallisierung kommt und die Produkte am Ende durch Filtration abgetrennt werden können. Zu beachten ist, dass die in der Vorschrift als Lösungsmittel angegebene Menge an Ethanol nicht überschritten wird, auch wenn das Auflösen der Edukte trotz Erwärmung bis zu einer halben Stunde benötigt, was aber bei der langen Reaktionszeit keinen Einfluss auf die Ausbeuten hat. Die auffallend geringen Ausbeuten bei den Verbindungen (**75**) und (**76**) sind auf die thermische Instabilität der als Edukte eingesetzten 1,3,4-Thiadiazole zurückzuführen, die in der Literatur beschrieben ist.^[140]

Tabelle 4.5 Synthetisierte in Position 2 variabel substituierte (4-Fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl) imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
75		42
76		45
77		49
78		81
79		81
80		79

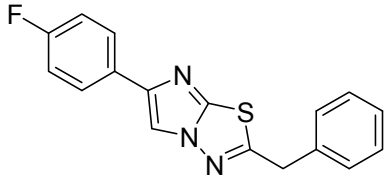
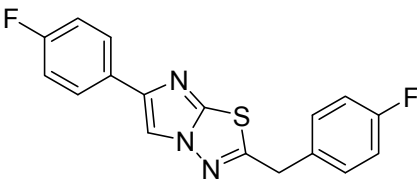
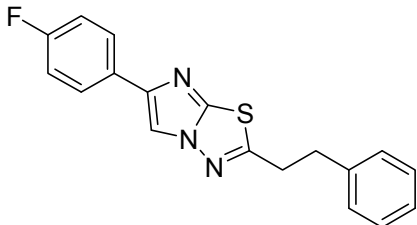
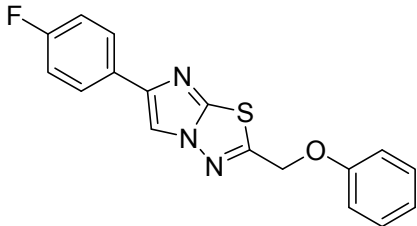
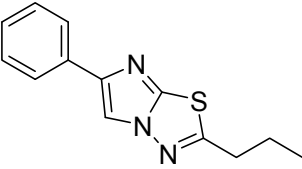
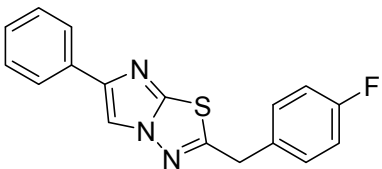
Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
81		76
82		77
83		79
84		79
85		76
86		78

Tabelle 4.5 gibt eine Übersicht über die synthetisierten Derivate, die relativ einfach durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zu identifizieren sind, da das in Position 5 vorhandene Wasserstoffatom eine charakteristische Verschiebung bei 8-9 ppm aufweist. Dass die Ringschlussreaktion stattgefunden hat, ist daraus leicht ersichtlich (siehe Abbildung 4.29).

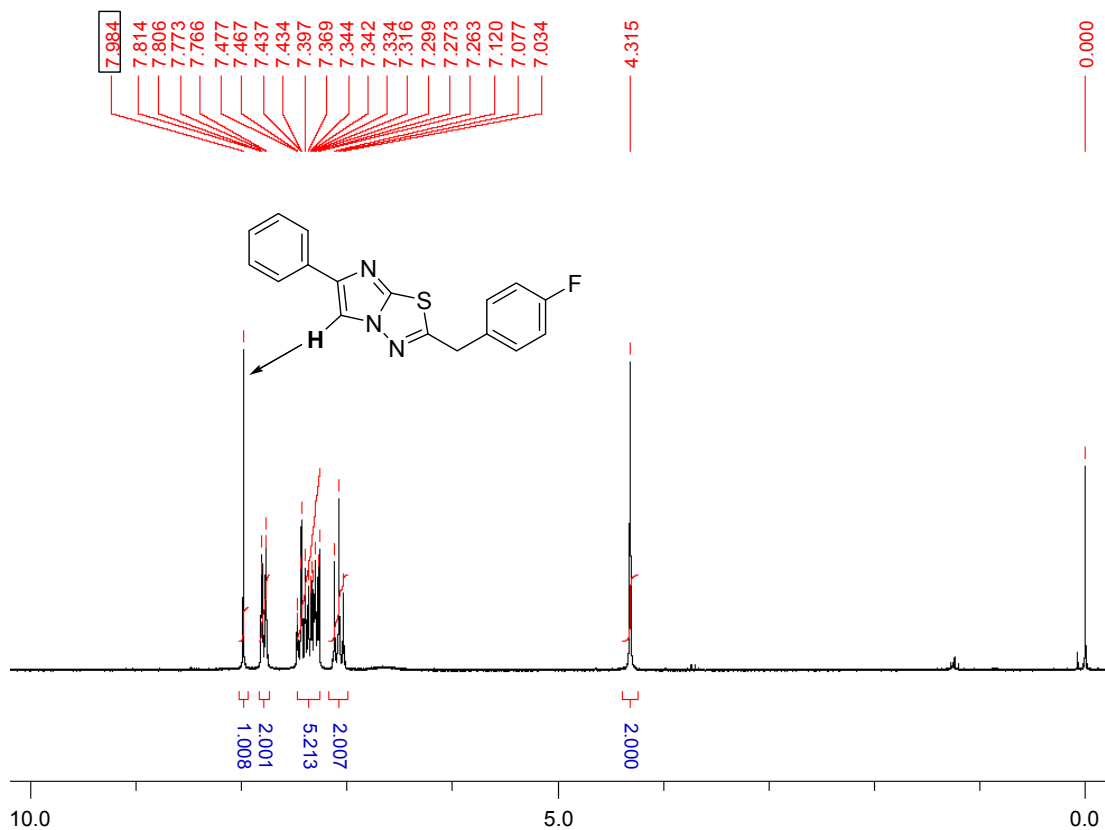


Abbildung 4.29 ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung (86)

Nach dem in Abbildung 4.30 gezeigten Syntheseweg wurde die Synthese der in Position 2 unterschiedlich substituierten 5-(4-Fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole angestrebt.

Abgewandelt nach Lantos *et al.* ^[150] beschreibt diese Synthesevorschrift die Umsetzung von 6-Aryl-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]thiazolen mit Pyridin und Ethylchloroformiat in Dichlormethan und anschließender Umsetzung der intermediär gebildeten Verbindungen durch Erwärmen auf Rückfluss in Mesitylen mit elementarem Schwefel zu den entsprechenden pyridinylsubstituierten Imidazothiazole. Die Übertragung dieser Methode auf die Umsetzung von in Position 2 variabel substituierten (4-Fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazolen zu Verbindungen, die in Position 5 einen Pyridinyl-Rest tragen, gelang und erbrachte das gewünschte Substitutionsmuster. Die Reaktion verläuft wie bei Lantos *et al.* ^[150] über die beschriebene Zwischenstufe.

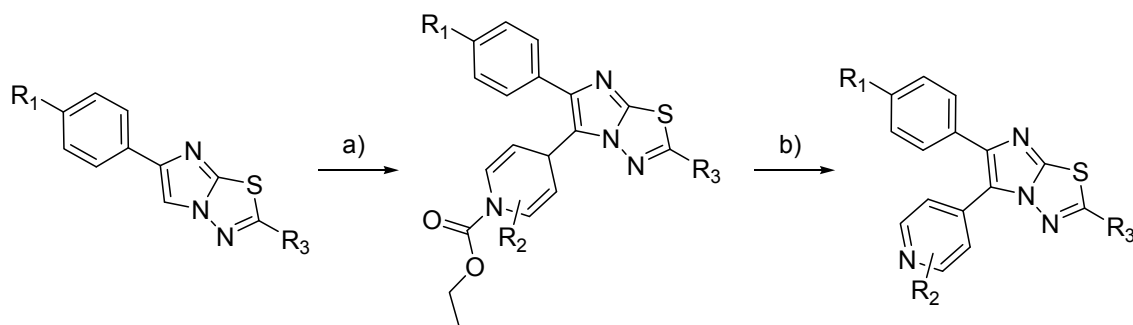
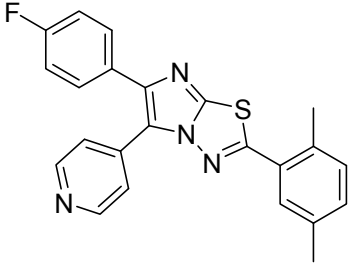
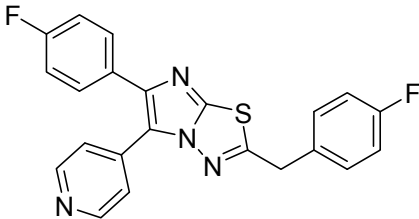
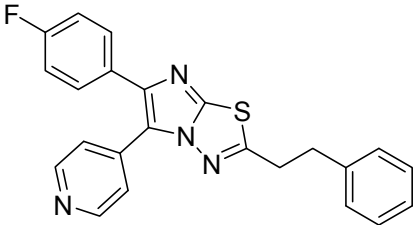
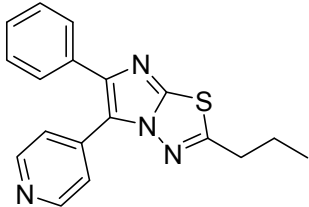
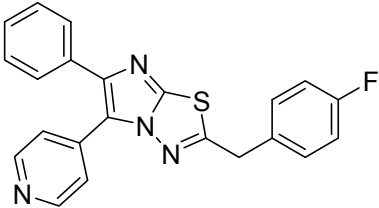


Abbildung 4.30 Syntheschema, abgewandelt nach Lantos et al.^[150]; a) DCM, Pyridin, Ethylchloroformiat, 0 °C, auf RT über Nacht; b) Mesitylen, elementarer Schwefel, Rückfluss, 2 h.

Bei einigen Verbindungen wurde zu Beginn der Reaktion ein größerer Überschuss Pyridin eingesetzt, um die Löslichkeit der Edukte zu verbessern und so eine höhere Ausbeute zu erzielen. Zusätzlich wurde die Aufarbeitung des Intermediates verifiziert. Bildeten sich keine Kristalle, die durch Filtration abgetrennt werden konnten, wurde durch Waschen der Dichlormethanphase mit Wasser überschüssiges Ethylchloroformiat und ein großer Anteil des im Überschuss eingesetzten Pyridins entfernt. Anschließend wurde die organische Phase weitmöglichst eingengt, mit der entsprechenden Menge Mesitylen und Schwefel versetzt und für zwei Stunden auf 165 °C erhitzt, während verbliebenes Pyridin gleichzeitig abdestilliert wurde. Da die Produkte nicht in Mesitylen auskristallisierten und auch nicht durch den Zusatz von anderen Lösungsmitteln sauber durch Kristallisation gewonnen werden konnten, wurde das Verfahren dahingehend modifiziert, dass die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erfolgte. Tabelle 4.6 gibt die auf diese Weise synthetisierten Verbindungen wieder.

Tabelle 4.6 Übersicht der synthetisierten, in Position 2 variabel substituierten, 6-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
88		51

Verb.	Struktur	Ausbeute [%]
89		59
90		58
91		59
92		57
93		56

Die dargestellten Substanzen wurden nach dem in Abschnitt 5 beschriebenen Verfahren auf ihre biologische Aktivität gegen die p38 α MAP Kinase geprüft.

5 Biologische Testung und Ergebnisse

5.1 Der p38 MAP Kinase Enzym-Essay

Die synthetisierten, potentiellen Inhibitoren sind in einem Enzym-Essay auf die Hemmung des α -Subtyps getestet worden, um ihre Aktivität gegen die p38 MAP Kinase beurteilen zu können. Als Referenz diente in diesem Testmodell der gängige Standard, das ATP-kompetitive Pyridinylimidazol SB 203580. Die so erhaltenen Testdaten sollten zudem Aufschluss über die Struktur-Wirkungsbeziehungen geben, um durch anschließende, gezielte synthetische Modifikationen der Strukturen eine besser Bindung an der p38 MAP Kinase zu ermöglichen und damit eine erhöhte Hemmwirkung gegenüber dem Enzym zu erreichen. Abschließend wurden die biologischen Testdaten herangezogen, um den möglichen Bindemodus der beiden Substanzklassen zu ermitteln. Der angewandte p38 MAP Kinase-Essay ist ein von Forrer *et al.*^[151] entwickeltes Testsystem. Das Verfahren wurde im Arbeitskreis durch Greim und Thuma^[82] modifiziert und optimiert. Mit Hilfe dieses ELISA (enzym-linked immunosorbent assay) kann die Hemmwirkung der zu testenden Substanz auf die Enzym-Aktivität untersucht werden. Bestimmt wird hierzu die Phosphorylierung des natürlichen Substrats ATF-2 durch die p38 MAP Kinase in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Hemmstoffs.

5.1.1 Durchführung des p38 α Enzym-Essays

Im ersten Arbeitsschritt wird eine Polystyrol-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Immulon® 4 HBX Platte) mit ATF-2 beschichtet, indem in jede Vertiefung 50 μ l ATF-2 Lösung (10 μ g/ml) pipettiert und für 90 Minuten inkubiert wird. Sobald die Platte mit

Wasser gründlich gewaschen worden ist, erfolgt die Blockierung freigebliebener Bindungskapazitäten mit einer Pufferlösung, die bovines Serum-Albumin (BSA) enthält, um unspezifische Bindungen der später eingesetzten Antikörper zu verhindern (Abbildung 5.1-a). Anschließend wird für die Kinase-Reaktion eine auf Eis hergestellte Lösung aus ATP, aktivierter p38 α MAP Kinase und der Testsubstanzen in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Die zu testenden Inhibitoren werden zuvor in einer Konzentration von 10^{-2} M in DMSO gelöst. Aus diesen Stammlösungen werden Verdünnungsreihen hergestellt, von denen pro Substanz vier Konzentrationen (im Regelfall 10^{-5} bis 10^{-8} M) als Testlösungen verwendet werden. In diesem Schritt konkurrieren das ATP und der potentielle Inhibitor um die Bindung in der ATP Bindungstasche des Enzyms. Erfolgt eine Bindung von ATP, wird ATF-2 an den Aminosäuren Thr⁶⁹ und Thr⁷¹ durch die aktive p38 MAP Kinase phosphoryliert. Bindet dagegen die zu testende Substanz, wird die Phosphorylierung des Substrates verhindert. Je höher also die hemmende Wirkung der getesteten Verbindung ist, umso stärker wird die Phosphorylierung unterbunden. Nach der Kinase-Reaktion werden erneut freie Bindungskapazitäten durch Pufferlösung besetzt (Abbildung 5.1-b). Zur quantitativen Erfassung des Phosphorylungsgrades von ATF-2 wird eine zweistufige Antigen-Antikörper-Reaktion durchgeführt. Zunächst wird der primäre, ein aus einem Kaninchen isolierter phospho-ATF-2-Thr^{69/71}-Antikörper, zugegeben, der spezifisch an das zweifach phosphorylierte ATF-2 bindet (Abbildung 5.1-c). Anschließend dient dieser als Antigen für den sekundären Antikörper (anti-rabbit IgG, AP-linked Antikörper), der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist. Die durch die Phosphatase katalysierte Reaktion ermöglicht die Visualisierung des Ergebnisses, indem sie das am Ende hinzugegebene 4-Nitrophenolphosphat (NPP) dephosphoryliert (Abbildung 5.1-d).

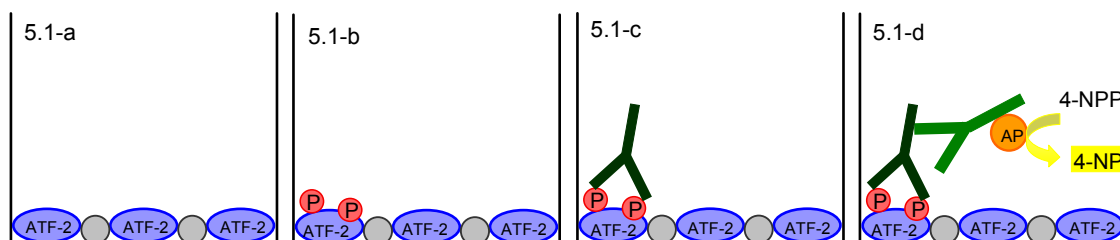


Abbildung 5.1 Vereinfachte schematische Darstellung des p38 α Enzym-Essays; P = Phosphat, AP = Alkalische Phosphatase, 4-NPP = 4-Nitrophenolphosphat, 4-NP = 4-Nitrophenol

Das dabei entstehende Chromophor 4-Nitrophenolat kann durch Absorptionsmessung bei 405 nm erfasst werden (Abbildung 5.2).

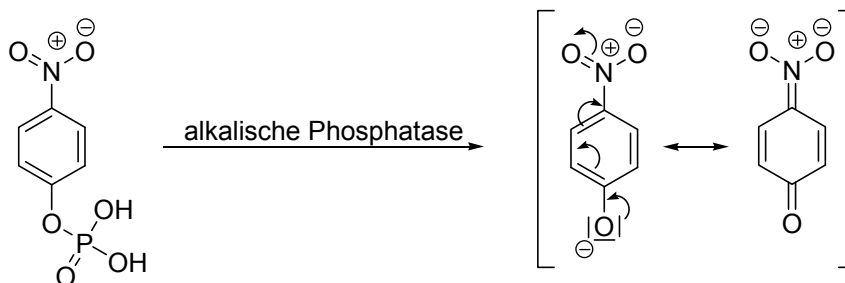


Abbildung 5.2 Dephosphorylierung von 4-NPP zum Chromophor

So kann die in jeder Vertiefung vorhandene Menge an sekundärem Antikörper und damit die Menge an primärem Antikörper, die folglich mit der p38 MAP Kinase-Aktivität korreliert, bestimmt werden. Zur Ermittlung der p38 MAP Kinase-Aktivität werden zusätzlich zu den Testlösungen noch Stimulationskontrollen vermessen, die nur ATP und die aktivierte p38 MAP Kinase, jedoch keinen Hemmstoff enthalten. Die Absorption der Reaktionslösung verhält sich in diesem Bereich proportional zum phosphorylierten ATF-2 Gehalt der Lösung.

5.1.2 Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung erfolgt, indem die relative Hemmwirkung der zu untersuchenden Substanz nach der folgenden Gleichung berechnet wurde:

$$\text{relative Hemmung [\%]} = 100 - \left(\frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Stimulationskontrolle}}} \right) \cdot 100$$

Ein Maß für die Hemmung stellt der IC_{50} -Wert dar, d.h. die Konzentration des Hemmstoffes, bei der ein Enzym nur noch 50% seiner Aktivität zeigt. Dieser Wert kann graphisch oder rechnerisch durch Interpolation der halblogarithmischen Darstellung Hemmung [%] über Konzentration [$\log c$] auf 50% ermittelt werden.

Die Verbindungsgerade der Messpunkte schneidet das 50%-Hemmungsniveau bei der dem IC_{50} -Wert entsprechenden Konzentration (Abbildung 5.3).

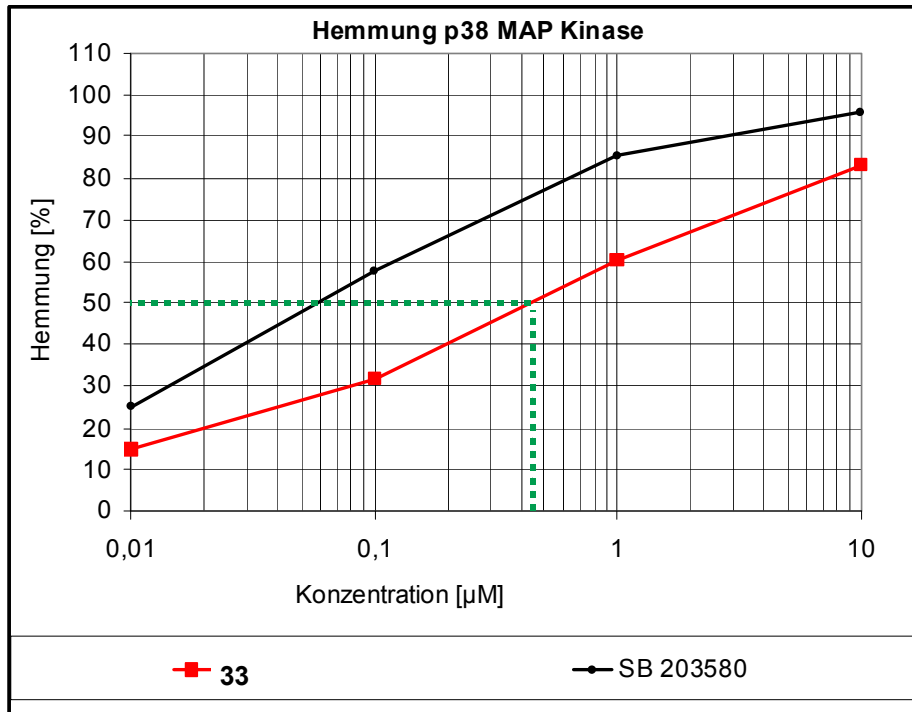


Abbildung 5.3 Graphische Ermittlung eines IC_{50} -Wertes am Beispiel der Substanz (33)

5.2 Biologische Evaluation der 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole

5.2.1 Biologische Testergebnisse der Triazolothiadiazole

Alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole sind mit ihren dazugehörigen Testwerten in Tabelle 5.1 aufgeführt. Die Daten lassen die folgenden, in Abbildung 5.4 veranschaulichten Schlussfolgerungen bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehungen zu:

Für die inhibitorische Aktivität ist ein sperriger, lipophiler Rest in Position 3 essentiell. Das Einfügen eines *ortho*-substituierten Phenyl-Rests ergibt eine signifikante und stetige Erhöhung der Hemmwirkung, was darauf hindeutet, dass eine Konformation mit steilerem Torsionswinkel eine bessere Wechselwirkung mit dem Enzym ermöglicht. Die strukturelle Variation zu einer *meta*- bzw. *para*-Substitution des Phenyl-Rests oder die Einführung von zwei Resten in *ortho*- und *para*-Position ergibt eine Verminderung der inhibitorischen Aktivität. Das gleiche Resultat liefert die Ausdehnung von einem Phenyl- zu einem Benzyl-Substituenten. In gleicher Weise führt auch ein Austausch des carbozyklischen Restes durch einen Furyl-Rest oder andere fünf- und sechsgliedrige Heterozyklen jeweils zu einem starken Wirkverlust. Gründe hierfür können der geringere Raumbedarf der fünfgliedrigen Ringsysteme und eine schwächere Wechselwirkung der π -Elektronensysteme von Heterozyklen mit dem Enzym im Vergleich mit dem π -Elektronensystem eines Phenyl-Rests sein. Ebenso findet durch einfache Heterozyklen keine Steigerung des Torsionswinkels statt.

Die Substitution in Position 6 hat ebenso einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Substanzen. Verschiebt man den *para*-Methoxysubstituent in die *meta*-Position, resultiert daraus eine deutliche Verminderung der Aktivität, wohingegen das Entfernen des *para*-Methoxysubstituenten von Verbindung (**29**) zu einer geringen Steigerung der Hemmwirkung führt. Der Austausch der Etherbrücke durch das äquivalente Alkan hat kaum einen Einfluss auf die Aktivität, wie aus dem Vergleich der Testwerte der Strukturen (**30**) und (**31**) ersichtlich ist. Daraus kann geschlossen werden, dass der Sauerstoff in dieser Position keine Wechselwirkung mit dem Enzym eingeht. Indessen wirkt sich

eine Verkürzung des *para*-Methoxyphenoxymethyl-Substituenten zu einer *para*-Methoxy-benzyl-Gruppierung vorteilhaft auf die Aktivität der Verbindungen aus. Die völlige Umkehrung des Substitutionsmusters, wie Verbindungen (**29**) und (**49**) zeigen, hat eine Halbierung der inhibitorischen Hemmwerte zur Folge.

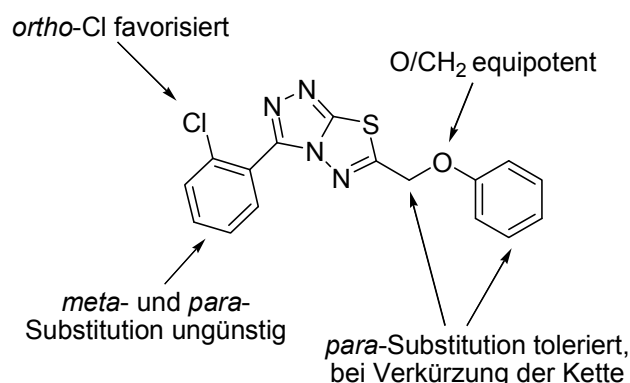
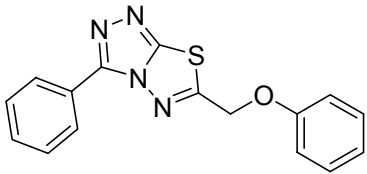
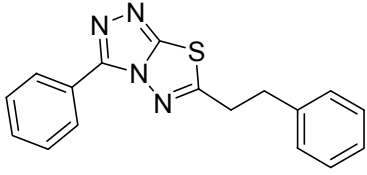
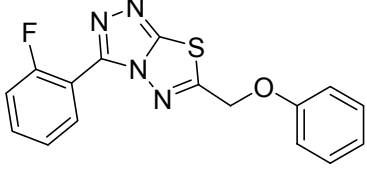
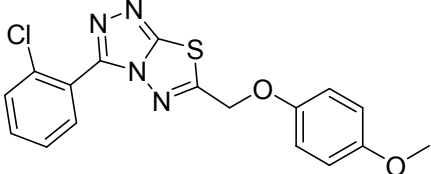
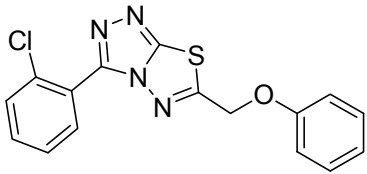
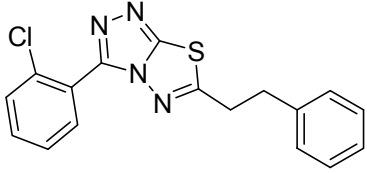
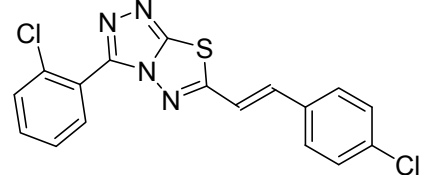


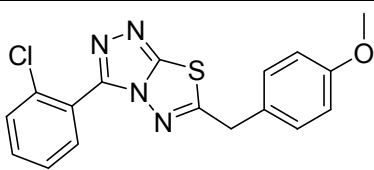
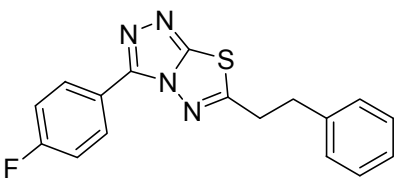
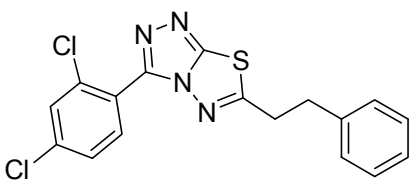
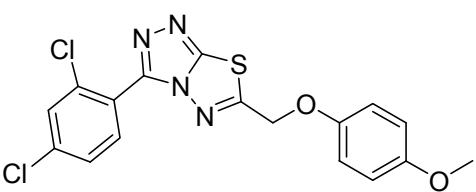
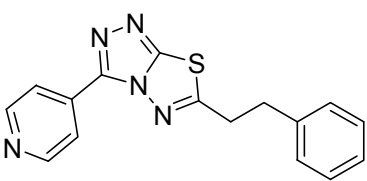
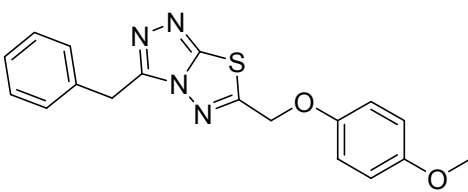
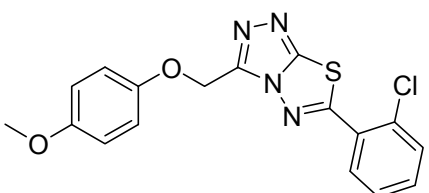
Abbildung 5.4 Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Thiadiazol-Serie

Durch vielfache Variation des Restes in Position 6 unter Beibehaltung des in Position 3 am besten fungierenden 2-Chlorphenyl-Rests konnte eine Verbesserung des Hemmwertes auf 83% Hemmung ($IC_{50} = 0.44 \mu M$) gegenüber 64% Hemmung ($IC_{50} = 3.88 \mu M$) der Ausgangsverbindung erzielt werden (siehe Tabelle 5.1).

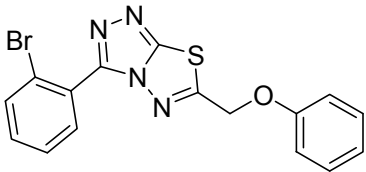
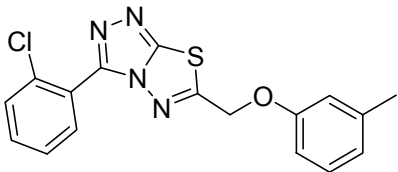
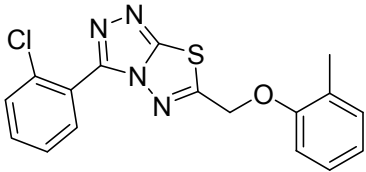
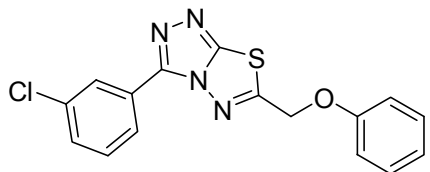
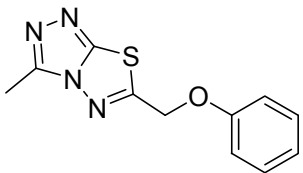
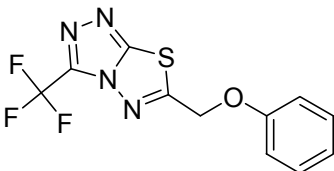
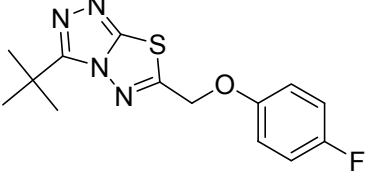
Tabelle 5.1 Testergebnisse der 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazol[3,4-b][1,3,4]thiadiazole; ^{a)} Hemmung bei $10 \mu M$; ^{b)} Anzahl der Bestimmung = 3; * bei Specs kommerziell erworbene Verbindungen.

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC_{50} [μM] \pm SEM ^b
21		11 \pm 4.62	-

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM ^b
22		39 \pm 3.04	-
23		27 \pm 2.05	-
24		73 \pm 1.83	3.08 \pm 0.47
29 = p7		64 \pm 3.30	3.88 \pm 0.89
30		76 \pm 0.73	0.79 \pm 0.06
31		72 \pm 1.05	2.55 \pm 0.17
32		58 \pm 1.10	5.40 \pm 0.79

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM ^b
33		83 \pm 0.64	0.44 \pm 0.17
36		32 \pm 3.77	-
37		45 \pm 2.25	-
39		31 \pm 2.40	-
46		26 \pm 1.52	-
47		37 \pm 1.96	-
49		34 \pm 0.38	-

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM ^b
p25*		32 \pm 3.02	-
p26*		36 \pm 2.02	-
p27*		33 \pm 0.84	-
p28*		12 \pm 4.01	-
p29*		79 \pm 0.82	0.65 \pm 0.12
p30*		77 \pm 3.08	0.74 \pm 0.01

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM ^b
p31*		80 \pm 4.66	1.24 \pm 0.35
p32*		76 \pm 0.66	1.98 \pm 0.16
p33*		65 \pm 5.36	3.51 \pm 1.13
p34*		3 \pm 1.88	-
p35*		18 \pm 1.58	-
p36*		16 \pm 2.10	-
p37*		53 \pm 1.85	4.71 \pm 0.40

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM ^b
p38*		31 \pm 2.01	-
p39*		22 \pm 4.06	-
p40*		61 \pm 0.52	3.98 \pm 1.27
p41*		21 \pm 2.06	-
p42*		24 \pm 2.99	-
p43*		31 \pm 1.31	-
p44*		30 \pm 4.00	-

5.2.2 Möglicher Bindemodus der Triazolothiadiazole

Auf den gewonnenen Informationen aufbauend, wurde mit dem Programm FieldAlign ein Vergleich der Thiadiazol-Analoga mit den ursprünglichen Suchanfragen durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurden die drei Suchanfragen als ein einzelnes Referenzmolekül in FieldAlign geladen. Im Anschluss daran wurde jedes Mitglied dieser Serie in jeder Konformation mit der kombinierten Referenz abgeglichen. Die Verwendung einer multiplen Molekülreferenz ergab in diesem Fall eine bessere Beschreibung der Anforderungen des Proteins an die bindenden Liganden. Erfreulicherweise wurde durch diese Experimente nur ein einziger, übereinstimmender Bindemodus vorgeschlagen (siehe Abbildung 5.5). Dass der Substituent R_1 mit der hydrophoben Tasche dicht bei Met¹⁰⁹ und Gly¹¹⁰ interagiert, die Stickstoffe der Triazol-Teilstruktur mit der „Hinge“-Region in Wechselwirkung stehen und der Substituent R_2 die „Selektivitätstasche“ belegt, zeigt das durch Modelling-Studien erstellte Bild. Der Bindemodus steht im Einklang mit den beobachteten Struktur-Wirkungsbeziehungen.

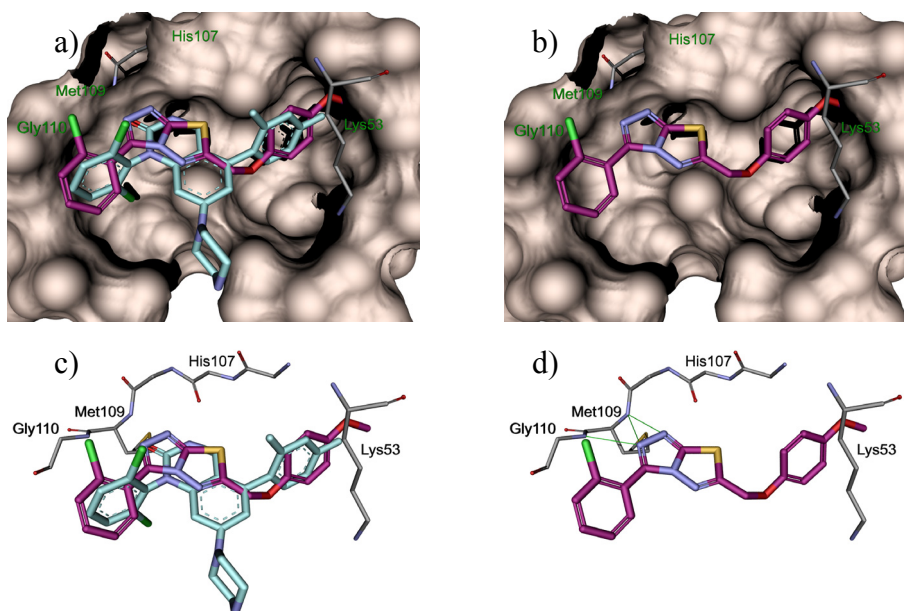


Abbildung 5.5 Möglicher Bindemodus der Thiadiazol-Reihe; a),c) Überlagerung des Liganden aus 1m7q (blaugrün) und Verbindung p7 (=29) (magenta); b), d) Alleinige Darstellung von Verbindung p7 (=29) mit den ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen; a) und b) zeigen die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche des Proteins 1m7q berechnet mit DS Visualizer 2.0 unter Verwendung eines Probenradius von 1.4.^[9]

5.3 Biologische Evaluation der 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole

5.3.1 Biologische Testergebnisse der Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole

Ebenso wie die 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole wurden die im Rahmen der Arbeit synthetisierten 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole sowie einige Vorstufen der Endverbindungen auf ihre Hemmung der isolierten p38 MAP Kinase getestet. Im Vergleich zu den 3,6-disubstituierten [1,2,4] Triazolo [3,4-*b*][1,3,4]thiadiazolen konnten bei dieser Substanzserie bessere inhibitorische Aktivitäten festgestellt werden.

Wie erwartet spielt bei dieser Substanzreihe insbesondere das Substitutionsmuster der Reste in Position 5 und 6 eine entscheidende Rolle. Die Verbindungen, die in Position 6 des Ringgerüsts ein Pyridin-Rest und in Position 5 ein 4-Fluorphenyl-Rest tragen, stellen gute Inhibitoren der p38 MAP Kinase dar. Die Strukturen (**67-69**) mit einem umgekehrten Substitutionsmuster an diesen beiden Positionen zeigen insgesamt eine wesentlich schwächere biologische Aktivität gegenüber der p38 MAP Kinase (siehe Tabelle 5.2). Man kann daraus schließen, dass das Molekül nicht in der Lage ist, durch eine Drehung um 180° die gleichen Wechselwirkungen zum Enzym aufzubauen wie ihre strukturisomeren Verbindungen (**88-91**). Wird die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Pyridin-Rest und der Aminosäure durch den Verbleib des Ethylchloroformiat-Rests unmöglich, ist dies erwartungsgemäß mit einem drastischen Verlust an inhibitorischer Aktivität verbunden, wie der Testwert der Vorstufe (**87**) zeigt. Ein ähnliches Testergebnis hat demzufolge auch die Vorstufe (**78**), bei der der Pyridin-Rest vollständig fehlt. Als ungünstig erwies sich ebenso ein Phenyl-Rest in Position 5 anstelle des 4-Fluorphenyl-Rests, wie beim Vergleich der Hemmwerte von den Verbindungen (**92**) und (**93**) ersichtlich wird. Eine Einführung voluminöser Substituenten in Position 2 in Form von einem 4-Fluorbenzyl- oder Phenethyl-Rest führte zu weniger wirksamen Verbindungen.

Die Einführung eines Propyl-Restes ergab den besten Hemmstoff der p38 innerhalb der Serie der 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole, mit einem IC₅₀-Wert von 0.16 μM (**88**) im Vergleich zu SK&F 86002, mit einem IC₅₀-Wert von 0.26 μM^[57] (siehe Tabelle 5.3).

Tabelle 5.2 Biologische Testergebnisse der 5-(4-fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole Reihe; ^{a)} Hemmung bei 10 μM; ^{b)} Anzahl der Bestimmung = 3.

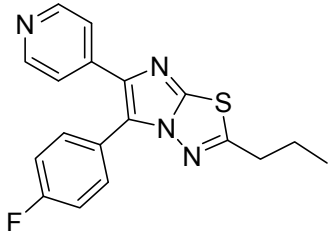
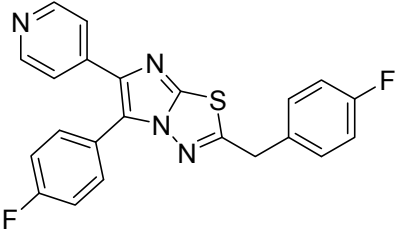
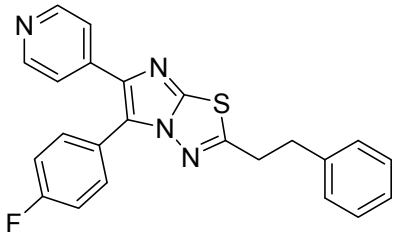
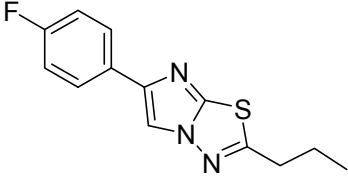
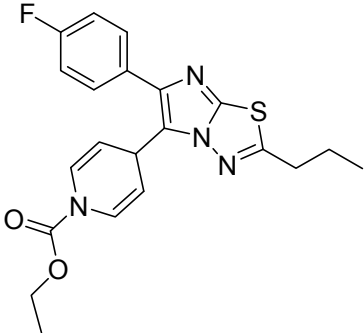
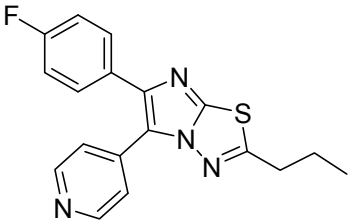
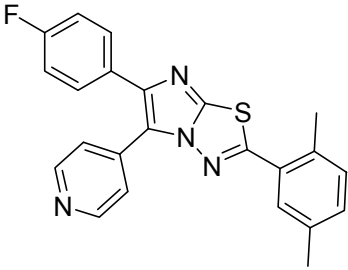
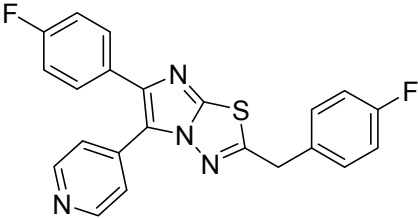
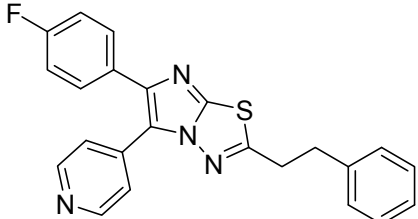
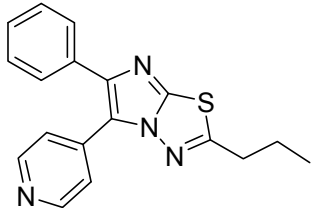
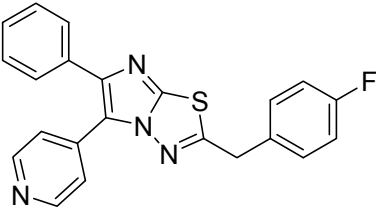
Verb.	Struktur	%±SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μM] ±SEM ^b
67		58±1.92	5.77±0.64
68		54±1.94	7.92±1.16
69		39±4.15	-

Tabelle 5.3 Testergebnisse der 6-(4-Fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole und einiger Vorstufen dieser Serie; ^{a)} Hemmung bei 10 μM ; ^{b)} Anzahl der Bestimmung=3.

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μM] \pm SEM ^b
78		13 \pm 3.26	-
87		37 \pm 3.56	-
88		93 \pm 0.44	0.16 \pm 0.06
89		85 \pm 0.74	0.26 \pm 0.03

Verb.	Struktur	% \pm SEM ^{a,b}	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM ^b
90		91 \pm 0.34	0.47 \pm 0.04
91		83 \pm 1.07	0.71 \pm 0.07
92		69 \pm 0.31	3.11 \pm 0.37
93		39 \pm 4.15	-

5.3.2 Möglicher Bindemodus der 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole

Das durch Modelling-Studien entstandene Bild (Abbildung 5.6) zeigt, dass die 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole, die in Position 6 den 4-Fluorophenyl-Rest und in Position 5 den Pyridin-4-yl-Rest tragen, einen ähnlichen Bindemodus wie SB 203580 einnehmen. Die Annahme, von der zu Beginn der Arbeit mit dieser Substanzklasse ausgegangen wurde, ließ sich anhand der biologischen Testergebnisse bestätigen. Der in Abbildung 5.6 gezeigte Bindemodus steht im Einklang mit den beobachteten Struktur-Wirkungsbeziehungen und ordnet die Verbindungsklasse den „Teardrop-Binders“ zu.

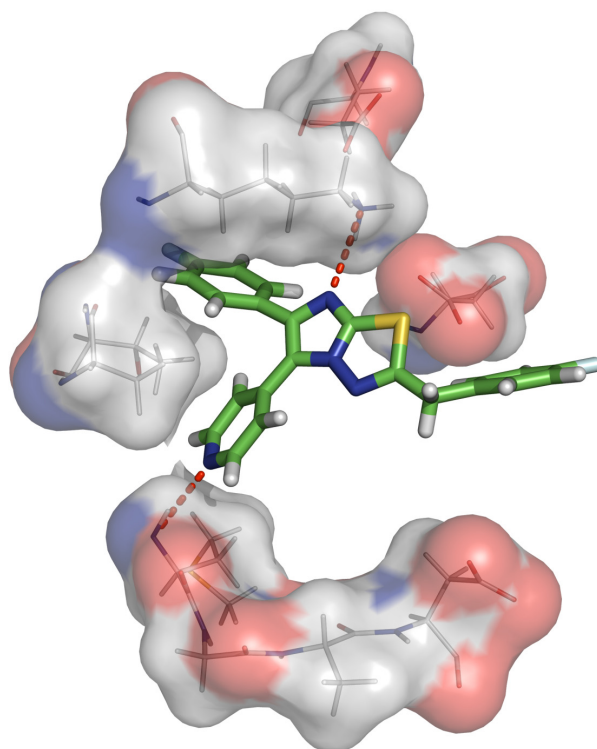


Abbildung 5.6 *Wahrscheinlicher Bindemodus der 2,5,6-trisubstituierten Imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole; PDB 1ywr, Docking-Programm: Induced-Fit Docking Toll Schrödinger.^[152]*

Die Hydrophobe Region I oder „Selektivitätstasche“ der ATP-Bindungsstelle wird analog zu der SB 203580 durch den 4-Fluorphenylring belegt. Wie auch schon in vorange-

gangenen Arbeiten demonstriert, zeigt sich dieser Rest als der günstigste Substituent in dieser Position. Der weitere heterozyklische, aromatische Ring, wie bei SB 203580 ein 4-Pyridin-Ring, bildet die wichtige Wasserstoffbrückenbindung zum Amid-NH des Met¹⁰⁹ in der Gelenkregion aus, was durch die Testergebnisse der beiden Vorstufen (**78**) und (**87**) belegt werden kann. Ein zusätzlicher Interaktionspunkt ist die Wasserstoffbrücke zum Lys⁵³ über das Stickstoffatom der Triazol-Teilstruktur. Eine genaue Aussage über die mögliche Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen mit Tyr³⁵ durch eine Phenyl-Struktur im Rest an Position 2 lässt sich nicht treffen, da dies theoretisch denkbar, aber durch die biologischen Daten nicht zu bestätigen ist. Eine schematische Darstellung der Wechselwirkungen des Enzyms mit der Verbindung (**90**) ist in Abbildung 5.7 gegeben.

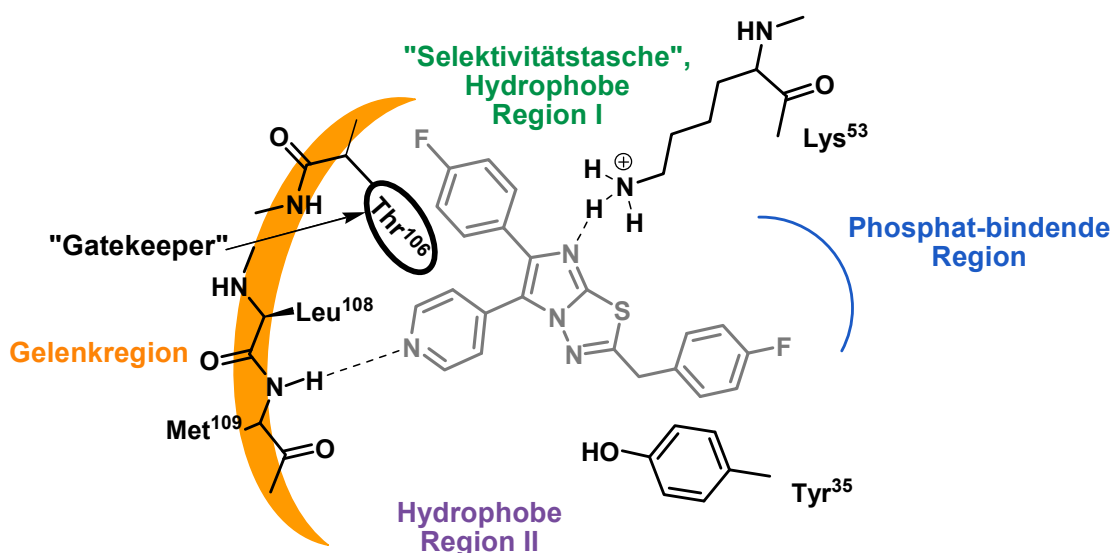


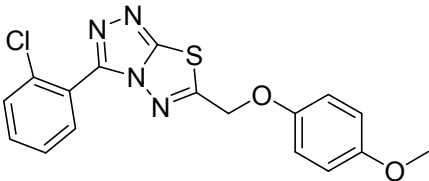
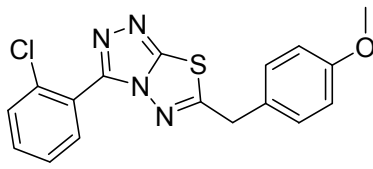
Abbildung 5.7 Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkungen des Enzyms mit der Verbindung (**90**)

6 Zusammenfassung

6.1 Substanzklasse der Triazolothiadiazole

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte durch die technische Entwicklung einer neuen Methode die Synthese von verschiedenen 1,2,4-Triazolen stark vereinfacht werden. Die Verlagerung der Reaktion in ein Kugelrohr machte eine effektive Umsetzung der kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffe möglich und die entsprechenden Derivate gut zugänglich. Die verschieden substituierten 1,2,4-Triazole wurden für die Synthese von 3,6-disubstituierten Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazolen genutzt. Die Aufgabe, eine Synthesestrategie zu entwickeln, die ermöglicht, die Grundstruktur in den Positionen 3 und 6 gezielt zu variieren, konnte gelöst werden. Die aus den erhaltenen biologischen Testdaten abgeleiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen und der durch Modelling-Studien ermittelte Bindemodus der Substanzklasse stehen im Einklang miteinander. Die Aktivität gegenüber der p38 MAP Kinase konnte von $IC_{50} = 3.88 \mu\text{M}$ der Ausgangsverbindung auf $IC_{50} = 0.44 \mu\text{M}$ der Verbindung (**33**) gesteigert werden (siehe Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1 Vergleich der Hemmwirkung der Ausgangsverbindung (**29** = **p7**) gegenüber dem weiterentwickelten Molekül (**33**); ^{a)} Hemmung bei 10 μM ; ^{b)} Anzahl der Bestimmung = 3.

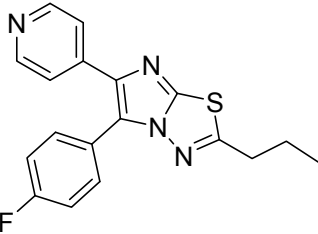
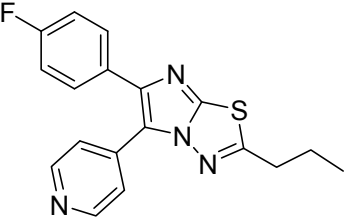
Verb.	Struktur	IC ₅₀ [μM] $\pm\text{SEM}^b$
29 = p7		3.88 \pm 0.89
33		0.44 \pm 0.17

6.2 Substanzklasse der Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole

Der auf dem Liganden-basierten Wirkstoffdesign aufbauende zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Modifikation der oben genannten Grundstruktur der 3,6-disubstituierten Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazolen. Um das Pharmakophor von SK&F 86002 oder SB 203580 (siehe Abschnitt 1.2.3) in Form eines Pyridin-Rests in direkter Nachbarschaft zu einem 4-Fluorphenylsubstituenten realisieren zu können, wurde der [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-Kern gegen den Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol-Grundkörper ausgetauscht. Das eröffnete die Möglichkeit einer weiteren Substitution in Position 6. Nachdem die Verbindungen, die in der Position 5 des Ringgerüsts ein Pyridin-Rest und in der Position 6 ein 4-Fluorphenyl-Rest tragen, durch Erwärmen auf Rückfluss in Ethanol dargestellt werden konnten, erwies sich die Synthese der Konstitutionisomere als schwierig. Nach vielen fehlgeschlagenen Reaktionsansätzen konnte das Ziel durch die Abwandlung der Methode von Lantos *et al.*^[150] erreicht werden. Die biologischen Testdaten bestätigten die Vermutung, dass die Anordnung der Reste in den Positionen 5 und 6 eine entscheidende Rolle spielt, denn die nun realisierte Umkehrung

des Substitutionsmusters erbrachte eine deutliche Verbesserung der Hemmwirkung im Vergleich mit den Konstitutionisomeren (siehe Tabelle 6.2). Der Bindemodus, der für diesen Strukturtyp ermittelt wurde, ist dem von SB ähnlich. Der 4-Pyridin-Ring bildet die wichtige Wasserstoffbrückenbindung zum Amid-NH des Met¹⁰⁹ in der Gelenkregion aus, der 4-Fluorphenylring belegt die Hydrophobe Region I und das Stickstoffatom der Triazol-Teilstruktur bildet eine Wasserstoffbrücke zum Lys⁵³ als zusätzlichen Interaktionspunkt.

Tabelle 6.2 Vergleich der Hemmwirkung der beiden Konstitutionsisomere der Imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol-Reihe; ^{a)} Hemmung bei 10 μM ; ^{b)} Anzahl der Bestimmung=3; SK&F 86002: $\text{IC}_{50} = 0.26 \mu\text{M}$ ^[57]

Verb.	Struktur	IC_{50} [μM] $\pm\text{SEM}^b$
67		5.77 \pm 0.64
88		0.16 \pm 0.06

Das Ziel der Arbeit, die Entwicklung neuer Leitstrukturen mit Hilfe von Struktur- bzw. Liganden-basiertem Wirkstoffdesign, konnte erreicht werden. Die neu gewonnenen Erkenntnisse sowohl im synthetischen Bereich als auch auf dem Gebiet der Struktur-Wirkungsbeziehungen können als neue Ausgangspunkte für weiterführende Forschungsarbeiten genutzt werden, um in der Zukunft potente Inhibitoren der p38 MAP Kinase zu entwickeln.

7 Experimenteller Teil

7.1 Material und Methoden

Die analytische Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurde mit Hilfe der folgenden Messgeräte und Methoden durchgeführt:

NMR-Spektroskopie: Bruker Advance 200 (200 MHz)

¹H-NMR: Bruker Spectrospin AC 200 (200 MHz); $\delta = 7.26$ ppm für CDCl₃, 2.50 für (CD₃)₂SO;

Beschreibung der Signal durch:

s = Singulet, d = Duplet, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplet, dd = Duplet vom Duplet; Spektren wurden gemäß 1. Ordnung ausgewertet; Kopplungskonstanten sind absolute Werte.

¹³C-NMR: Bruker Spectrospin AC 200 (75 MHz); $\delta = 77.16$ ppm für CDCl₃, $\delta = 39.43$ für (CD₃)₂SO; Signalstruktur durch DEPT untersucht und beschrieben wie folgt: + = primäres oder tertiäres C-Atom (positives Signal), - = sekundäres C-Atom (negatives Signal), * = quartäres C-Atom (kein Signal).

IR-Spektroskopie: Perkin-Elmer Spectrum One (ATR Technik)

Angabe der Intensität der Peaks durch Buchstaben

(w = weak, m = medium, s = strong)

GC/MS (EI): Hewlett Packard HP 6890 Series GC-System

Kapillarsäule: HP-5MS: 5 % Phenyl-Methyl-Siloxan; Länge: 30 m

Durchmesser: 250 µm, Filmdicke: 0.25 µm

Trägergas: Helium 6.0

Flussrate: 1.2 ml/min

Injektortemperatur: 250 °C

Hewlett Packard HP 5973 Mass Selektiv Detektor

Detektion: Spannung 70 eV, Temperatur der Ionenquelle 230 °C, Massenscan 50-550

GC-MS-Methode 1

Zeit [min]	Gradient [°C/min]	Endtemperatur [°C]	Haltezeit [min]
0	-	100	2
2	25.00	190	2
7.6	25.00	250	2
12	25.00	290	2
15.6	0.00	290	2
18.0	-	300	2.40

GC-MS-Methode 2

Zeit [min]	Gradient [°C/min]	Endtemperatur [°C]	Haltezeit [min]
0	-	100	2
2	25.00	190	2
7.6	25.00	250	2
12	25.00	290	2
15.6	0.00	290	2
18.0	-	300	2.40

LC/MS (ESI): HPLC-System Finnigan Mat Spectra System mit DCM1000 (Degaser), P4000 (Pumpe), AS 3000 (Autosampler) und UV6000LP (DAD), gekoppelt an Thermo Finnigan LCQ Duo Ion Trap

Säule: Grom SIL 120 ODS-5 ST, 3 µm, 150 x 2 mm

Wellenlängenbereich Detektor: 200-400 nm

UV-Detektion bei konstanter Wellenlänge: 270 nm

Gradient:

LC-MS-Methode			
Zeit [min]	Fluss in [ml/min]	ACN/H ₂ O10:90	ACN
		+ 0.1% Ameisen- säure	+ 0.1% Ameisensäure
0.0	0.2	100	0
4.0	0.2	5	95
15.0	0.2	5	95
16.0	0.2	100	0
20.0	0.2	100	0

MS-Parameter mode	Wert ESI (positive/negative)
Sheath Gas Rate (arb)	60
Aux Gas Flow Rate (arb)	5
Spray Voltage (kV)	4.5
Capillary Temp. (°C)	250
Capillary Voltage (V)	38.0
Tube Lens Offset (V)	10
Multipole 1 Offset (V)	-3.25
Lens Voltage (V)	-16.0
Multipole 2 Offset (V)	-5.0
Multipole RF Amplitude (Vpp)	400

Massenspektrometrische Messungen EI und FAB:

Tripelquadrupol-Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT, Bremen (heute Thermo Scientific):

EI-Modus: Ionenquellentemperatur 200 °C

Verdampfungstemperatur 30-300 °C

Ionisierungsenergie 70 eV

FAB-Modus: Ionenquellentemperatur 200 °C

Ionisierungsmedium Xenon-Atome

Matrix 3-Nitrobenzylalkohol (NBA) oder Glycerin (Protonierungsmittel p-Toluolsulfonsäure (p-TSS))

Sektorfeld-Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT, Bremen (heute Thermo Scientific):

HRMS (EI-Modus):	Ionenquellentemperatur	200 °C
	Beschleunigungsspannung	4.7 kV
	Verdampfungstemperatur	30-300 °C
	Ionisierungsenergie	70 eV

HPLC: Merck Hitachi L-6200A Intelligent Pump

Merck Hitachi AS-2000A Autosampler

Merck Hitachi L-4250 UV-VIS Detector

Kapillarsäule: ZOBRAx Eclipse XDB-C8 4.6x150mm 5 µl

Flussrate: 1.0 ml/min

Injektionsvolumen: 2 µl

HPLC-Methode

Zeit [min]	Methanol [%]	KH ₂ PO ₄ -Puffer (0.01 M, pH = 2.3) [%]
0	60	40
8	15	85
13	15	85
14	60	40
16	60	40

Schmelzpunkte: Büchi Melting Point B-545, Schmelzpunkte sind unkorrigiert

DC-Platten: SiO₂ 60 F₂₅₄-Alufolien, Firma Merck

Detektion erfolgt bei Tageslicht und im UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm bzw. 366 nm.

Docking: Glide, Version 4.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007

7.2 Benötigte Lösungen

p38 Kinase-Assay:

Natrium *ortho*-Vanadat-Stammlösung (100 mM)

Magnesiumchlorid-Stammlösung (1 M)

Tris-Salzsäure-Stammlösung, pH 7.5 (1 M)

BSA-Stammlösung (10 mg/ml)

DTT-Stammlösung (1 M)

RATP-Stammlösung (100 mM)

β -Glycerolphosphat-Stammlösung (1 M)

Tris-Salzsäure-buffered-saline (TBS) (50 mM)

Blocking Buffer

4-Nitrophenylphosphat-Substratlösung (4-NPP)

Kinase Buffer

7.3 Arbeitsvorschriften

Die Ausbeuten der Synthesen sind als Prozent (%) bezogen auf 100% zu verstehen, Lösungsmittelgemische als Volumen/Volumen zu verstehen. Lösungsmittel, Reagenzien und Chemikalien wurden bei Acros, Aldrich, Fluka und VWR bezogen.

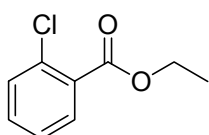
7.3.1 Synthesevorschriften für die in Kapitel 4.1 behandelten Verbindungen

7.3.1.1 Allgemeine Methode A für die dargestellten Ester

Zur Veresterung der Säuregruppierung wird die angegebene Menge Carbonsäure in einem Kolben in Ethanol bei Raumtemperatur gelöst, mit konzentrierter Schwefelsäure

versetzt und für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Der überschüssige Alkohol wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und wiederholt mit 20%-iger Natronlauge gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden nach dem Trocknen über Na_2SO_4 im Vakuum eingeeengt.

2-Chlorbenzoesäureethylester (1):

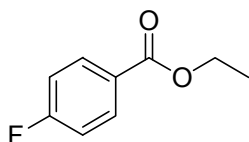


Nach der **Allgemeinen Methode A** werden 15.66 g (0.1 mol) 2-Chlorbenzoesäure und 15 ml konz. Schwefelsäure in 150 ml Ethanol für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach der Aufarbeitung erhält man die gewünschte Verbindung in Form einer leicht gelblichen Flüssigkeit. $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}_2$ ($M_r = 184.62$)

Ausbeute: 91%

GC-MS (ED): 5.23 min, m/z [%] = 184.0 ($[\text{M}^*]$, 17), 158.0 (12), 156.0 (35), 141.0 (33), 140.0 (11), 139.0 (100), 113.00 (10), 111.0 (32), 75.0 (21). (Methode 1)

4-Fluorbenzoesäureethylester (2):

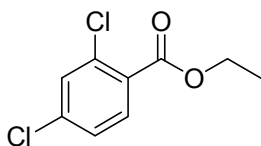


Nach der **Allgemeinen Methode A** werden 14.10 g (0.1 mol) 4-Fluorbenzoesäure und 14 ml konz. Schwefelsäure in 140 ml Ethanol für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach der Aufarbeitung erhält man die gewünschte Verbindung in Form einer leicht gelblichen Flüssigkeit. $\text{C}_9\text{H}_9\text{FO}_2$ ($M_r = 168.16$)

Ausbeute: 94%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.29 (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, $-\text{CH}_3$), 4.26 (q, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 7.25-7.35 (m, 2H, 3', 5'-H), 7.95-8.02 (m, 2H, 2', 6'-H).

GC-MS (ED): 3.72 min, m/z [%] = 168.0 ($[\text{M}^*]$, 15), 140.0 (32), 123.0 (100), 95.0 (33), 75.0 (12). (Methode 1)

2,4-Dichlorbenzoesäureethylester (3):

Nach der **Allgemeinen Methode A** werden 19.10 g (0.1 mol) 2,4-Dichlorbenzoesäure und 19 ml konz. Schwefelsäure in 190 ml Ethanol für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach der Aufarbeitung erhält man die gewünschte Verbindung in Form einer leicht gelblichen Flüssigkeit.

$C_9H_8Cl_2O_2$ ($M_r = 219.06$)

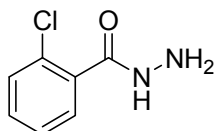
Ausbeute: 93%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.39 (t, 3H, $^3J = 7.2$ Hz, -CH₃), 4.38 (q, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, -CH₂-), 7.30 (dd, 1 H, $J = 8.4, 2.0$ Hz), 7.47 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H), 7.80 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz).

MS (EI): 218.0 ($[M^*]$, 30), 183.0 (18), 173.0 (100).

7.3.1.2 Allgemeine Methode B für die dargestellten Hydrazide

Zur Synthese der Hydrazide werden die nach Allgemeiner Methode A hergestellten Ester mit Hydrazin-Monohydrat in Methanol für 5 h auf Siedetemperatur erwärmt. Der überschüssige Alkohol wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand wird mit Wasser verdünnt bis das Produkt zu kristallisieren beginnt. Nach der Filtration erhält man die gewünschte Verbindung.^[170]

2-Chlorbenzohydrazid (4):

Nach der **Allgemeinen Methode B** werden 13.82 g (0.08 mol) 2-Chlorbenzoesäureethylester und 6.7 ml (0.11 mol) Hydrazin-Monohydrat in 20 ml Methanol für 5 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach der Aufarbeitung erhält man die gewünschte Verbindung in Form von weißen Kristallen.

$C_7H_7ClN_2O$ ($M_r = 170.60$)

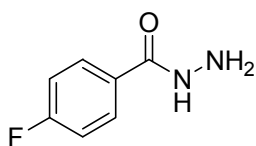
Ausbeute: 91%

LC-MS (EI+): 5.08 min, m/z [%] = 171.0 ([M⁺] 100).

IR: [cm⁻¹] = 3277 (m), 1643(m), 1592 (m), 1513 (m), 1332 (m), 1124 (w), 1053 (w), 1034 (w), 951 (m), 752 (m), 717 (m), 648 (s), 462 (m), 436 (w).

Schmelzpunkt: 119.3 °C

4-Fluorobenzohydrazid (5):



Nach der **Allgemeinen Methode B** werden 13.45 g (0.08 mol) 4-Fluorbenzoesäureethylester und 6.7 ml (0.11 mol) Hydrazin-Monohydrat in 20 ml Methanol für 5 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach der Aufarbeitung erhält man die gewünschte Verbindung in Form leicht gelblicher Kristalle.

C₇H₇FN₂O (M_r = 154.14)

Ausbeute: 87%

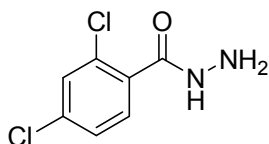
¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 4.25 (s, 2H, -NH₂), 7.10-7.17 (m, 2H, 2', 6'-H), 8.06-8.12 (m, 2H, 3', 5'-H), 9.37 (s, 1H, -NH-).

MS (EI+): 155 ([M⁺])

IR: [cm⁻¹] = 3190 (w), 2981 (w), 1605 (w), 1557 (w), 1505 (m), 1343 (m), 1156 (w), 1118 (w), 986 (w), 887 (w), 840 (m), 808 (w), 718 (m), 672 (m), 627 (m), 603 (m), 522 (m), 471 (m), 405 (m).

Schmelzpunkt: 122.6 °C

2,4-Dichlorobenzohydrazid (6):



Nach der **Allgemeinen Methode B** werden 17.53 g (0.08 mol) 2,4-Chlorbenzoesäureethylester und 6.7 ml (0.11 mol) Hydrazin-Monohydrat in 20 ml Methanol für 5 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach der Aufarbeitung erhält man die gewünschte Verbindung in Form leicht gelblicher Kristalle.

C₇H₆Cl₂N₂O (M_r = 205.04)

Ausbeute: 98%

LC-MS (EI+): 5.69 min, m/z [%] = 205.0 (100), 207.0 (68).

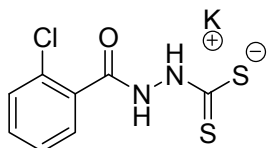
IR: [cm^{-1}] = 2980 (s), 1592 (w), 1505 (w), 1463 (w), 1393 (w), 1343 (w), 1240 (w), 1155 (w), 1053 (w), 955 (m), 890 (w), 832 (w), 807 (w), 716 (w), 649 (m), 602 (w), 522 (w), 470 (w), 404 (w).

Schmelzpunkt: 173.2 °C

7.3.1.3 Allgemeine Methode C für die dargestellten Hydrazincarbodithioate

Zur Synthese der Hydrazincarbodithioate wird Carbondisulfid (3.3 ml, 0.055 mol) tropfenweise zu einer Lösung des Hydrazides (0.036 mol) und KOH (3 g, 0.055 mol) in absolutem Ethanol (70 ml) gegeben. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur für 16 h gerührt, dann mit einem Eisbad gekühlt und mit Diethylether verdünnt. Der ausfallende Feststoff wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Die auf diese Weise in fast quantitativen Ausbeuten erhaltenen Salze werden ohne weitere Aufreinigung direkt umgesetzt.^[106]

Kalium 2-(2-Chlorbenzoyl)hydrazincarbodithioat (7):



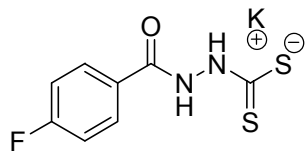
Nach der **Allgemeinen Methode C** werden 2.05 g (0.012 mol) 2-Chlorbenzohydrazid, 1.0 g (0.018 mol) KOH und 1.1 ml (0.018 mol) CS_2 in 25 ml EtOH umgesetzt.

Nach Filtration erhält man die gewünschte Verbindung in Form eines schwach gelben Salzes, das ohne weitere Aufarbeitung direkt umgesetzt wird.

$\text{C}_8\text{H}_6\text{ClKN}_2\text{OS}_2$ ($M_r = 284.83$)

Ausbeute: 93%

IR: [cm^{-1}] = 3402 (w), 1570 (w), 1475 (w), 1405 (m), 1393 (m), 1375 (s), 1149 (m), 1125 (m), 1089 (m), 1038 (m), 1008 (m), 943 (m), 755 (m), 736 (m), 720 (s), 653 (m), 543 (m), 454 (m).

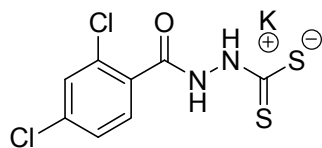
Kalium 2-(4-Fluorobenzoyl)hydrazincarbodithioat (8):

Nach der **Allgemeinen Methode C** werden 8.33 g (0.054 mol) 4-Fluorobenzohydrazid, 4.5 g (0.0825 mol) KOH und 4.95 ml (0.0825 mol) CS₂ in 105 ml EtOH umgesetzt. Nach Filtration erhält man die gewünschte Verbindung in Form ein gelbes Salz, das ohne weitere Aufarbeitung direkt umgesetzt wird.

C₈H₆FKN₂OS₂ (M_r = 268.37)

Ausbeute: 90%

Schmelzpunkt: 122.6 °C

Kalium 2-(2,4-Dichlorobenzoyl)hydrazincarbodithioat (9):

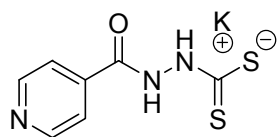
Nach der **Allgemeinen Methode C** werden 11.07 g (0.054 mol) 2,4-Dichlorobenzohydrazid, 4.5 g (0.0825 mol) KOH und 4.95 ml (0.0825 mol) CS₂ in 105 ml EtOH umgesetzt. Nach Filtration erhält man die gewünschte Verbindung in Form ein gelbes Salz, das ohne weitere Aufarbeitung direkt umgesetzt wird.

C₈H₅Cl₂KN₂OS₂ (M_r = 319.27)

Ausbeute: 94%

IR: [cm⁻¹] = 1476 (m), 1374 (s), 1149 (m), 1089 (m), 1039 (m), 1007 (m), 943 (m), 761 (m), 721 (m), 653 (m), 543 (m).

Schmelzpunkt: 173.2 °C

Kalium 2-Isonicotinoylhydrazincarbodithioat (10):

Nach der **Allgemeinen Methode C** werden 8.33 g (0.054 mol) Isonicotinhydrazid, 4.5 g (0.0825 mol) KOH und 4.95 ml (0.0825 mol) CS₂ in 105 ml

EtOH umgesetzt. Nach Filtration erhält man die gewünschte Verbindung in Form ein gelbes Salz, das ohne weitere Aufarbeitung direkt umgesetzt wird.

$C_7H_6KN_3OS_2$ ($M_r = 251.37$)

Ausbeute: 89%

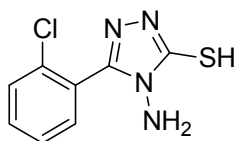
IR: [cm^{-1}] = 3445 (w), 2980 (w), 1646 (m), 1552 (w), 1447 (m), 1405 (m), 1142 (m), 1062 (w), 994 (m), 883 (w), 824 (w), 700 (m), 534 (m).

Schmelzpunkt: 173.2 °C

7.3.1.4 Allgemeine Methode D für die dargestellten in Position 5 substituierten 2-Amino[1,2,4]triazole

Zur Synthese der in Position 5 substituierten 2-Amino[1,2,4]triazole wird Hydrazin-Monohydrat (2.4 mmol) zu einer Suspension des Kalium-Salzes (1.6 mmol) in Wasser (2 ml) gegeben und die Mischung unter rühren für 6 h zum Sieden gebracht. Zum abgekühlten Reaktionsansatz wird Wasser (80 ml) zugefügt und die Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 gebracht. Der sich bildende Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Erhalten wird das gewünschte Produkt.

4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (11):



Nach der **Allgemeinen Methode D** werden 3.6 ml (0.06 mol) Hydrazin-Monohydrat zu einer Suspension von 8.55 g (0.03 mol) des Kalium 2-(2-Chlorobenzoyl)hydrazinecarbonyldithioat in 3 ml Wasser gegeben und die Mischung unter rühren für 6 h zum Sieden gebracht. Nach Aufarbeitung erhält man feine, weiße Kristalle.

$C_8H_7ClN_4S$ ($M_r = 226.69$)

Ausbeute: 77%

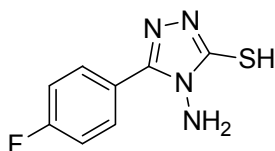
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.59 (s, 2H, $-NH_2$), 7.54-7.68 (m, 4H, 3', 4', 5', 6'-H), 13.99 (s, 1H, $-SH$).

GC-MS (EI): 12.38 min, m/z [%] = 227.0 (12), 226.0 ([M^{*}], 100), 158.0 (11), 154.9 (23), 140.0 (10), 138.0 (30), 102.0 (32), 75.0 (16), 60.0 (19). (Methode 1)

IR: [cm⁻¹] = 3083 (w), 1629 (w), 1556 (w), 1488 (m), 1460 (m), 1327 (m), 1128 (w), 1080 (w), 1047 (m), 997 (m), 938 (s), 766 (s), 733 (m), 759 (s), 602 (s), 534 (w), 463 (m), 417 (w).

Schmelzpunkt: 161.8°C

4-Amino-5-(4-fluorophenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (12):



Nach der **Allgemeinen Methode D** werden 3.6 ml (0.06 mol) Hydrazin-Monohydrat zu einer Suspension von 8.05 g (0.03 mol) des Kalium 2-(4-Fluorobenzoyl)hydrazinecarbonyldithioat in 3 ml Wasser gegeben und die Mischung unter rühren für 6 h zum Sieden gebracht. Nach Aufarbeitung erhält man feine, weiße Kristalle.

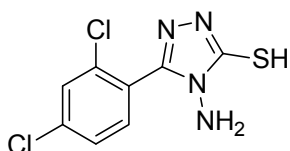
C₈H₇FN₄S (M_r = 210.23)

Ausbeute: 75%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 5.78 (s, 2H, -NH₂), 7.33-8.12 (m, 4H, 2', 3', 5', 6'-H), 13.89 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 11.92 min, m/z [%] = 211.0 (12), 210.0 ([M^{*}] 100), 139.0 (28), 122.0 (28), 121.0 (25), 95.0 (16), 60.0 (11). (Methode 1)

4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (13):



Nach der **Allgemeinen Methode D** werden 3.6 ml (0.06 mol) Hydrazin-Monohydrat zu einer Suspension von 9.58 g (0.03 mol) des Kalium 2-(2,4-Dichlorobenzoyl)hydrazinecarbonyldithioat in 3 ml Wasser gegeben und die Mischung unter rühren für 6 h zum Sieden gebracht. Nach Aufarbeitung erhält man feine, weiße Kristalle.

C₈H₆Cl₂N₄S (M_r = 261.13)

Ausbeute: 71%

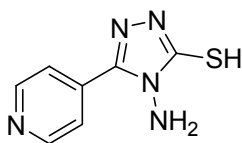
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 5.78 (s, 2H, -NH₂), 7.60-7.88 (m, 3H, 3', 5', 6'-H), 14.06 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 13.55 min, m/z [%] = 263.9 (15), 261.9 (73), 261.0 (13), 259.9 ([M⁺], 100), 190.9 (20), 188.9 (30), 173.9 (18), 172.9 (19), 171.9 (28), 170.9 (27), 136.0 (22), 100.0 (17), 60.0 (20). (Methode 1)

IR: [cm⁻¹] = 3093 (w), 1602 (w), 1563 (w), 1487 (m), 1374 (w), 1334 (m), 1147 (w), 1100 (m), 1045 (w), 949 (m), 864 (m), 843 (m), 813 (s), 734 (m), 624 (m), 569 (w), 525 (w), 479 (m), 436 (w).

Schmelzpunkt: 213.6 °C

4-Amino-5-(pyridin-4-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol (14):



Nach der **Allgemeinen Methode D** werden 3.6 ml (0.06 mol) Hydrazin-Monohydrat zu einer Suspension von 7.54 g (0.03 mol) des Kalium 2-Isonicotinoylhydrazincarbodithioat in 3 ml Wasser gegeben und die Mischung unter rühren für 6 h zum Sieden gebracht. Nach Aufarbeitung erhält man feine, weiße Kristalle.

C₇H₇N₅S (M_r = 193.23)

Ausbeute: 72%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 5.86 (s, 2H, -NH₂), 8.00-8.03 (d, 2H, ³J = 6.13 Hz, 2', 6'-H), 8.74-8.77 (d, 2H, ³J = 6.13 Hz, 3', 5'-H), 13.89 (s, 1H, -SH).

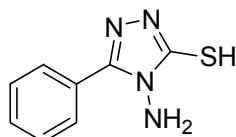
IR: [cm⁻¹] = 3158 (w), 2450 (w), 1812 (w), 1606 (m), 1572 (w), 1517 (w), 1449 (w), 1415 (w), 1315 (m), 1217 (w), 1086 (w), 1064 (w), 1038 (w), 1004 (m), 941 (s), 824 (s), 736 (w), 709 (w), 688 (m), 6001 (s), 528 (m), 498 (m).

Schmelzpunkt: 235.4 °C

7.3.1.5 Allgemeine Methode E für die dargestellten in Position 5 substituierten 2-Amino[1,2,4]triazole

Zur Synthese der in Position 5 substituierten 2-Amino[1,2,4]triazole werden äquimolare Mengen der entsprechenden Säure und Thiocarbohydrazid im Kugelrohr vorsichtig auf Schmelztemperatur (160-180 °C) erhitzt. Die Schmelze wird so lange langsam rotiert bis sie fest wird (20-30 min). Die erstarrte Schmelze wird in Ethanol gelöst und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck auf die Menge eingengt, bei der das Produkt zu kristallisieren beginnt. Nach der Filtration erhält man die gewünschte Verbindung.^[106]

4-Amino-5-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol (15):



Nach der **Allgemeinen Methode E** werden 1.22 g (0.01 mol) Benzoesäure und 1.06 g (0.01 mol) Thiocarbohydrazid vorsichtig auf 160-170 °C erwärmt bis eine Schmelze entsteht. Weitere 25 min erwärmen, danach abkühlen. Aus Ethanol kristallisieren. Man erhält einen schutzig weißen Feststoff.

$C_8H_8N_2S$ ($M_r = 192.24$)

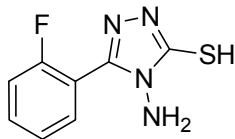
Ausbeute: 61%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.80 (s, 2H, -NH₂), 7.51-8.17 (m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6' - H), 13.93 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 10.16 min, m/z [%] = 193.0 (12), 192.0 ([M*], 100), 121.0 (20), 104.0 (23), 77.0 (18). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3072 (w), 2832 (w), 2666 (w), 2555 (w), 1680 (s), 1601 (m), 1583 (m), 1535 (w), 1497 (w), 1453 (m), 1421 (m), 1324 (m), 1289 (s), 1186 (m), 1128 (m), 1101 (w), 1073 (m), 1027 (m), 1000 (w), 932 (s), 805 (m), 704 (s), 684 (m), 667 (s).

Schmelzpunkt: 227.1 °C

4-Amino-5-(2-fluorophenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (16):

Nach der **Allgemeinen Methode E** werden 1.40 g (0.01 mol) 2-Fluorbenzoesäure und 1.06 g (0.01 mol) Thiocarbonylhydrazid vorsichtig auf 160-170 °C erwärmt bis eine Schmelze entsteht. Weitere 25 min erwärmen, danach abkühlen. Aus Ethanol kristallisieren. Man erhält einen schutzig weißen Feststoff.

$C_8H_7FN_4S$ ($M_r = 210.23$)

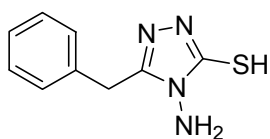
Ausbeute: 58%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.64 (s, 2H, -NH₂), 7.51-7.99 (m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6'-H), 14.03 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 11.93 min, m/z [%] = 211.0 (12), 210.0 ([M^{*}], 100), 139.0 (28), 122.0 (28), 121.0 (25), 95.0 (16), 60.0 (11). (Methode 1)

IR: [cm⁻¹] = 3310 (w), 1625 (w), 1451 (m), 1318 (w), 1237 (m), 1055 (w), 1003 (w), 950 (m), 822 (m), 765 (s), 726 (m), 681 (m), 629 (m), 602 (m), 535 (m), 476 (w), 440 (w).

Schmelzpunkt: 181.6 °C

4-Amino-5-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (17):

Nach der **Allgemeinen Methode E** werden 1.36 g (0.01 mol) Phenyllessigsäure und 1.06 g (0.01 mol) Thiocarbonylhydrazid vorsichtig auf 160-170 °C erwärmt bis eine Schmelze entsteht. Weitere 25 min erwärmen, danach abkühlen. Aus Ethanol kristallisieren. Man erhält einen schutzig weißen Feststoff.

$C_9H_{10}N_4S$ ($M_r = 206.27$)

Ausbeute: 67%

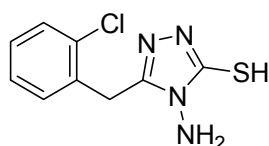
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 4.02 (s, 2H, -CH₂-), 5.80 (s, 2H, -NH₂), 7.32-7.23 (m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6'-H), 13.53 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 13.35 min, m/z [%] = 207.1 (13), 206.1 ([M^{*}], 100), 190.0 (17), 117.1 (10), 93.1 (11), 91.1 (36). (Methode 1)

IR: [cm⁻¹] = 3072 (w), 2832 (w), 2666 (w), 2555 (w), 1680 (s), 1601 (m), 1583 (m), 1535 (w), 1497 (w), 1453 (m), 1421 (m), 1324 (m), 1289 (s), 1186 (m), 1128 (m), 1101 (w), 1073 (m), 1027 (m), 1000 (w), 932 (s), 805 (m), 704 (s), 684 (m), 667 (s).

Schmelzpunkt: 227.1 °C

4-Amino-5-(2-chlorobenzyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (18):



Nach der **Allgemeinen Methode E** werden 1.71 g (0.01 mol) 2-(2-Chlorphenyl)essigsäure und 1.06 g (0.01 mol) Thiocarbohydrazid vorsichtig auf 160-170 °C erwärmt bis eine Schmelze entsteht. Weitere 25 min erwärmen, danach abkühlen. Aus Ethanol kristallisieren. Man erhält einen schutzig weißen Feststoff.

C₉H₉ClN₄S (M_r = 240.71)

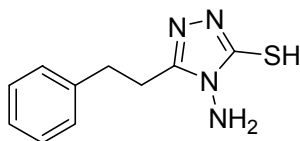
Ausbeute: 66%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 4.13 (s, 2H, -CH₂-), 5.59 (s, 2H, -NH₂), 7.20-7.55 (m, 4H, 3', 4', 5', 6'-H), 13.53 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 13.04 min, m/z [%] = 242.1 (32), 241.1 (10), 240.1 ([M^{*}], 79), 205.1 (54), 188.1 (63), 127.0 (40), 126.0 (11), 125.0 (100), 116.1 (48), 89.1 (82), 63.1 (43), 60.0 (71), 59.0 (49). (Methode 1)

IR: [cm⁻¹] = 3147 (w), 1594 (w), 1475 (m), 1419 (m), 1306 (m), 1054 (m), 1037 (m), 1012 (m), 979 (m), 838 (w), 802 (w), 813 (s), 751 (s), 682 (m), 662 (m), 641 (m), 554 (m), 464 (w), 445 (w).

Schmelzpunkt: 204.8 °C

4-Amino-5-phenethyl-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (19):

Nach der **Allgemeinen Methode E** werden 1.50 g (0.01 mol) 2-(2-Chlorphenyl)essigsäure und 1.06 g (0.01 mol) Thiocarbohydrazid vorsichtig auf 160-170 °C erwärmt bis eine Schmelze entsteht. Weitere 25 min erwärmen, danach abkühlen. Aus Ethanol kristallisieren. Man erhält einen weißen Feststoff.

$C_{10}H_{12}N_4S$ ($M_r = 220.29$)

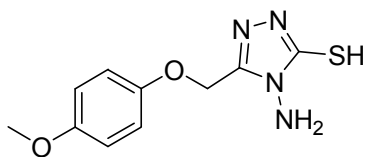
Ausbeute: 63%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 2.94 (s, 4H, -CH₂-CH₂-), 5.61 (s, 2H, -NH₂), 7.13-7.35 (m, 5H, 4', 5', 6', 7', 8'-H), 13.44 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 12.75 min, m/z [%] = 221.0 (14), 220.0 ($[M^*]$, 100), 91.0 (100), 65.1 (16), 60.0 (10). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3140 (w), 2933 (w), 1636 (w), 1571 (m), 1481 (m), 1420 (m), 1309 (m), 1146 (w), 1090 (w), 1045 (m), 971 (m), 748 (s), 699 (s), 655 (m), 580 (m), 531 (m), 498 (m), 473 (m).

Schmelzpunkt: 227.9 °C

4-Amino-5-((4-methoxyphenoxy)methyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol (20):

Nach der **Allgemeinen Methode E** werden 1.82 g (0.01 mol) 2-(2-Chlorphenyl)essigsäure und 1.06 g (0.01 mol) Thiocarbohydrazid vorsichtig auf 160-170 °C erwärmt bis eine Schmelze entsteht. Weitere 25 min erwärmen, danach abkühlen. Aus Ethanol kristallisieren. Man erhält einen weißen Feststoff.

$C_{10}H_{12}N_4O_2S$ ($M_r = 252.29$)

Ausbeute: 62%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.70 (s, 3H, -CH₃), 5.04 (s, 2H, -CH₂-), 5.69 (s, 2H, -NH₂), 6.84-6.89 (d, 2H, ³*J* = 9.16 Hz, 2', 6'-H), 6.96-7.01 (d, 2H, ³*J* = 9.16 Hz, 3', 5'-H), 13.79 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 14.35 min, *m/z* [%] = 252.0 ([M⁺], 26), 124.0 (100), 123.0 (52), 109.0 (30), 95.0 (22), 81.0 (12). (Methode 1)

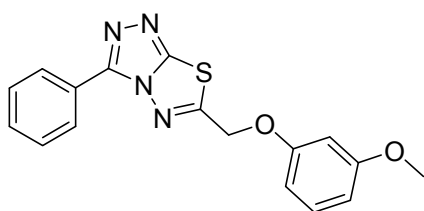
IR: [cm⁻¹] = 3142 (w), 2031 (w), 1580 (w), 1503 (m), 1462 (w), 1286 (w), 1223 (m), 1082 (w), 1031 (m), 982 (w), 812 (m), 735 (s), 665 (m), 607 (w), 514 (m), 482 (m).

Schmelzpunkt: 176.8 °C

7.3.1.6 Allgemeine Methode F für die in den Positionen 3,6-disubstituierten [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole:

Das Substanzgemisch aus 0.005 mol 4-Amino[1,2,4]triazole-3-thiol, 0.01 mol Säure und 10 ml Phosphorylchlorid wird für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Das Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen auf Raumtemperatur auf Eis geschüttet. Der sich abtrennenden Feststoff wird abfiltriert und mit 5%iger NaOH-Lösung behandeln, um nicht abreagierte Edukte zu entfernen. Der verbleibenden Rückstand wird mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisieren, um das gewünschte Produkt zu erhalten.

6-((3-Methoxyphenoxy)methyl)-3-phenyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (21):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.48 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.91 g (0.005 mol) 2-(3-Methoxyphenoxy)essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

C₁₇H₁₄N₄O₂S (M_r = 338.38)

Ausbeute: 74%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.76 (s, 3H, -CH₃), 5.62 (s, 2H, -CH₂-), 6.72-7.21 (m, 4H, 4'', 5'', 6'', 8''-H), 7.64-8.25 (m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6'-H).

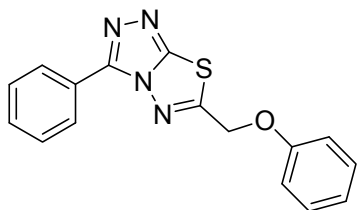
LC-MS (EI+): 21.83 min, m/z [%] = 339.0 [M^+]

IR: [cm^{-1}] = 1589 (w), 1478 (m), 1466 (m), 1376 (w), 1229 (m), 1170 (w), 1079 (w), 1055 (w), 1014 (w), 968 (m), 827 (w), 801 (w), 751 (s), 728 (m), 690 (m), 663 (m), 554 (w), 507 (m), 464 (m), 434 (w).

Schmelzpunkt: 136.7 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% (t_{R} = 6.77 min)

6-(Phenoxymethyl)-3-phenyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (22):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.48 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.76 g (0.005 mol) 2-Phenoxyessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das

gewünschte Produkt in Form schwach bräunlicher Kristalle.

$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$ (M_{r} = 308.36)

Ausbeute: 70%

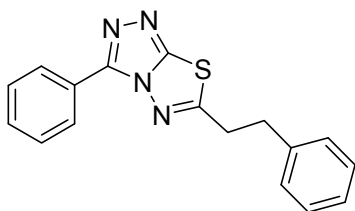
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.43 (s, 2H, -CH₂-), 7.35-7.62 (m, 5H, 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H), 8.32-8.39 (m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6'-H).

IR: [cm^{-1}] = 2980 (w), 1587 (w), 1468 (m), 1364 (w), 1294 (w), 1238 (m), 1171 (m), 1079 (w), 1053 (m), 1016 (w), 967 (m), 823 (w), 771 (w), 756 (s), 684 (s), 511 (m).

Schmelzpunkt: 146.0 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.4% (t_{R} = 7.55 min)

HRMS: berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$ [M^+] 308.0732, gemessen 308.0749.

6-Phenethyl-3-phenyl-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol (23):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.48 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.75 g (0.005 mol) Phenyllessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{17}H_{14}N_4S$ ($M_r = 306.38$)

Ausbeute: 71%

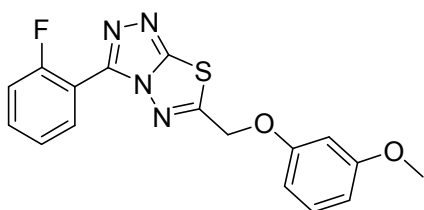
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.06 (t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, 1''-H), 3.39 (t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, 2''-H), 7.15-7.76 (m, 9H, 3', 5', 6', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H).

IR: [cm^{-1}] = 1603 (w), 1533 (w), 1511 (m), 1470 (m), 1223 (w), 1074 (w), 1024 (m), 971 (m), 770 (m), 747 (m), 685 (s), 667 (s), 556 (s), 536 (s).

Schmelzpunkt: 110.0 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.4% ($t_R = 7.55$ min)

HRMS: berechnet für $C_{16}H_{14}N_4S$ [M^+] 306.0939, gemessen 306.0929

3-(2-Fluorophenyl)-6-((3-methoxyphenoxy)methyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol (24):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.53 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-fluorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.91 g (0.005 mol) 2-(3-Methoxyphenoxy)essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach

Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schwach bräunlichen Feststoffs.

$C_{17}H_{13}FN_4O_2S$ ($M_r = 356.37$)

Ausbeute: 70%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.73 (s, 3H, -CH₃), 5.55 (s, 2H, -CH₂-O-), 6.58-7.95 (m, 8H, 2', 3', 4', 5', 4'', 6'', 7'', 8''-H).

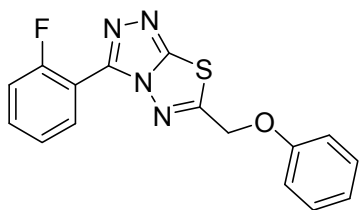
IR: [cm⁻¹] = 2359 (w), 1608 (w), 1589 (w), 1463 (m), 1351 (w), 1292 (w), 1264 (w), 1206 (w), 1153 (m), 1044 (w), 968 (w), 927 (w), 856 (w), 825 (w), 750 (s), 730 (w), 681 (m), 665 (m), 578 (w), 446 (w).

Schmelzpunkt: 132.2 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 98.3% (t_R = 8.23min)

HRMS: berechnet für C₁₇H₁₃FN₄O₂S [M⁺] 356.074296, gemessen 356.07459

3-(2-Fluorphenyl)-6-(phenoxyethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (25):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.53 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-fluorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.76 g (0.005 mol) 2-Phenoxyessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das

gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

C₁₆H₁₁FN₄OS (M_r = 326.35)

Ausbeute: 71%

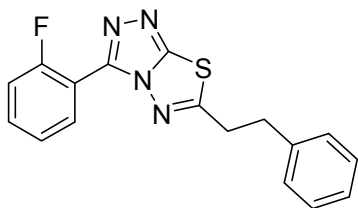
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.58 (s, 2H, -CH₂-O-), 7.58-8.09 (m, 9H, 2', 3', 4', 5', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H).

IR: [cm⁻¹] = 1589 (w), 1467 (m), 1376 (w), 1230 (m), 1122 (w), 1079 (w), 1055 (w), 1014 (w), 969 (m), 827 (w), 800 (w), 751 (s), 728 (m), 690 (m), 663 (m), 555 (w), 507 (m), 464 (m), 434 (m).

Schmelzpunkt: 140.1 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% (t_R = 7.08 min)

HRMS: berechnet für C₁₇H₁₃ClN₄O₂S [M⁺] 326.0637, gemessen 326.0622.

3-(2-Fluorophenyl)-6-phenethyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (26):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.53 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-fluorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.75 g (0.005 mol) Phenyllessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form brauner Kristalle.

$C_{17}H_{13}FN_4S$ ($M_r = 324.38$)

Ausbeute: 69%

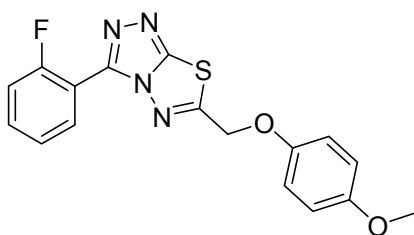
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.41 (t, 2H, $^3J = 7.9$ Hz, 1''-H), 5.58 (t, 2H, $^3J = 7.9$ Hz, 2''-H), 6.99-7.11 (m, 3H, 3', 5', 6''-H), 7.30-7.44 (m, 4H, 4'', 5'', 7'', 8''-H), 7.48-7.64 (m, 1H, 6'-H), 7.92-7.96 (m, 1H, 4'-H).

GC-MS (EI): 23.19 min, m/z [%] = 327.10 (25), 326.10 ($[M^*]$, 100), 233.00 (39), 122.00 (31), 121.00 (28), 84.00 (23), 57.00 (13). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 2921 (m), 2852 (w), 1479 (m), 1462 (m), 1229 (m), 1123 (w), 1006 (m), 971 (m), 823 (w), 752 (s), 729 (m), 698 (m), 665 (w), 551 (w), 472 (m), 448 (w).

Schmelzpunkt: 292.6 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.2% ($t_R = 8.27$ min)

3-(2-Fluorophenyl)-6-((4-methoxyphenoxy)methyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (27):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.53 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-fluorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.91 g (0.005 mol) 2-(4-Methoxyphenoxy)essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{17}H_{13}N_4O_2S$ ($M_r = 356.37$)

Ausbeute: 75%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.73 (s, 3H, -OCH₃), 5.56 (s, 2H, -CH₂-), 6.59-6.69 (m, 3H, 3', 4'', 6'' -H), 7.18-7.96 (m, 5H, 4', 5', 6', 3'', 7'' -H).

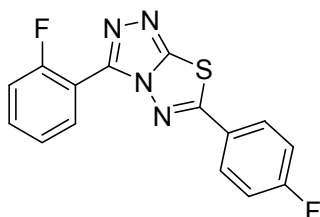
IR: [cm^{-1}] = 2980 (w), 2359 (s), 2341 (m), 1589 (w), 1463 (w), 1290 (w), 1264 (w), 1207 (w), 1154 (m), 1031 (w), 966 (w), 926 (w), 859 (w), 828 (w), 751 (m), 731 (w), 682 (m), 667 (m), 552 (w), 475 (w).

Schmelzpunkt: 175.5 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 96.8% ($t_R = 8.13$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{13}FN_4O_2S$ [M^+] 356.074296, gemessen 356.07630

3-(2-Fluorophenyl)-6-(4-fluorphenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (28):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.53 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-fluorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.70 g (0.005 mol) 4-Fluorbenzoesäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines weißen Feststoffs.

$C_{15}H_8F_2N_4S$ ($M_r = 314.31$)

Ausbeute: 73%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.41-8.06 (m, 8H, 2', 3', 4', 5', 2'', 3'', 5'', 6'' -H).

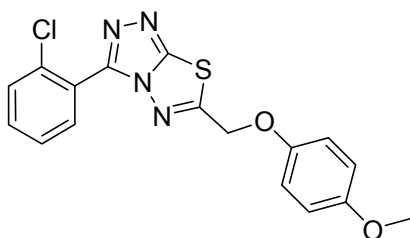
IR: [cm^{-1}] = 3072 (w), 1602 (w), 1479 (m), 1411 (w), 1292 (w), 1235 (m), 1159 (m), 963 (w), 832 (m), 752 (s), 731 (w), 666 (m), 605 (w), 563 (w), 476 (w), 455 (w).

Schmelzpunkt: 226.7 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 98.9% ($t_R = 8.40$ min)

HRMS: berechnet für $C_{15}H_8F_2N_4S$ [M^+] 314.04375, gemessen 314.04146

6-(2-Chlorophenyl)-3-((4-methoxyphenoxy)methyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (29 = p7):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.57 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.91 g (0.005 mol) 2-(4-Methoxyphenoxy)essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines weißen Feststoffs.

$C_{17}H_{13}ClN_4O_2S$ ($M_r = 372.83$)

Ausbeute: 75%

1H -NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 5.50 (s, 2H, -CH₂-), 6.85-6.90 (d, 2H, $^3J = 9.22$ Hz, 4', 8', -H), 7.03-7.07 (d, 2H, $^3J = 9.22$ Hz, 5', 7'-H), 7.54-8.04 (m, 4H, 3'', 4'', 5'', 6''-H).

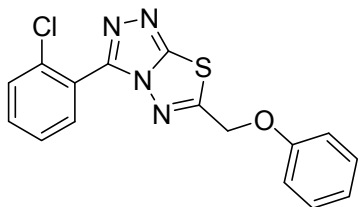
IR: [cm^{-1}] = 2980 (w), 1594 (w), 1502 (m), 1447 (m), 1356 (w), 1304 (w), 1231 (s), 1106 (m), 1019 (m), 820 (s), 761 (m), 718 (s).

Schmelzpunkt: 145.9 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 7.01$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{13}ClN_4O_2S$ [M^+] 372.0448, gemessen 372.0417.

3-(2-Chlorophenyl)-6-(phenoxy)methyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (30):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.57 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.76 g (0.005 mol) 2-Phenoxyessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{16}H_{11}ClN_4OS$ ($M_r = 342.80$)

Ausbeute: 77%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.56 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.99-8.03 (m, 9H, 3', 4', 5', 6', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H).

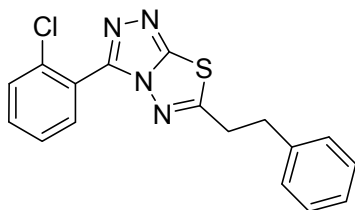
IR: [cm^{-1}] = 2916 (w), 1590 (w), 1488 (w), 1467 (m), 1365 (w), 1229 (m), 1170 (w), 1081 (w), 1051 (m), 970 (m), 817 (w), 725 (s), 690 (m), 511 (w).

Schmelzpunkt: 127.4 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 7.13$ min)

HRMS: berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{OS}$ [M^+] 342.0342, gemessen 342.0335.

3-(2-Chlorophenyl)-6-phenethyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (31):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.57 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.75 g (0.005 mol) Phenyllessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das

gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{S}$ ($M_r = 340.83$)

Ausbeute: 72%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.06 (t, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, 1''-H), 3.39 (t, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, 2''-H), 7.15-7.76 (m, 9H, 3', 4', 5', 6', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H).

GC-MS (EI): 13.43 min, m/z [%] = 342.10 (38), 341.10 (21), 340.10 ($[\text{M}^*]$) (96), 139.00 (10), 137.00 (27), 115.10 (10), 102.00 (15), 91.10 (100). (Methode 1)

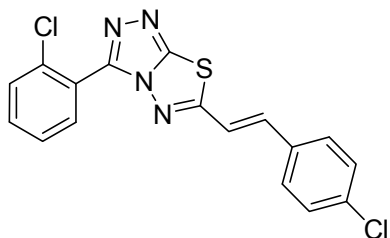
IR: [cm^{-1}] = 3001 (w), 1526 (w), 1496 (w), 1453 (s), 1137 (w), 1229 (m), 1106 (w), 1078 (w), 1052 (w), 1005 (w), 967 (m), 845 (w), 754 (s), 732 (m), 720 (s), 700 (s), 657 (m), 639 (m), 534 (m), 480 (m), 456 (w).

Schmelzpunkt: 160.1 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 7.33$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{13}ClN_4S$ [M^+] 340.0549, gemessen 340.0530.

3-(2-Chlorophenyl)-6-(4-chlorostyryl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol (32):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.57 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.78 g (0.005 mol) (E/Z)-3-(3-Chlorophenyl)acrylsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{16}H_{15}NO_4$ ($M_r = 373.26$)

Ausbeute: 89%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.88 (s, 2H, -CH=CH-), 7.66-7.89 (m, 8H, 3', 4', 5', 6', 4'', 5'', 7'', 8''-H).

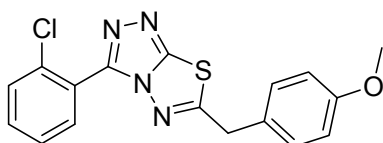
IR: [cm^{-1}] = 2837 (w), 1555 (w), 1503 (m), 1463 (m), 1442 (m), 1351 (w), 1308 (w), 1231 (m), 1183 (m), 1106 (m), 1052 (m), 1033 (m), 961 (m), 826 (m), 765 (s), 728 (s), 677 (m), 656 (m), 630 (w), 596 (w), 524 (w), 465 (m), 426 (m), 410 (w).

Schmelzpunkt: 201.6 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): E / Z – isomere 50% / 50% ($t_R = 8.01$ min), ($t_R = 8.35$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{10}Cl_2N_4S$ [M^+] 372.0003, gemessen 371.9984.

3-(2-Chlorophenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole (33):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.57 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.70 g (0.005 mol) 2-(4-Methoxyphenyl)essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h

auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form rotbrauner Kristalle.

$C_{17}H_{13}ClN_4OS$ ($M_r = 356.83$)

Ausbeute: 82%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 4.37 (s, 2H, -CH₂-), 6.91-6.95 (d, 2H, $^3J = 8.72$ Hz, 4'', 6'' -H), 7.30-7.34 (d, 2H, $^3J = 8.72$ Hz, 3'', 7'' -H), 7.53-7.82 (m, 4H, 3', 4', 5', 6' -H).

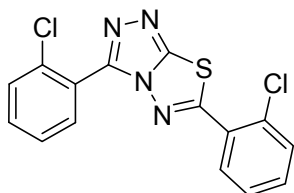
IR: [cm^{-1}] = 2995 (w), 1606 (w), 1585 (m), 1503 (m), 1453 (m), 1296 (w), 1238 (s), 1182 (m), 1122 (m), 1108 (m), 1027 (m), 1009 (m), 857 (m), 822 (m), 809 (m), 756 (s), 732 (m), 721 (s), 687 (w), 666 (m), 641 (m), 548 (m), 525 (m), 457 (m), 437 (m).

Schmelzpunkt: 158.1 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 7.26$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{13}ClN_4OS$ [M^+] 356.0498, gemessen 356.0464.

3,6-bis(2-Chlorophenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (34):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.57 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.78 g (0.005 mol) 2-Chlorbenzoesäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das

gewünschte Produkt in Form eines weißen Feststoffs.

$C_{15}H_8Cl_2N_4S$ ($M_r = 347.22$)

Ausbeute: 76%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.57-7.76 (m, 6H, 3', 4', 5', 3'', 4'', 5'' -H), 7.84-7.85 (m, 1H, 6' -H), 7.96-7.97 (m, 1H, 6'' -H).

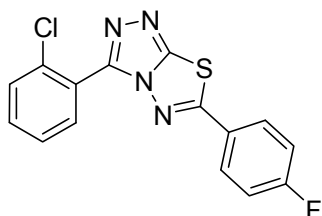
IR: [cm^{-1}] = 3092 (w), 1469 (w), 1426 (m), 1320 (w), 1296 (w), 1274 (m), 1056 (m), 1041 (w), 968 (m), 950 (w), 750 (s), 722 (w), 676 (w), 657 (w), 636 (w), 604 (m), 484 (w), 460 (w), 445 (w), 428 (m).

Schmelzpunkt: 136.2 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 97.9% ($t_R = 9.08\text{min}$)

HRMS: berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ [M^+] 345.984649, gemessen 345.98210.

3-(2-Chlorophenyl)-6-(4-fluorophenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol (35):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.57 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.70 g (0.005 mol) 4-Fluorbenzoesäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das

gewünschte Produkt in Form eines weißen Feststoffs.

$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{ClFN}_4\text{S}$ ($M_r = 330.77$)

Ausbeute: 77%

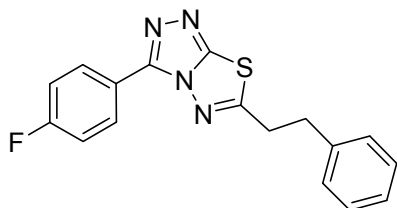
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.40-7.65 (m, 5H, 3', 4', 5', 3'', 5''-H), 7.71-8.05 (m, 3H, 6', 2'', 6''-H).

IR: [cm^{-1}] = 2922 (w), 1589 (m), 1466 (m), 1291 (w), 1207 (m), 1154 (m), 1032 (m), 965 (m), 831 (m), 752 (s), 730 (m), 681 (m), 665 (m), 582 (w), 476 (m).

Schmelzpunkt: 222.0 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 97.2% ($t_R = 8.65\text{min}$)

HRMS: berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{OS}$ [M^+] 330.014199, gemessen 330.01438.

3-(4-Fluorophenyl)-6-phenethyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (36):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.53 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-fluorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.75 g (0.005 mol) Phenyl-essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält

man das gewünschte Produkt in Form eines leicht bräunlichen Feststoffs.

$C_{17}H_{13}FN_4S$ ($M_r = 324.38$)

Ausbeute: 73%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.12 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, 1''-H), 3.45 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, 2''-H), 7.18-7.54 (m, 7H, 3', 5', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H), 8.12-8.31 (m, 2H, 2', 6'-H).

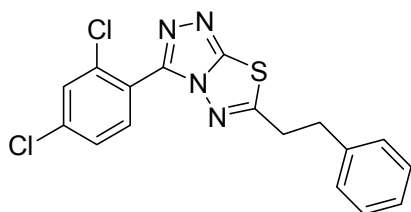
GC-MS (EI): 12.10 min, m/z [%] = 325.10 (22), 324.10 ($[M^*]$, 100), 121.00 (35), 91.10 (71). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 2980 (w), 1604 (w), 1478 (m), 1452 (s), 1221 (m), 1163 (m), 1015 (m), 970 (m), 859 (s), 814 (m), 746 (m), 719 (m), 695 (s), 632 (m), 584 (m), 521 (s), 481(m).

Schmelzpunkt: 165.9 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.0% ($t_R = 7.82$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{13}FN_4S$ [M^+] 324.08445, gemessen 324.0811.

3-(2,4-Dichlorophenyl)-6-phenethyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (37):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.75 g (0.005 mol) Phenyl-essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält

man das gewünschte Produkt in Form eines leicht bräunlichen Feststoffs.

$C_{17}H_{12}Cl_2N_4S$ ($M_r = 375.27$)

Ausbeute: 75%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.15 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, 1''-H), 3.29 (t, 2H, $^3J = 7.7$ Hz, 2''-H), 7.18-7.39 (m, 8H, 3', 5', 6', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H).

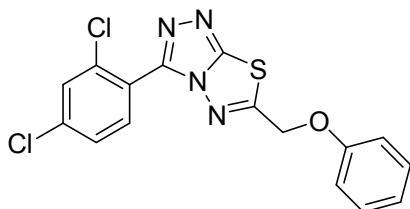
IR: [cm^{-1}] = 1603 (w), 1494 (w), 1470 (m), 1441 (s), 1194 (m), 1064 (w), 1016 (w), 991 (w), 977 (m), 839 (m), 750 (m), 698 (s), 687 (m), 646 (w), 567 (w), 524 (m), 493 (m).

Schmelzpunkt: 145.5 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 8.26$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{12}Cl_2N_4S$ [M^+] 374.01595, gemessen 374.0142.

3-(2,4-Dichlorophenyl)-6-(phoxymethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (38):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.76 g (0.005 mol) 2-Phenoxyessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung

erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{16}H_{10}Cl_2N_4OS$ ($M_r = 377.25$)

Ausbeute: 71%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 5.55 (s, 2H, -CH₂-), 6.98-7.92 (m, 8H, 3', 5', 6', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H).

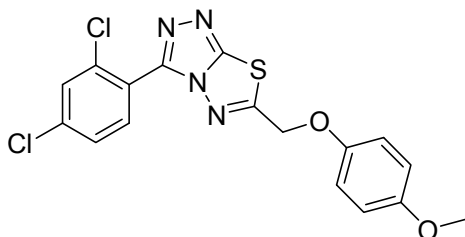
IR: [cm^{-1}] = 2359 (m), 2120 (w), 1593 (m), 1552 (w), 1493 (w), 1456 (m), 1366 (w), 1249 (s), 1169 (m), 1101 (m), 1080 (m), 1050 (m), 967 (m), 870 (w), 840 (w), 819 (m), 743 (s), 689 (m), 564 (w), 506 (w), 478 (w), 428 (w), 405 (w).

Schmelzpunkt: 176.3 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 9.19\text{min}$)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{12}Cl_2N_4S$ [M^+] 375.995209, gemessen 375.99766.

3-(2,4-Dichlorophenyl)-6-((4-methoxyphenoxy)methyl)-[1,2,4]thiazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol (39):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.91 g (0.005 mol) 2-(4-Methoxyphenoxy)essigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält

man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{17}H_{12}Cl_2N_4O_2S$ ($M_r = 407.27$)

Ausbeute: 73%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 5.49 (s, 2H, -CH₂-O-), 6.86-6.91 (d, 2H, $^3J = 9.22$ Hz, 5'', 7''-H), 7.02-7.07 (d, 2H, $^3J = 9.22$ Hz, 4'', 8''-H), 7.67-7.96 (m, 3H, 3', 5', 6'-H).

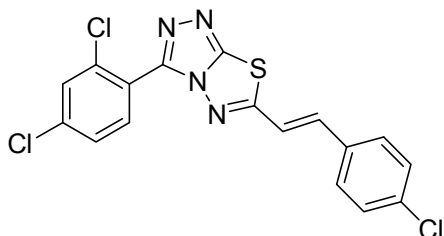
IR: [cm^{-1}] = 1597 (w), 1503 (m), 1467 (m), 1238 (s), 1190 (m), 1104 (m), 1036 (m), 967 (m), 818 (s), 766 (w), 725 (w), 671 (m), 609 (m), 565 (w), 523 (m).

Schmelzpunkt: 161.8 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 7.90$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{12}Cl_2N_4O_2S$ [M^+] 406.0058, gemessen 406.0074.

**6-(4-chlorostyryl)-3-(2,4-dichlorophenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol
(40):**



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.78 g (0.005 mol) (E/Z)-3-(3-Chlorophenyl)acrylsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung

erhält man das gewünschte Produkt in Form eines leicht bräunlichen Feststoffs.

$C_{17}H_9Cl_3N_4S$ ($M_r = 407.70$)

Ausbeute: 70%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.15 (s, 2H, -CH=CH-), 7.23-7.52 (m, 5H, 5', 4'', 5'', 7'', 8''-H), 7.61-7.77 (m, 2H, 3', 6'-H).

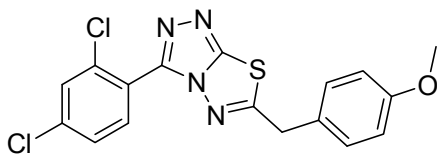
IR: [cm^{-1}] = 2980 (w), 2347 (w), 1621 (w), 1590 (w), 1484 (w), 1467 (w), 1405 (w), 1144 (w), 1088 (m), 1008 (m), 935 (m), 819 (m), 805 (m), 660 (w), 496 (m).

Schmelzpunkt: 238.6 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 9.92$ min)

HRMS: berechnet für $C_{17}H_{12}Cl_2N_4O_2S$ [M^+] 379.945673, gemessen 379.94778.

**3-(2,4-Dichlorophenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol
(41):**



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.70 g (0.005 mol) 2-(4-Methoxyphenyl)essigsäure

in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{17}H_{12}Cl_2N_4OS$ ($M_r = 391.27$)

Ausbeute: 67%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.72 (s, 3H, -CH₃), 4.35 (s, 2H, -CH₂-), 6.83-7.87 (m, 7H, 3', 5', 6', 3'', 4'', 6'', 7''-H).

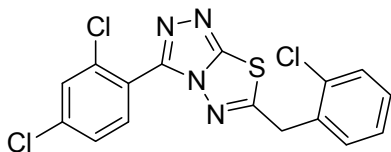
IR: [cm⁻¹] = 2980 (m), 1585 (w), 1509 (w), 1451 (m), 1242 (m), 1146 (w), 1093 (w), 1029 (w), 967 (m), 855 (m), 819 (s), 757 (m), 662 (w), 565 (w), 547 (m), 531 (m), 459 (w).

Schmelzpunkt: 164.6 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 97.7% (t_R = 9.14min)

HRMS: berechnet für C₁₇H₁₂Cl₂N₄OS [M⁺] 390.010859, gemessen 390.01631.

6-(2-Chlorobenzyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (42):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.85 g (0.005 mol) 2-Chlorphenylessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid

für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

C₁₇H₉Cl₃N₄S (M_r = 395.69)

Ausbeute: 70%

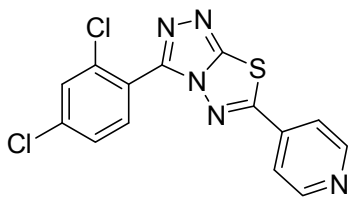
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 4.47 (s, 2H, -CH₂-), 7.27-7.61 (m, 7H, 3', 5', 6', 4'', 5'', 6'', 7''-H).

IR: [cm⁻¹] = 2972 (w), 2359 (w), 1731 (w), 1595 (w), 1556 (w), 1463 (m), 1443 (m), 1239 (w), 1100 (m), 1051 (m), 1004 (m), 869 (m), 746 (s), 682 (m), 575 (w), 560 (w), 481 (m), 436 (m).

Schmelzpunkt: 162.3 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 81.1% (t_R = 9.53min)

HRMS: berechnet für C₁₆H₉Cl₃N₄S [M⁺] 393.961323, gemessen 393.96090.

3-(2,4-Dichlorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol (43):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.77 g (0.005 mol) Isonicotinsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur

erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{14}H_7Cl_2N_5S$ ($M_r = 348.21$)

Ausbeute: 62%

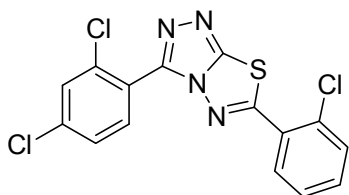
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.74-7.95 (m, 5H, 3', 4', 5', 1'', 5'' -H), 8.83-8.86 (m, 2H, 2'', 4''-H).

IR: [cm^{-1}] = 2359 (m), 1592 (w), 1446 (m), 1365 (w), 1102 (m), 1050 (w), 981 (m), 967 (m), 863 (m), 839 (w), 819 (m), 743 (m), 689 (s), 613 (m), 563 (m), 536 (m), 502 (w), 478 (m), 428 (m), 405 (w).

Schmelzpunkt: 248.6 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 98.2% ($t_R = 8.29$ min)

HRMS: berechnet für $C_{14}H_7Cl_2N_5S$ [M^+] 346.979894, gemessen 346.97911.

6-(2-Chlorophenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol (44):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.78 g (0.005 mol) 2-Chlorbenzoesäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{15}H_7Cl_3N_4S$ ($M_r = 381.67$)

Ausbeute: 68%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.26-7.57 (m, 5H, 5', 3'', 4'', 5'', 6''-H), 7.62-7.77 (m, 2H, 3', 6'-H).

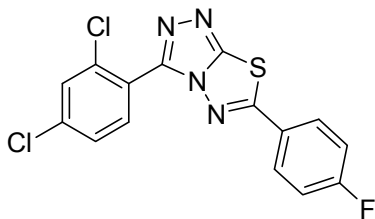
IR: [cm⁻¹] = 2980 (w), 2347 (w), 1592 (w), 1467 (m), 1449 (m), 1272 (m), 1146 (w), 1105 (w), 1065 (m), 1041 (m), 972 (m), 862 (m), 818 (m), 762 (s), 722 (m), 672 (m), 603 (m), 564 (m), 530 (m), 446 (m).

Schmelzpunkt: 228.0 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% (t_R = 9.99min)

HRMS: berechnet für C₁₇H₁₂Cl₂N₄O₂S [M⁺] 379.945673, gemessen 379.94778.

3-(2,4-Dichlorophenyl)-6-(4-fluorophenyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (45):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.65 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2,4-dichlorophenyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.70 g (0.005 mol) 4-Fluorbenzoesäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

C₁₅H₇Cl₂FN₄S (M_r = 365. 21)

Ausbeute: 70%

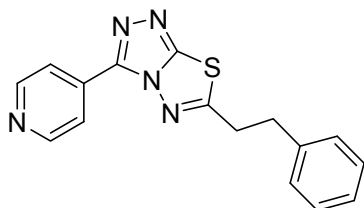
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.42-7.49 (m, 3H, 5', 3'', 5''-H), 7.68-8.02 (m, 4H, 3', 6', 2'', 6''-H).

IR: [cm⁻¹] = 2707 (w), 1594 (w), 1474 (m), 1412 (w), 1238 (m), 1161 (w), 1101 (m), 979 (s), 863 (m), 836 (m), 818 (m), 687 (w), 623 (w), 606 (m), 572 (m), 558 (m), 510 (m), 474 (m).

Schmelzpunkt: 267.3 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 91.6% (t_R = 9.29min)

HRMS: berechnet für C₁₅H₇Cl₂FN₄S [M⁺] 363.975223, gemessen 363.97666.

6-Phenethyl-3-(pyridin-4-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (46):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.48 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(pyridin-4-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.75 g (0.005 mol) Phenyllessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte

Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{16}H_{13}N_5O$ ($M_r = 307.37$)

Ausbeute: 62%

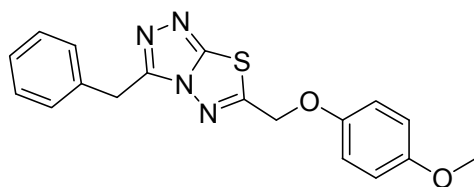
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.06 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, 1''-H), 3.39 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, 2''-H), 7.08-7.41 (m, 5H, 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H), 7.64-7.91 (m, 4H, 2', 3', 5', 6'-H).

IR: [cm^{-1}] = 1596 (w), 1553 (w), 1539 (w), 1496 (w), 1452 (s), 1101 (m), 1078 (w), 1051 (w), 1000 (w), 966 (m), 859 (m), 818 (s), 796 (m), 700 (m), 647 (w), 561 (m), 539 (m), 511 (w), 481 (m), 462 (m).

Schmelzpunkt: 206.3 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 98.5% ($t_R = 6.55$ min)

HRMS: berechnet für $C_{16}H_{13}N_5S$ [M^+] 307.0892, gemessen 307.0906.

3-Benzyl-6-((4-methoxyphenoxy)methyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (47):

Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.52 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.91 g (0.005 mol) 2-(4-Methoxyphenoxy)essig säure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt.

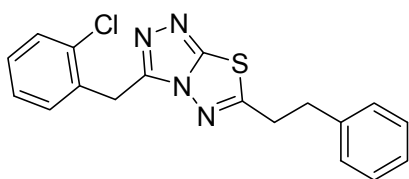
Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{18}H_{16}N_4O_2S$ ($M_r = 352.41$)

Ausbeute: 79%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.93 (s, 3H, -OCH₃), 4.41 (s, 2H, 1'-H), 5.45 (s, 2H, -CH₂-O-), 6.86-6.90 (d, 2H, ³*J* = 9.16 Hz, 5'', 7''-H), 7.00-7.05 (d, 2H, ³*J* = 9.16 Hz, 4'', 8''-H), 7.19-7.39 (m, 5H, 3', 4', 5', 6', 7'-H).

3-(2-Chlorobenzyl)-6-phenethyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (48):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.60 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-(2-chlorobenzyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.75 g (0.005 mol) Phenylessigsäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

C₁₈H₁₅ClN₄S (M_r = 354. 86)

Ausbeute: 72%

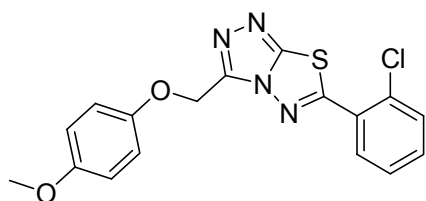
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.02 (t, 2H, ³*J* = 7.6 Hz, 1''-H), 3.35 (t, 2H, ³*J* = 7.6 Hz, 2''-H), 4.46 (s, 2H, -CH₂-), 7.20-7.44 (m, 9H, 4', 5', 6', 7', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H).

IR: [cm⁻¹] = 2922 (w), 1765 (w), 1524 (w), 1429 (w), 1297 (w), 1238 (w), 1133 (w), 1054 (m), 990 (m), 901 (m), 747 (s), 704 (m), 681 (m), 646 (m), 565 (m), 491 (m).

Schmelzpunkt: 175,6 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.0% (t_R = 9.89min)

6-(2-Chlorophenyl)-3-((4-methoxyphenoxy)methyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (49):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.63 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-((4-methoxyphenoxy)methyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.78 g (0.005 mol) 2-Chlorbenzoesäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf Siedetemperatur erwärmt. Nach

Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{17}H_{13}ClN_4O_2S$ ($M_r = 372.83$)

Ausbeute: 74%

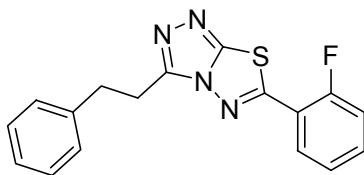
1H -NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 5.50 (s, 2H, -CH₂-), 6.85-6.90 (d, 2H, $^3J = 9.22$ Hz, 4', 8', -H), 7.03-7.07 (d, 2H, $^3J = 9.22$ Hz, 5', 7'-H), 7.54-8.04 (m, 4H, 3'', 4'', 5'', 6''-H).

IR: [cm^{-1}] = 2980 (w), 1594 (w), 1502 (m), 1447 (m), 1356 (w), 1304 (w), 1231 (s), 1106 (m), 1019 (m), 820 (s), 761 (m), 718 (s).

Schmelzpunkt: 145.9 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 99.9% ($t_R = 7.01$ min)

6-(2-Fluorophenyl)-3-phenethyl-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol (50):



Nach der **Allgemeinen Methode F** werden 0.55 g (0.0025 mol) 4-Amino-5-phenethyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol und 0.70 g (0.005 mol) 4-Fluorbenzoesäure in 5 ml Phosphorylchlorid für 6 h auf

Siedetemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung erhält man das gewünschte Produkt in Form eines schutzig weißen Feststoffs.

$C_{17}H_{13}FN_4S$ ($M_r = 324.38$)

Ausbeute: 67%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.18 (t, 2H, $^3J = 7.43$ Hz, 1'-H), 3.34 (t, 2H, $^3J = 6.63$ Hz, 2'-H), 7.24-7.50 (m, 5H, 4', 5', 6', 7', 8'-H), 7.95-8.04 (m, 4H, 2'', 3'', 5'', 6''-H).

IR: [cm^{-1}] = 2980 (w), 1869 (w), 1686 (m), 1602 (w), 1497 (w), 1475 (m), 1412 (w), 1310 (m), 1236 (m), 1225 (m), 1160 (s), 962 (m), 868 (m), 834 (s), 772 (s), 736 (m), 713 (w), 622 (w), 604 (s), 571 (w), 557 (m), 518 (m), 501 (m).

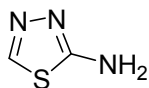
Schmelzpunkt: 190.8 °C

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 95.8% ($t_R = 9.50$ min)

HRMS: berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{S}$ [M^+] 324.0845, gemessen 324.0803

7.3.2 Synthese der in Kapitel 4.2 behandelten Verbindungen

1,3,4-Thiadiazol-2-amin (51):



Ameinsensäure (2.30 g, 0.05 mol) und Thiosemicarbazid (4.56 g, 0.05 mol) werden in 10 ml POCl_3 für 5 h bei 80-90 °C gerührt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und mit konzentriertem Ammoniak basisch gemacht. Das ausfallende Produkt wird abfiltriert und aus wässrigem Ethanol (10-15%) kristallisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_3\text{S}$ ($M_r = 101.13$)

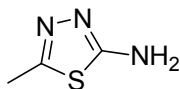
Ausbeute: 61%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.20 (s, 2H, - NH_2), 8.56 (s, 1H, -H).

GC-MS (EI): 5.93 min, m/z [%] = 101.00 ($[\text{M}^*]$, 100), 74.00 (82), 60.00 (23), 59.00 (13). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3445 (w), 3078 (w), 1646 (m), 1552 (m), 1447 (s), 1405 (m), 1142 (m), 993 (m), 882 (m), 700 (w), 490 (m).

Schmelzpunkt: 196.1 °C

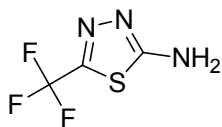
5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin (52):

Essigsäure (5.77 g, 0.096 mol) und Thiosemicabazid (7.29 g, 0.08 mol) werden in 8.6 ml konzentrierter Schwefelsäure für 7 h bei 80-90 °C gerührt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und mit konzentriertem Ammoniak basisch gemacht. Das ausfallende Produkt wird abfiltriert und aus wässrigem Ethanol (10-15%) kristallisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

$C_3H_5N_3S$ ($M_r = 115.16$)

Ausbeute: 53%

GC-MS (EI): 5.77 min, m/z [%] = 115.00 ($[M^*]$, 82), 74.00 (100), 60.00 (17), 59.00 (29). (Methode 1)

5-(Trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (53):

Trifluoressigsäure (12.23 g, 0.096 mol) und Thiosemicabazid (7.29 g, 0.08 mol) werden in 8.6 ml konzentrierter Schwefelsäure für 7 h bei 80-90 °C gerührt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und mit konzentriertem Ammoniak basisch gemacht. Das ausfallende Produkt wird abfiltriert und aus wässrigem Ethanol (10-15%) kristallisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

$C_3H_2F_3N_3S$ ($M_r = 169.13$)

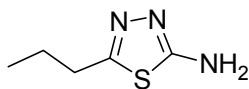
Ausbeute: 63%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 8.04 (s, 2H, -NH₂).

GC-MS (EI): 6.08 min, m/z [%] = 169.00 ($[M^*]$, 100), 113.00 (16), 94.00 (11), 74.00 (27), 69.00 (38), 63.00 (10), 60.00 (33). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3098 (w), 1639 (w), 1518 (m), 1490 (m), 1324 (m), 1142 (s), 1031 (m), 744 (m), 687 (w), 517 (m), 432 (m).

Schmelzpunkt: 267.3 °C

5-Propyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin (54):

Buttersäure (8.46 g, 0.096 mol) und Thiosemicabazid (7.29 g, 0.08 mol) werden in 8.6 ml konzentrierter Schwefelsäure für 7 h bei 80-90 °C gerührt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und mit konzentriertem Ammoniak basisch gemacht. Das ausfallende Produkt wird abfiltriert und aus wässrigem Ethanol (10-15%) kristallisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

$C_5H_9N_3S$ ($M_r = 143.21$)

Ausbeute: 61%

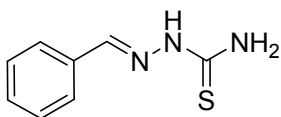
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 0.90 (t, 3H, $^3J = 7.3$ Hz, $-CH_3$), 1.63 (Sechstett, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $-CH_2-$), 2.75 (t, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, $-CH_2-$), 7.13 (s, 2H, $-NH_2$).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm]: 13.68 (+, C3', $-CH_3$), 22.76 (-, C2', $-CH_2$), 31.70 (-, C1', $-CH_2$), 158.60(*, C2), 168.52 (*, C5).

GC-MS (EI): 5.93 min, m/z [%] = 143.0 ($[M^*]$, 10), 128.0 (20), 115.0 (100), 114.0 (11), 74.00 (25), 60.00 (16), 59.00 (10). (Methode 1)

IR: $[cm^{-1}] = 2965$ (m), 2361 (w), 1522 (m), 1498 (m), 1378 (w), 1187 (m), 1099 (w), 1041 (w), 903 (w), 686 (w), 534 (w), 431 (m).

Schmelzpunkt: 209.4 °C

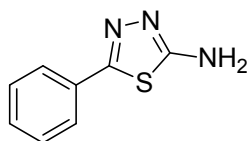
5-Phenyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin (55):

0.05 mol Benzaldehyd in 75 ml warmem Wasser und 0.05 mol Thiosemicabazid in 75 ml warmem Ethanol werden bei 60 °C bis zur Auskristallisation eines weißen Feststoffes (1 h) gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und stellt das Thiosemicabazon dar:

$C_8H_9N_3S$ ($M_r = 179.24$)

LC-MS (EI+): 6.01 min, m/z [%] = 180.0 ($[M^+]$ 100).

FAB: 180.1 ($[M^+]$ 100).



0.05 mol Thiosemicarbazone werden in 300 ml warmem Wasser gelöst, mit 0.15 mol Eisen(III)chlorid in 300 ml Wasser versetzt und 45 min bei 60 °C gerührt. Danach wird 0.11 mol Zitronensäure und 0.05 mol Natriumacetat zugegeben und mit konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht. Der ausfallende Niederschlag ist das gewünschte Produkt und wird durch Filtration gewonnen.

$C_8H_7N_3S$ ($M_r = 177.23$)

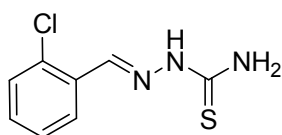
Ausbeute: 62%

LC-MS (EI+): 5.89 min, m/z [%] = 178.0 ($[M^+]$ 100).

IR: $[cm^{-1}] = 2980$ (m), 2359 (w), 1630 (w), 1510 (m), 1380 (w), 1140 (m), 1060 (w), 978 (w), 914 (w), 759 (s), 686 (s), 96 (m), 438 (m).

Schmelzpunkt: 255.5 °C

5-(2-Chlorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (56):

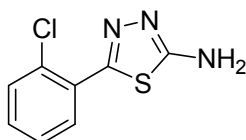


0.05 mol 2-Chlorbenzaldehyd in 75 ml warmem Wasser und 0.05 mol Thiosemicarbazid in 75 ml warmem Ethanol werden bei 60 °C bis zur Auskristallisation eines weißen Feststoffes (1 h) gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen und stellt das Thiosemicarbazon dar:

$C_8H_8ClN_3S$ ($M_r = 213.69$)

LC-MS (EI+): 6.51 min, m/z [%] = 214.0 ($[M^+]$ 100).

FAB: 214.1 ($[M^+]$ 100).



0.05 mol Thiosemicarbazone werden in 300 ml warmem Wasser gelöst, mit 0.15 mol Eisen(III)chlorid in 300 ml Wasser versetzt und 45 min bei 60 °C gerührt. Danach wird 0.11 mol Zitronensäure und 0.05 mol Natriumacetat zugegeben und mit konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht. Der ausfallende Niederschlag ist das gewünschte Produkt und wird durch Filtration gewonnen.

$C_8H_6ClN_3S$ ($M_r = 211.67$)

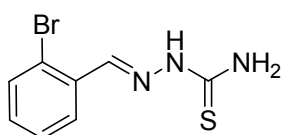
Ausbeute: 60%

GC-MS (EI): 11.57 min, m/z [%] = 213.00 (32), 211.00 ($[M^*]$, 83), 168.90 (12), 157.00 (10), 155.00 (28), 140.00 (11), 138.00 (33), 120.00 (11), 111.00 (11), 102.00 (13), 89.10 (11), 76.00 (11), 75.00 (21), 74.00 (100), 60.00 (12).
(Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 2980 (m), 1506 (s), 1458 (m), 1062 (w), 983 (m), 755 (m), 685 (w), 521 (m), 451 (s).

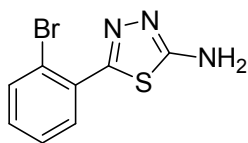
Schmelzpunkt: 187.3 °C

5-(2-Bromophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (57):



0.05 mol 2-Brombenzaldehyd in 75 ml warmem Wasser und 0.05 mol Thiosemicarbazid in 75 ml warmem Ethanol werden bei 60 °C bis zur Auskristallisation eines weißen Feststoffes (1 h) gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen und stellt das Thiosemicarbazon dar:

$C_8H_8BrN_3S$ ($M_r = 258.14$)



0.05 mol Thiosemicarbazon werden in 300 ml warmem Wasser gelöst, mit 0.15 mol Eisen(III)chlorid in 300 ml Wasser versetzt und 45 min bei 60 °C gerührt. Danach wird 0.11 mol Zitronensäure und 0.05 mol Natriumacetat zugegeben und mit konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht. Der ausfallende Niederschlag ist das gewünschte Produkt und wird durch Filtration gewonnen.

$C_8H_6BrN_3S$ ($M_r = 256.12$)

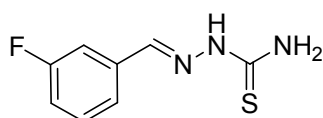
Ausbeute: 61%

GC-MS (EI): 12.38 min, m/z [%] = 256.90 ($[M^*]$, 64), 254.90 (62), 200.90 (14), 198.90 (13), 183.90 (21), 181.90 (21), 134.00 (15), 120.00 (26), 102.00 (16), 89.00 (11), 76.00 (16), 75.00 (17), 74.00 (100), 60.00 (12). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3325 (w), 2980 (m), 2360 (w), 1611 (w), 1517 (m), 1285 (m), 1058 (w), 979 (w), 940 (w), 746 (m), 686 (w), 486 (m), 446 (m).

Schmelzpunkt: 197.7 °C

5-(3-Fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (58):

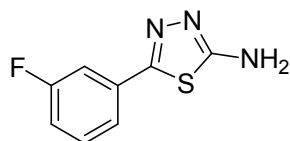


0.05 mol 3-Fluorbenzaldehyd in 75 ml warmem Wasser und 0.05 mol Thiosemicarbazid in 75 ml warmem Ethanol werden bei 60 °C bis zur Auskristallisation eines weißen Feststoffes (1 h) gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen und stellt das Thiosemicarbazon dar:

$\text{C}_8\text{H}_8\text{FN}_3\text{S}$ ($M_r = 197.23$)

LC-MS (EI+): 6.18 min, m/z [%] = 198.0 ($[\text{M}^+]$ 100).

FAB: 198.1 ($[\text{M}^+]$ 100).



0.05 mol Thiosemicarbazon werden in 300 ml warmem Wasser gelöst, mit 0.15 mol Eisen(III)chlorid in 300 ml Wasser versetzt und 45 min bei 60 °C gerührt. Danach wird 0.11 mol Zitronensäure und 0.05 mol Natriumacetat zugegeben und mit konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht. Der ausfallende Niederschlag ist das gewünschte Produkt und wird durch Filtration gewonnen.

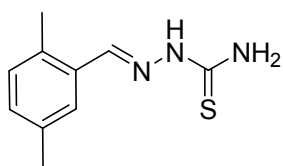
$\text{C}_8\text{H}_6\text{NF}_3\text{S}$ ($M_r = 195.22$)

Ausbeute: 64%

GC-MS (EI): 10.70 min, m/z [%] = 196.00 (14), 195.00 ($[\text{M}^*]$, 100), 139.00 (41), 122.00 (20), 121.00 (11), 95.10 (29), 75.10 (19), 74.00 (68). (Methode 1)

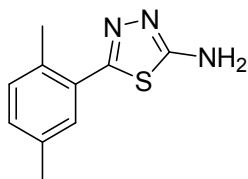
IR: [cm^{-1}] = 2980 (m), 1612 (w), 1586 (w), 1508 (m), 1442 (w), 1278 (m), 1140 (w), 1064 (w), 857 (m), 678 (m), 522 (w), 416 (m).

Schmelzpunkt: 225.3 °C

5-(2,5-Dimethylphenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (59):

0.05 mol 2-Brombenzaldehyd in 75 ml warmem Wasser und 0.05 mol Thiosemicarbazid in 75 ml warmem Ethanol werden bei 60 °C bis zur Auskristallisation eines weißen Feststoffes (1 h) gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen und stellt das Thiosemicarbazon dar:

$C_{10}H_{13}N_3S$ ($M_r = 207.30$)



0.05 mol Thiosemicarbazon werden in 300 ml warmem Wasser gelöst, mit 0.15 mol Eisen(III)chlorid in 300 ml Wasser versetzt und 45 min bei 60 °C gerührt. Danach wird 0.11 mol Zitronensäure und 0.05 mol Natriumacetat zugegeben und mit konzentriertem Ammoniak alkalisch gemacht. Der ausfallende Niederschlag ist das gewünschte Produkt und wird durch Filtration gewonnen.

$C_{10}H_{11}N_3S$ ($M_r = 205.28$)

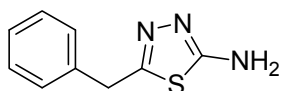
Ausbeute: 59%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 2.28 (s, 3H, -CH₃), 2.40 (s, 3H, -CH₃), 7.10 (s, 2H, -NH₂), 7.14-7.32 (m, 3H, 3', 4', 6'-H).

GC-MS (EI): 11.38 min, m/z [%] = 205.00 ($[M^*]$, 31), 163.00 (62), 162.00 (11), 148.00 (13), 136.00 (10), 134.00 (14), 131.10 (16), 130.10 (100), 103.10 (10), 77.10 (12), 74.00 (13). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3061 (w), 1639 (w), 1509 (s), 1148 (w), 1298 (w), 1073 (w), 830 (w), 811 (w), 698 (m), 536 (m), 482 (m), 452 (m), 413 (m).

Schmelzpunkt: 189.6. °C

5-Benzyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin (60):

2.58 g (0.022 mol) 2-Phenylacetonitril und 2.00 g (0.022 mol) Thiocarbohydrazid werden in 4 ml TFA gelöst und für 4 h bei 70-80 °C gerührt. Die Mischung wird auf Eis gege-

ben, 50 ml konzentrierter Ammoniak zugegeben und bei RT 1.5 h gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit kleinen Mengen Ethanol und Diethylether gewaschen. Man erhält das gewünschte Produkt in Form eines weißen Feststoffs.

$C_9H_9N_3S$ ($M_r = 191.25$)

Ausbeute: 64%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.93 (s, 2H, -CH₂), 7.03 (s, 2H, -NH₂), 7.10-7.57 (m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6'-H).

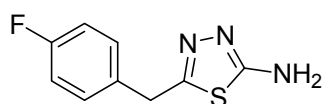
^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm]: 35.84 (-, -CH₂), 127.17 (+, 4'-C), 128.90 (+, 2', 3', 5', 6'-C), 138.40 (*, 1'-C), 157.86 (*, 5-C), 169.17 (*, 2-C).

GC-MS (EI): 10.67 min, m/z [%] = 191.00 ([M^{*}], 19), 190.00 (17), 150.00 (11), 149.00 (100), 122.00 (18), 121.00 (10), 116.10 (11), 91.10 (43), 74.00 (25), 65.10 (13). (Methode 1)

IR: [cm⁻¹] = 3083 (w), 1630 (w), 1518 (s), 1492 (m), 1453 (w), 1322 (w), 1145 (w), 1045 (w), 748 (m), 698 (s), 650 (m), 548 (m), 458 (w), 424 (m).

Schmelzpunkt: 202.9 °C

5-(4-Fluorobenzyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (61):



2.97 g (0.022 mol) 2-(4-Fluorophenyl)acetonitril und 2.00 g (0.022 mol) Thiocarbohydrazid werden in 4 ml TFA gelöst und für 4 h bei 70-80 °C gerührt. Die Mischung wird auf Eis gegeben, 50 ml konzentrierter Ammoniak zugegeben und bei RT 1.5 h gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit kleinen Mengen Ethanol und Diethylether gewaschen. Man erhält das gewünschte Produkt in Form eines weißen Feststoffs.

$C_9H_8FN_3S$ ($M_r = 209.24$)

Ausbeute: 68%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 4.17 (s, 2H, -CH₂), 7.08 (s, 2H, -NH₂), 7.11-7.39 (m, 4H, 2', 3', 5', 6'-H).

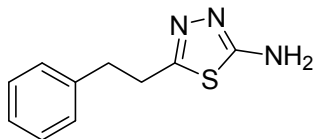
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm]: 37.42 (-, -CH₂-), 115.49 und 115.91 (+, $J = 21.10$ Hz, 4-Fluorphenyl-C3', C5'), 130.50 und 130.67 (+, $J = 8.05$ Hz, 4-Fluorphenyl-C2', C6'), 134.61 (*, $J = 3.05$ Hz, 4-Fluorphenyl-C1'), 157.74 (*, C5), (*, 159.91 und 164.82 (*, $J = 241.15$ Hz, Fluorphenyl-C4'), 169.18 (*, C2).

GC-MS (EI): 10.17 min, m/z [%] = 209.0 ([M^{*}], 29), 208.0 (15), 168.0 (10), 167.0 (100), 140.0 (19), 139.0 (10), 134.0 (11), 109.0 (50), 83.0 (12), 74.0 (29).
(Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3082 (m), 1604 (w), 1518 (s), 1453 (w), 1324 (m), 1215 (w), 1144 (m), 1045 (w), 748 (m), 698 (m), 548 (m), 509 (m), 422 (m).

Schmelzpunkt: 203.9 °C

5-Phenethyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin (62):



3-Phenylpropionsäure (14.42 g, 0.096 mol) und Thiosemicabazid (7.29 g, 0.08 mol) werden in 8.6 ml konzentrierter Schwefelsäure für 7 h bei 80-90 °C gerührt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und mit konzentriertem Ammoniak basisch gemacht. Das ausfallende Produkt wird abfiltriert und aus wässrigem Ethanol (10-15%) kristallisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$ ($M_r = 205.28$)

Ausbeute: 67%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 2.93 (t, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, -CH₂), 3.10 (t, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, -CH₂), 6.97 (s, 2H, -NH₂), 7.16-7.32 (m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm]: 31.46 (-, -CH₂-), 34.98 (-, -CH₂-), 120.57 (+, 6'-C), 128.67 (4', 8'-C), 128.80 (5', 7'-C), 140.65 (*, 3'-C), 157.78 (*, C2), 168.59 (*, C5).

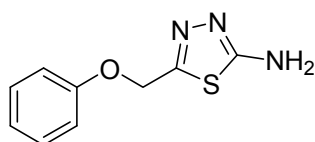
GC-MS (EI): 11.05 min, m/z [%] = 260.1 (16), 205.1 ($[M^*]$, 100), 204.1 (67), 188.0 (12), 130.10 (13), 128.1 (21), 115.1 (10), 114.0 (51), 91.10 (84), 65.1 (19), 60.0 (13). (Methode 1)

LC-MS (EI+): 13.38 min, m/z [%] = 206.00 ($[M^+]$).

IR: [cm^{-1}] = 3082 (w), 1629 (w), 1517 (s), 1453 (w), 1326 (w), 1144 (w), 1046 (w), 748 (w), 698 (s), 623 (m), 525 (m), 423 (m).

Schmelzpunkt: 170.3 °C

5-(Phenoxymethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amin (63):



2-Phenoxyessigsäure (14.61 g, 0.096 mol) und Thiosemicabazid (7.29 g, 0.08 mol) werden in 8.6 ml konzentrierter Schwefelsäure für 7 h bei 80-90 °C gerührt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen auf Eis gegeben und mit konzentriertem Ammoniak basisch gemacht. Das ausfallende Produkt wird abfiltriert und aus wässrigem Ethanol (10-15%) kristallisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

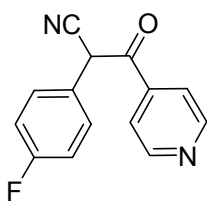
$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{OS}$ ($M_r = 207.25$)

Ausbeute: 66%

GC-MS (EI): 11.54 min, m/z [%] = 207.00 ($[M^*]$, 11), 114.00 (100), 94.10 (15), 65.10 (11), 60.00 (16), 59.00 (14). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3085 (w), 1598 (w), 1519 (s), 1493 (m), 1451 (w), 1368 (w), 1247 (m), 1040 (m), 749 (m), 687 (m), 501 (m).

Schmelzpunkt: 209.9 °C

2-(4-Fluorophenyl)-3-oxo-3-(pyridin-4-yl)propanenitril (64):

5.0 ml (0.04 mol) 2-(4-Fluorophenyl)acetonitril und 5.5 ml (0.04 mol) Isonicotinsäureethylester werden zu 55.5 ml (0.15 mol) Natriumethoxid-Lösung (21%ig) zugetropft. Anschließend wird die Reaktionmischung 4 h zum Sieden erhitzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 150 ml Wasser versetzt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 angesäuert. Man erhält einen gelben Niederschlag, der abfiltriert und mit Wasser gewaschen wird.

$C_{14}H_9FN_2O$ ($M_r = 240.23$)

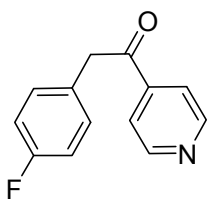
Ausbeute: 72%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.09-7.30 (m, 2H, 2',6'-H), 7.67-7.83 (m, 4H, 3',5', 2'', 6'', -H), 8.76-8.79 (m, 2H, 3'', 5''-H).

LC-MS (EI+): 14.14 min, m/z [%] = 241.1 ($[M^+]$ 100).

IR: [cm^{-1}] = 3085 (w), 2393 (m), 1598 (m), 1517 (m), 1336 (w), 1206 (m), 1023 (w), 832 (m), 748 (m), 506 (m).

Schmelzpunkt: 229.0 °C

2-(4-Fluorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)ethanon (65):

Eine Lösung von 2-(2-Fluorophenyl)-3-oxo-3-phenylpropanenitril (0.15 mol) in 48%iger HBr (130 ml) wird 19 h unter Rückfluss gerührt. Der Ansatz wird im Eisbad abgekühlt und filtriert. Beim Neutralisieren des Filtrats mit Ammoniakwasser (80 ml) fällt ein Niederschlag aus, welcher abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet wird. Man erhält ein hellgrau-beiges Pulver.

$C_{13}H_{10}FNO$ ($M_r = 215.22$)

Ausbeute: 58%

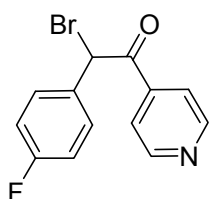
1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 4.46 (s, 2H, -CH₂), 7.09-7.18 (m, 2H), 7.25-7.33 (m, 2H), 7.88-7.91 (m, 2H), 8.81-8.83 (m, 2H).

GC-MS (EI): 8.76 min, m/z [%] = 215.0 ($[M^*]$, 20), 123.0 (100), 95.0 (42), 75 (11).
(Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 3061 (w), 2990 (w), 1598 (m), 1508 (m), 1409 (w), 1215 (m), 1148 (w),
1026 (w), 839 (w), 749 (m), 698 (m), 494 (m).

Schmelzpunkt: 229.3 °C

2-Bromo-2-(4-fluorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)ethanon (66):



Das Keton (29.4 mmol) wird in 150 ml Eisessig gelöst. Zur Reaktionslösung wird eine Mischung von 29.4 mmol Brom in 30 ml Eisessig getropft und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der Eisessig unter vermindertem Druck entfernt. Den entstehenden Feststoff abfiltrieren, mit Eisessig, Ethylactat und *n*-Hexan waschen und trocknen. Man erhält ein schwach gelbes Pulver.

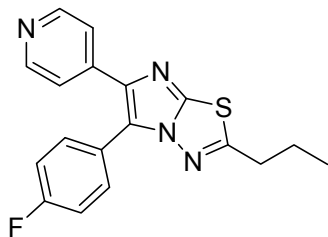
$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{BrFNO}$ ($M_r = 294.12$)

Ausbeute: 95%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.36-7.51 (m, 3H), 8.14-8.31 (m, 4H), 9.04-9.07 (m, 2H).

LC-MS (EI+): 8.81 min, m/z [%] = 294.0 (97), 295.9 (100).

5-(4-Fluorophenyl)-2-propyl-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (67):



Thiadiazol (0.01 mol) und Bromacetophenon (0.01 mol) werden in 30 ml Ethanol 12 h unter Rückfluss erhitzt. Der beim Abkühlen ausfallende kristalline Niederschlag wird nach Zusatz von 50 ml Ether abfiltriert. Anschließend erneut aus Ethanol umkristallisieren. Man erhält einen schmutzig weißen Feststoff.

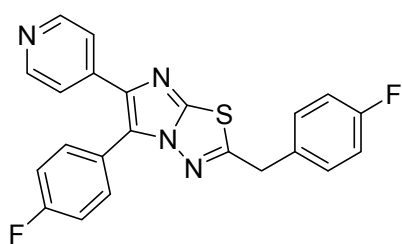
$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{S}$ ($M_r = 338.40$)

Ausbeute: 61%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.05 (t, 3H, $^3J = 7.3$ Hz, 1''-CH₃), 1.86 (Sechstett, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, 2''-CH₂-), 3.02 (t, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, 2''-CH₂-), 7.19-7.29 (m, 2H, 3'', 5''-H), 7.54-7.62 (m, 4H, 2', 6', 2'', 6''-H), 8.44-8.42 (m, 2H, 3'', 6''-H).

LC-MS (EI+): 10.24 min, m/z [%] = 339.1 ([M⁺], 100).

2-(4-Fluorobenzyl)-5-(4-fluorophenyl)-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (68):



Thiadiazol (0.01 mol) und Bromacetophenon (0.01 mol) werden in 30 ml Ethanol 12 h unter Rückfluss erhitzt. Der beim Abkühlen ausfallende kristalline Niederschlag wird nach Zusatz von 50 ml Ether abfiltriert. Anschließend erneut aus Ethanol umkristallisieren. Man erhält einen schmutzig weißen Feststoff.

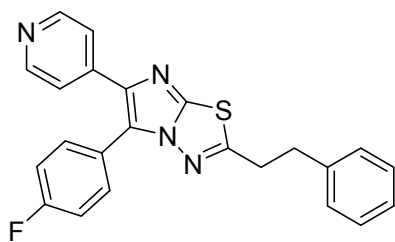
$\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_4\text{S}$ ($M_r = 404.44$)

Ausbeute: 58%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 4.30 (s, 2H, -CH₂-), 7.00-7.10 (m, 4H, 3', 7', 2'', 6''-H), 7.23-7.30 (m, 2H, 4', 5'-H), 7.49-7.56 (m, 4H, 3'', 5'', 2''', 6'''-H), 8.60-8.62 (m, 2H, 3''', 5'''-H).

GC-MS (EI): 32.55 min, m/z [%] = 406.1 (25), 405.1 (76), 404.2 ([M^{*}], 100), 403.1 (14), 166.0 (11), 165.00 (87), 148.0 (12), 122.0 (11), 121.1 (95), 109.1 (17), 104.1 (16). (Methode 2)

5-(4-Fluorophenyl)-2-phenethyl-6-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (69):



Thiadiazol (0.01 mol) und Bromacetophenon (0.01 mol) werden in 30 ml Ethanol 12 h unter Rückfluss erhitzt. Der beim Abkühlen ausfallende kristalline Niederschlag wird nach Zusatz von 50 ml Ether

abfiltriert. Anschließend erneut aus Ethanol umkristallisieren. Man erhält einen schmutzig weißen Feststoff.

$C_{23}H_{17}FN_4S$ ($M_r = 400.47$)

Ausbeute: 57%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.04 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, $-CH_2-$), 3.37 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, $-CH_2-$), 7.19-7.46 (m, 9H, 2', 3', 4', 5', 6', 3'', 5'', 2''', 6'''-H), 7.54-7.61 (m, 2H, 2'', 6''-H), 8.46-8.49 (m, 2H, 3''', 5'''-H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm]: 33.20 (-, $-CH_2-$), 34.17 (-, $-CH_2-$), 116.33 und 116.76 (+, $J = 21.75$ Hz, 4-Fluorphenyl- $C3'$, $C5'$), 121.11 (+, Pyridin- $C2''$, $C6''$), 124.46 (*, $C5$), 126.78 (+, Phenyl- $C4'$), 128.76 (+, Phenyl- $C2'$, 6'), 128.93 (+, Phenyl- $C3'$, 5'), 132.13 und 132.30 (+, $J = 8.45$ Hz, 4-Fluorphenyl- $C2'$, $C6'$), 135.05 (*, $C6$), 138.36 (*, 4-Fluorphenyl- $C1'$), 139.83 (+, $C8$), 141.82 (*, Phenyl- $C1'$), 145.16 (*, $C2$), (*, Pyridin- $C1''$), 150.19 (+, Pyridin- $C3''$, 5''), 160.92 und 165.92 (*, $J = 250.20$ Hz, Fluorphenyl- $C4'$).

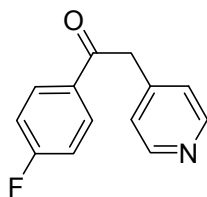
GC-MS (EI): 26.10 min, m/z [%] = 401.1 (29), 400.1 ($[M^*]$, 100), 165.0 (63), 121.0 (67). (Methode 1)

LC-MS (EI+): 16.29 min, m/z [%] = 401.2 ($[M^+]$, 100).

IR: [cm^{-1}] = 1672 (w), 1598 (m), 1537 (w), 1482 (w), 1217 (m), 1158 (m), 966 (w), 837 (s), 749 (m), 698 (m), 658 (m), 619 (m), 549 (m), 526 (m), 494 (m).

Schmelzpunkt: 131.3 °C

1-(4-Fluorphenyl)-2-(pyridin-4-yl)ethanon (70):



Zu einer Mischung aus 4-Methylpyridin (5.0 g, 53.7 mmol) und 4-Fluorobenzoesäureethylester (9.0 g, 53.7 mmol) in THF (40 ml) werden 53.7 ml Lithiumbis(trimethylsilyl)amid (1.0 M Lösung in THF) tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Nach 1 h rühren bei 0 °C

wird die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt, Hexan (138 ml) zugegeben und filtriert. Der Feststoff wird in 3 N HCl (50 ml) gelöst. Die Lösung wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

C₁₃H₁₀FNO (M_r = 215.22)

Ausbeute: 62%

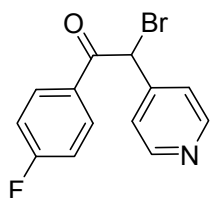
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 4.48 (s, 2H, -CH₂), 7.27-7.41 (m, 4H, 2'', 6'', 3', 5'-H), 8.09-8.17 (m, 2H, 2', 6'-H), 8.17-8.52 (m, 2H, 3', 5'-H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 45.87 (-, -CH₂-), 115.93 und 116.34 (+, *J* = 21.75 Hz, 4-Fluorphenyl-C3', C5'), 125.75 (+, Pyridin-C2'', C6''), 131.57 und 131.77 (+, *J* = 9.50 Hz, 4-Fluorphenyl-C2', C6'), 133.34 und 133.29 (*, *J* = 2.85 Hz, 4-Fluorphenyl-C1'), 144.39 (*, Pyridin-C1''), 149.71 (+, Pyridin-C3'', 5''), (*, 163.04 und 168.05 (*, *J* = 250.60 Hz, Fluorphenyl-C4'), 195.48 (*, Carbonyl-C).

GC-MS (EI): 8.80 min, m/z [%] = 215.1 ([M*], 17), 123.1 (100), 95.1 (38).
(Methode 1)

LC-MS (EI+): 5.51 min, m/z [%] = 216. ([M⁺], 100)

2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)-2-(pyridin-4-yl)ethanon (71):



Das Keton (29.4 mmol) wird in 150 ml Eisessig gelöst. Zur Reaktionslösung wird eine Mischung von 29.4 mmol Brom in 30 ml Eisessig getropft und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der Eisessig unter vermindertem Druck entfernt. Den entstehenden Feststoff abfiltrieren, mit Eisessig, Ethylactat und *n*-Hexan waschen und trocknen. Man erhält ein schwach gelbes Pulver.

C₁₃H₉BrFNO (M_r = 294.12)

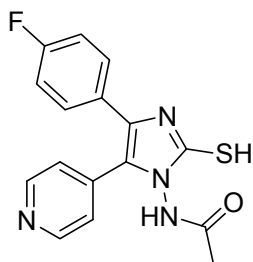
Ausbeute: 92%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 6.98 (s, 1H, -CH-), 7.37-7.41 (m, 2H, 2'', 6''-H), 7.73-8.09 (m, 2H, 3', 5'-H), 8.16-8.19 (m, 2H, 2', 6'-H), 8.95-8.98 (m, 2H, 3'', 5''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm]: 44.68 (+, -CH-), 116.23 und 116.74 (+, $J = 22.20$ Hz, 4-Fluorphenyl-C3', C5'), 128.48 (+, Pyridin-C2'', C6''), 130.41 und 130.47 (*, $J = 2.80$ Hz, 4-Fluorphenyl-C1'), 132.84 und 133.03 (+, $J = 9.55$ Hz, 4-Fluorphenyl-C2', C6'), 155.31 (*, Pyridin-C1''), 142.37 (+, Pyridin-C3'', 5''), (*, 163.42 und 168.46 (*, $J = 252.25$ Hz, Fluorphenyl-C4'), 189.47 (*, Carbonyl-C).

LC-MS (EI+): 7.14 min, m/z [%] = 294.0 (100), 296.0 (91).

***N*-(4-(4-Fluorophenyl)-2-mercapto-5-(pyridin-4-yl)-1*H*-imidazol-1-yl)acetamid
(72):**



Zu einer Lösung aus 17.24 g (0.0586 mol) 2-Bromo-2-(4-fluorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)ethanon in 230 ml Eisessig werden 5.03 g (0.0879 mol) KSCN gegeben. Nach 30 min erfolgt der Zusatz von 4.34 g (0.0586 mol) Acetohydrazid. Da nach einer Reaktionszeit von 4 h keine Umsetzung

zum Produkt stattgefunden hat (DC-Kontrolle; Ethylacetat/*n*-Hexan 1:1), wurde die Mischung für 2 h auf 80 °C erwärmt. Durch Zugabe von Wasser fällt ein Feststoff aus, der durch Filtration gewonnen wird. Nach Umkristallisation aus Methanol wird das gewünschte Produkt erhalten.

$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FN}_4\text{OS}$ ($M_r = 328.36$)

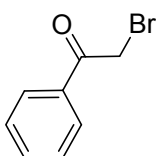
Ausbeute: 13%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.90 (s, 3H, -CH₃), 7.22-7.32 (m, 6H, 2', 3', 5', 6', 2'', 6''-H), 8.46-8.49 (m, 2H, 3'', 5''-H), 9.63 (s, 1H, -NH), 10.25 (s, 1H, -SH).

GC-MS (EI): 21.16 min, m/z [%] = 328.0 ($[M^*]$, 49), 310.0 (38), 286.0 (57), 270.0 (73), 256.0 (56), 229.0 (21), 197.0(50), 157.0 (18), 139.0 (100), 95.0 (16). (Methode 1)

HPLC-Reinheit (Retentionszeit): 98.27 ($t_R = 3.83$ min)

2-Bromo-1-(phenyl)ethanon (73):



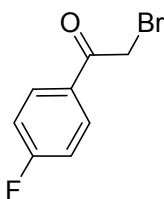
Zu 8.41 g (0.07 mol) Acetophenon in 70 ml Dichlormethan werden langsam 3.68 ml (0.07 mol) Brom bei Raumtemperatur zugetropft. Nach vollständiger Umsetzung des Broms werden weitere 10 min gerührt. Danach wird die Reaktionslösung mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und das Dichlormethan unter vermindertem Druck entfernt. Durch Zugabe von kaltem Ethanol kann die gewünschte Endverbindung zur Kristallisation gebracht werden.

C_8H_7BrO ($M_r = 199.04$)

Ausbeute: 95%

1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 4.46 (s, 2H), 7.45-7.66 (m, 3H, 3', 4', 5'-H), 7.96-8.02 (m, 2H, 2', 6'-H).

2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon (74):



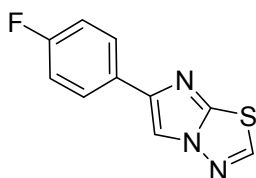
Zu 9.71 g (0.07 mol) 4-Fluoracetophenon in 70 ml Dichlormethan werden langsam 3.68 ml (0.07 mol) Brom bei Raumtemperatur zugetropft. Nach vollständiger Umsetzung des Broms werden weitere 10 min gerührt. Danach wird die Reaktionslösung mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und das Dichlormethan unter vermindertem Druck entfernt. Durch Zugabe von kaltem Ethanol kann die gewünschte Endverbindung zur Kristallisation gebracht werden.

C_8H_6BrFO ($M_r = 217.04$)

Ausbeute: 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 4.42 (s, 2H), 7.13-7.22 (m, 2H, 3', 4'-H), 8.00-8.07 (m, 2H, 2', 6'-H).

6-(4-Fluorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (75):



0.05mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtration abtrennen.

$\text{C}_{10}\text{H}_6\text{FN}_3\text{S}$ ($M_r = 219.24$)

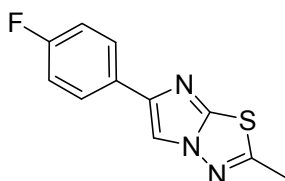
Ausbeute: 42%

GC-MS (EI): 21.16 min, m/z [%] = 220.0 (13), 219.0 ($[\text{M}^*]$, 100), 192.0 (24), 165.0 (56), 134.0 (11), 121.0 (86), 94.0 (11), 82.5 (20). (Methode 1)

IR: [cm^{-1}] = 1597 (m), 1540 (w), 1482 (w), 1217 (m), 1157 (m), 839 (s), 749 (m), 699 (m), 659 (m), 619 (w), 550 (m), 527 (m), 494 (m).

Schmelzpunkt: 257.4 °C

6-(4-Fuorophenyl)-2-methylimidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (76):



0.05mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtration abtrennen.

$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FN}_3\text{S}$ ($M_r = 233.26$)

Ausbeute: 45%

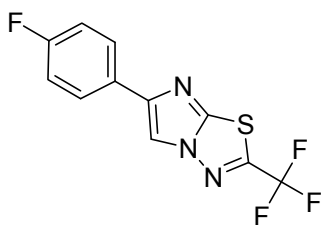
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm] = 2.56 (s, 3H, -H), 7.42-7.51 (m, 2H, 3'', 5''-H), 8.08-8.15 (m, 2H, 2'', 6''-H), 9.89 (s, 1H).

GC-MS (EI): 11.00 min, m/z [%] = 235.0 (17), 234.0 (43), 233.0 ([M*], 94), 192.0 (52), 166.0 (20), 165.0 (100), 164.0 (11), 134.0 (31), 122.1 (27), 121.1 (95), 116.6 (11), 95.1 (11), 94.1 (33), 82.5 (20), 75.1 (11), 71.0 (12), 70.0 (13). (Methode 2)

IR: [cm⁻¹] = 2995 (w), 1689 (w), 1626 (m), 1591 (w), 1548 (m), 1508 (w), 1409 (w), 1223 (s), 1164 (m), 998 (w), 844 (s), 748 (m), 614 (m), 584 (s), 562 (m).

Schmelzpunkt: 250.7 °C

6-(4-Fluorophenyl)-2-(trifluoromethyl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (77):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtration abtrennen.

C₁₁H₆F₄N₃S (M_r = 287.24)

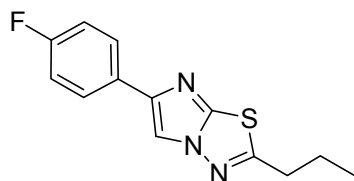
Ausbeute: 49%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.23-7.32 (m, 2H, 3'', 5''-H), 7.90-7.97 (m, 2H, 2'', 6''-H), 8.91 (s, 1H).

GC-MS (EI): 8.78 min, m/z [%] = 288.0 (14), 287.0 ([M*], 100), 192.0 (12), 165.0 (49), 121.0 (82), 94.0 (10). (Methode 2)

IR: [cm⁻¹] = 2966 (w), 1688 (w), 1625 (m), 1548 (m), 1225 (m), 1164 (m), 998 (w), 844 (m), 748 (w), 675 (m), 584 (s), 561 (s).

Schmelzpunkt: 252.0 °C

6-(4-Fluorophenyl)-2-propylimidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (78):

0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtration abtrennen.

$C_{13}H_{12}FN_3S$ ($M_r = 261.32$)

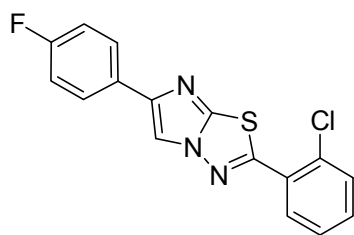
Ausbeute: 81%

GC-MS (EI): 12.20 min, m/z [%] = 263.1 (28), 262.1 (73), 261.2 ($[M^*]$, 96), 232.0 (11), 193.0 (15), 192.0 (94), 167.0 (19), 166.0 (42), 165.0 (100), 135.1 (15), 134.1 (63), 133.1 (10), 130.6 (10), 122.1 (41), 121.0 (98), 107.1 (12), 95.1 (13), 94.1 (39), 75.1 (11), 71.0 (16), 70.1 (14). (Methode 2)

IR: [cm^{-1}] = 2361 (m), 1570 (w), 1518 (m), 1437 (m), 1233 (m), 1168 (m), 1048 (m), 947 (m), 804 (s), 727 (m), 565 (m), 504 (s).

HRMS: berechnet für $C_{13}H_{12}N_3SF$ [M^+] 261.0736, gemessen 261.0746.

Schmelzpunkt: 210.3 °C

2-(2-Chlorophenyl)-6-(4-fluorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (79):

0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtration abtrennen.

$C_{16}H_9ClFN_3S$ ($M_r = 329.78$)

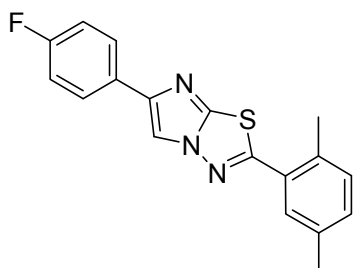
Ausbeute: 81%

LC-MS (EI+): 10.75 min, m/z [%] = 330.2 (100), 332.2 (34).

IR: [cm^{-1}] = 2874 (w), 1691 (w), 1626 (m), 1561 (m), 1496 (m), 1234 (s), 1161 (w), 1061 (m), 833 (s), 767 (m), 754 (s), 731 (m), 603 (m), 559 (m), 513 (w).

Schmelzpunkt: 195.3 °C

2-(2,5-Dimethylphenyl)-6-(4-fluorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (80):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtration abtrennen.

$C_{18}H_{14}FN_3S$ ($M_r = 323.39$)

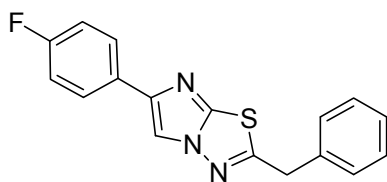
Ausbeute: 79%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 2.33 (s, 3H, -CH₃), 2.50 (s, 3H, -CH₃), 7.19-7.30 (m, 4H, 3', 4', 3'', 5''-H), 7.49 (s, 1H, 6'-H), 7.87-7.93 (m, 2H, 2'', 6''-H), 8.72 (s, 1H).

GC-MS (EI): 19.18 min, m/z [%] = 324.0 (22), 323.0 ([M^{*}], 100), 192.0 (21), 165.0 (74), 134.0 (13), 121.0 (83), 116.0 (14). (Methode 2)

Schmelzpunkt: 165.8 °C

2-Benzyl-6-(4-fluorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (81):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch

Filtration abtrennen.

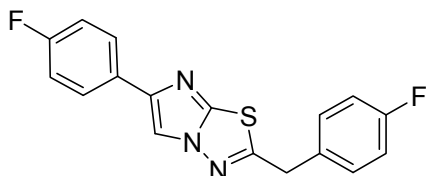
$C_{17}H_{12}FN_3S$ ($M_r = 309.36$)

Ausbeute: 77%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] = 4.42 (s, 2H, -CH₂-), 7.17-7.39 (m, 7H, 2', 3', 4', 5', 6', 3'', 5''-H), 7.83-7.90 (m, 2H, 3'', 5''-H), 8.61 (s, 1H).

GC-MS (EI): 17.19 min, m/z [%] = 311.0 (16), 310.0 (48), 309.1 ([M^{*}], 99), 192.0 (29), 166.0 (15), 165.0 (96), 134.0 (23), 122.0 (17), 121.1 (100), 116.1 (10), 94.0 (14), 91.1 (21), 90.1 (11), 89.1 (11). (Methode 2)

2-(4-Fluorobenzyl)-6-(4-fluorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (82):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)-ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch

Filtration abtrennen.

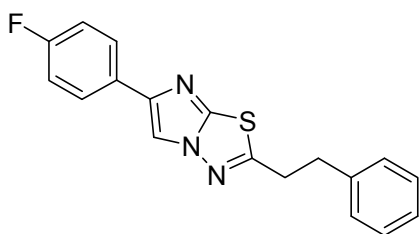
C₁₇H₁₁F₂N₃S (M_r = 327.35)

Ausbeute: 77%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 4.45 (s, 2H, -CH₂-), 7.15-7.29 (m, 4H, 2', 3', 5', 6'-H), 7.41-7.48 (m, 2H, 3'', 5''-H), 7.82-7.90 (m, 2H, 2'', 6''), 8.66 (s, 1H).

GC-MS (EI): 17.35 min, m/z [%] = 329.0 (17), 328.0 (53), 327.1 ([M^{*}], 100), 192.0 (27), 166.0 (13), 165.0 (90), 135.0 (10), 134.0 (26), 122.0 (13), 121.1 (95), 109.1 (17), 107.0 (11), 94.0 (10). (Methode 2)

6-(4-Fluorophenyl)-2-phenethylimidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (83):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)-ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch

Filtration abtrennen.

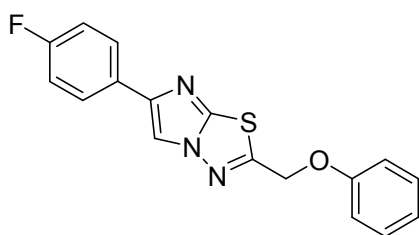
C₁₈H₁₄FN₃S (M_r = 323.39)

Ausbeute: 79%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.06 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.39 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 7.08-7.41 (m, 5H, 4', 5', 6', 7', 8'-H), 7.64-7.91 (m, 4H, 2'', 3'', 5'', 6''-H).

IR: [cm^{-1}] = 2860 (w), 1695 (w), 1596 (m), 1536 (w), 1474 (m), 1338 (w), 1196 (m), 1056 (m), 936 (w), 840 (s), 752 (s), 688 (s), 649 (m), 565 (m), 530 (m).

6-(4-Fluorophenyl)-2-(phenoxyethyl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (84):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-(4-fluorophenyl)ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch

Filtration abtrennen.

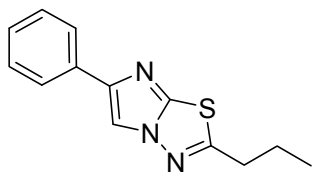
$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{OS}$ ($M_r = 325.36$)

Ausbeute: 79%

GC-MS (EI): 18.43 min, m/z [%] = 325.0 ($[\text{M}^*]$, 35), 233.0 (14), 232.0 (100), 192.0 (29), 165.0 (31), 121.0 (45), 65.1 (11). (Methode 2)

Schmelzpunkt: 239.4 °C

6-Phenyl-2-propylimidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (85):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-phenylethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtration abtrennen.

$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}$ ($M_r = 243.33$)

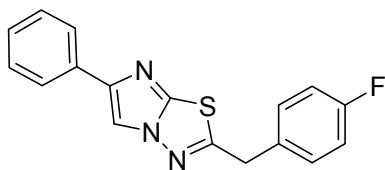
Ausbeute: 76%

LC-MS (EI+): 8.94 min, m/z [%] = 244.1 ($[\text{M}^+]$ 100).

IR: [cm^{-1}] = 1473 (m), 1176 (m), 1061 (m), 935 (w), 808 (w), 731 (s), 685 (s), 656 (m), 494 (w).

Schmelzpunkt: 117.8 °C

2-(4-Fluorobenzyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (86):



0.05 mol des entsprechenden 1,3,4-Thiadiazol-2-amin und 0.05 mol 2-Bromo-1-phenyl-ethanon in 100 ml Ethanol 12 h auf Siedetemperatur erwärmen. Das beim Abkühlen in Form von weißen Kristallen ausfallende Produkt durch Filtra-

tion abtrennen.

$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{S}$ ($M_r = 309.36$)

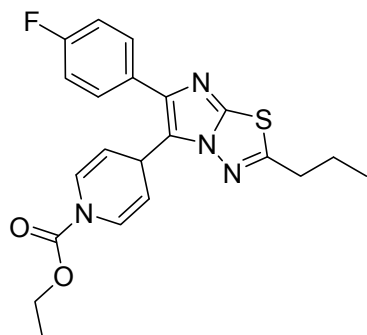
Ausbeute: 78%

LC-MS (EI+): 8.97 min, m/z [%] = 310.2 ($[\text{M}^+]$ 100).

IR: [cm^{-1}] = 1601 (w), 1508 (m), 1472 (m), 1220 (m), 1156 (m), 936 (w), 837 (m), 809 (m), 741 (m), 692 (s), 647 (m), 528 (m), 513 (m), 480 (m).

Schmelzpunkt: 185.0 °C

Ethyl 4-(6-(4-fluorophenyl)-2-propylimidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol-5-yl)pyridine-1(4*H*)-carboxylat (87):



3.0 mmol des 2,6-disubstituierte Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]-thiadiazol in 10 ml DCM und 15.0 mmol Pyridin lösen. Die Mischung auf 0 °C abkühlen und tropfenweise 10 mmol Ethylchloroformiat zugeben ohne die Temperatur der Reaktionsmischung über 5 °C ansteigen zu lassen.

Den Ansatz über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach erfolgter DC Kontrolle (Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2) eine weitere Portion Pyridin und Ethylchloroformiat bei 0 °C zugeben, um verbliebenes Edukt umzusetzen. Reaktionsmischung in Wasser gießen und mehrmals mit DCM extrahieren.

Die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 trocknen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bis auf 15-20 ml entfernen. Durch Zugabe von *n*-Hexan das gewünschte Produkt auskristallisieren.

$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_4\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 412.48$)

Ausbeute: 56%

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ [ppm]: 13.33 (+, Propyl- CH_3), 14.36 (+, Ethyl- CH_3), 21.70 (-, Propyl- CH_2 -), 29.63 (+, Pyridinyl- $\text{C}1''$), 33.87 (-, Propyl- CH_2 -), 62.55 (-, Ethyl- CH_2 -), 105.56 (+, Pyridin- $\text{C}2''$, $\text{C}6''$), 114.84 und 115.27 (+, $J = 21.35$ Hz, 4-Fluorphenyl- $\text{C}3'''$, $\text{C}5'''$), 124.09 (*, $\text{C}5$), 124.81 (+, Pyridin- $\text{C}3''$, $56''$), 129.69 und 129.85 (+, $J = 8.00$ Hz, 4-Fluorphenyl- $\text{C}2'$, $\text{C}6'$), 130.71 und 130.77 (*, $J = 3.00$ Hz, 4-Fluorphenyl- $\text{C}1'$), 140.88 (*, $\text{C}8$), 143.95 (*, $\text{C}5$), 151.32 (*, Carbonyl- C), 159.70 und 164.60 (*, $J = 244.95$ Hz, Fluorphenyl- $\text{C}4'$), 163.52 (*, $\text{C}2$).

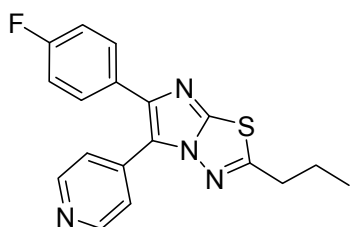
LC-MS (EI+): 10.09 min, m/z [%] = 413.2 ($[\text{M}^+]$ 100).

IR: [cm^{-1}] = 1713 (m), 1473 (w), 1332 (m), 1310 (m), 1215 (m), 1116 (m), 979 (m), 843 (s), 805 (m), 726 (s), 543 (m).

HRMS: berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2\text{SF}$ [M^+] 412.1369, gemessen 412.1336.

Schmelzpunkt: 135.2 °C

6-(4-Fluorophenyl)-2-propyl-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (88):



Zu 5 mmol des Intermediates (87) in 1.60 ml Mesitylene werden 5.0 mmol elementarer Schwefel zugesetzt. Den Ansatz für 2 h auf Siedetemperatur erwärmen. Nach dem Abkühlen das Produkt durch Säulenchromatographie reinigen. (Gradient: *n*-Hexan zur vollständigen Abtrennung des Mesitylen (DC-

Kontrolle) anschließen Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2).

$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{S}$ ($M_r = 338.40$)

Ausbeute: 61%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.09 (t, 3H, ³*J* = 7.3 Hz, -H), 1.87 (Sechstett, 2H, ³*J* = 7.3 Hz, -H), 3.02 (t, 2H, ³*J* = 7.3 Hz, -H), 7.02-7.11 (m, 2H, 3'', 5''-H), 7.54-7.61 (m, 4H, 2'', 6'', 2''', 6'''-H), 8.60-8.63 (m, 2H, 3''', 5'''-H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm]: 13.38 (+, Propyl-CH₃), 22.32 (-, Propyl-CH₂-), 33.90 (-, Propyl-CH₂-), 115.41 und 115.84 (+, *J* = 21.55 Hz, 4-Fluorphenyl-C3''', C5'''), 120.63 (*, C5), 121.84 (+, Pyridin-C2'', C6''), 129.98 und 130.24 (+, *J* = 13.20 Hz, 4-Fluorphenyl-C2', C6'), 130.19 (*, Fluorphenyl-C1'), 136.59 (*, C6), 143.81 (*, C8), 146.18 (*, Pyridinyl-C1''), 149.88 (+, Pyridin-C3'', 5''), 160.18 und 165.16 (*, *J* = 249.40 Hz, Fluorphenyl-C4'), 165.11 (*, C2).

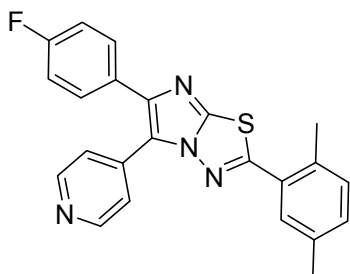
GC-MS (EI): 19.13 min, *m/z* [%] = 339.1 (21), 338.1 ([M⁺], 100), 165.0 (39), 121.0 (44). (Methode 2)

IR: [cm⁻¹] = 2360 (w), 1595 (m), 1460 (m), 1213 (s), 1159 (m), 842 (s), 811 (m), 737 (w), 684 (m), 597 (m), 529 (m).

HRMS: berechnet für C₁₈H₁₅N₄SF [M⁺] 338.1001, gemessen 338.0988.

Schmelzpunkt: 141.6 °C

2-(2,5-Dimethylphenyl)-6-(4-fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (89):



3.0 mmol des 2,6-disubstituierte Imidazo[2,1-*b*][1,3,4]-thiadiazol in 10 ml DCM und 15.0 mmol Pyridin lösen. Die Mischung auf 0 °C abkühlen und tropfenweise 10 mmol Ethylchloroformiat zugeben ohne die Temperatur der Reaktionsmischung über 5 °C ansteigen zu lassen.

Den Ansatz über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach erfolgter DC Kontrolle (Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2) eine weitere

Portion Pyridin und Ethylchloroformiat bei 0 °C zugeben, um verbliebenes Edukt umzusetzen. Reaktionsmischung in Wasser gießen und mehrmals mit DCM extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ trocknen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernen.

Zu 5.0 mmol des des Intermediates in 1.60 ml Mesitylene werden 5.0 mmol elementaren Schwefel zugesetzt. Durch Destillation verbliebenes Pyridin abtrennen, anschließend den Ansatz 2 h auf Siedetemperatur erwärmen. Nach dem Abkühlen das Produkt durch Säulenchromatographie reinigen. (Gradient: *n*-Hexan zur vollständigen Abtrennung des Mesitylen (DC-Kontrolle) anschließen Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2).

C₂₃H₁₇FN₄S (M_r = 400.47)

Ausbeute: 59%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.42 (s, 3H, -CH₃), 2.61 (s, 3H, -CH₃), 7.06-7.11 (m, 2H, 3', 4'-H), 7.26 (s, 3H, 6', 3'', 5''-H), 7.60-7.67 (m, 4H, 2'', 6'', 2''', 6'''-,H), 8.62-8.65 (m, 2H, 3''', 5'''-H).

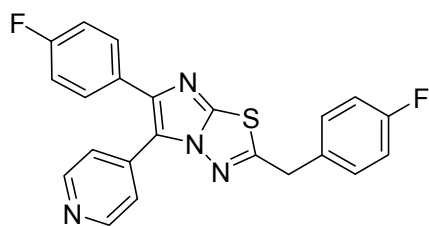
GC-MS (EI): 26.89 min, m/z [%] = 402.1 (39), 401.1 (99), 400.3 ([M⁺], 94), 399.9 (93), 167.0 (14), 166.00 (29), 165.0 (100), 148.0 (12), 131.1 (16), 130.1 (13), 122.0 (24), 121.1 (99), 116.1 (31), 104.0 (30), 103.1 (11), 94.0 (14), 77.0 (19). (Methode 2)

LC-MS (EI+): 9.34 min, m/z [%] = 401.2 ([M⁺] 100).

IR: [cm⁻¹] = 1594 (w), 1474 (m), 1349 (w), 1217 (m), 1090 (w), 979 (w), 844 (m), 820 (w), 677 (m), 611 (w), 538 (m), 450 (m).

HRMS: berechnet für C₂₃H₁₇N₄SF [M⁺] 400.1158, gemessen 400.1153.

2-(4-Fluorobenzyl)-6-(4-fluorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (90):



3.0 mmol des 2,6-disubstituierte Imidazo[2,1-*b*]-[1,3,4]thiadiazol in 10 ml DCM und 15.0 mmol Pyridin lösen. Die Mischung auf 0 °C abkühlen und tropfenweise 10 mmol Ethylchloroformiat zugeben ohne die Temperatur der Reaktionsmischung über 5

°C ansteigen zu lassen. Den Ansatz über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach erfolgter DC Kontrolle (Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2) eine weitere Portion Pyridin und Ethylchloroformiat bei 0 °C zugeben, um verbliebenes Edukt umzusetzen. Reaktionsmischung in Wasser gießen und mehrmals mit DCM extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ trocknen und das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernen.

Zu 5.0 mmol des des Intermediates in 1.60 ml Mesitylene werden 5.0 mmol elementaren Schwefel zugesetzt. Durch Destillation verbliebenes Pyridin abtrennen, anschließend den Ansatz 2 h auf Siedetemperatur erwärmen. Nach dem Abkühlen das Produkt durch Säulenchromatographie reinigen. (Gradient: *n*-Hexan zur vollständigen Abtrennung des Mesitylen (DC-Kontrolle) anschließen Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2).

C₂₂H₁₄F₂N₄S (M_r = 404.44)

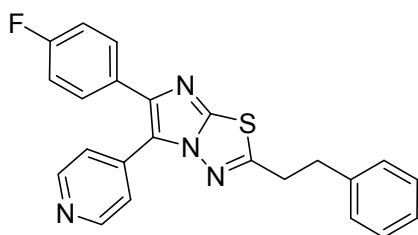
Ausbeute: 58%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 4.34 (s, 2H, -CH₂-), 7.03-7.13 (m, 4H, 3', 7', 2'', 6''-H), 7.27-7.32 (m, 2H, 4', 5'-H), 7.53-7.60 (m, 4H, 3'', 5'', 2''', 6'''-H), 8.63-8.66 (m, 2H, 3''', 5'''-H).

IR: [cm⁻¹] = 2359 (w), 1596 (m), 1459 (m), 1216 (s), 1159 (m), 990 (w), 843 (s), 819 (m), 763 (m), 669 (m), 596 (m), 542 (m), 477 (m).

HRMS: berechnet für C₂₂H₁₄F₂N₄S [M⁺] 404.0907, gemessen 404.0894.

Schmelzpunkt: 201.9 °C

6-(4-Fluorophenyl)-2-phenethyl-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (91):

3.0 mmol des 2,6-disubstituierte Imidazo[2,1-*b*]-[1,3,4]thiadiazol in 10 ml DCM und 15.0 mmol Pyridin lösen. Die Mischung auf 0 °C abkühlen und tropfenweise 10 mmol Ethylchloroformiat zugeben ohne die Temperatur der Reaktionsmischung über 5

°C ansteigen zu lassen. Den Ansatz über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach erfolgter DC Kontrolle (Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2) eine weitere Portion Pyridin und Ethylchloroformiat bei 0 °C zugeben, um verbliebenes Edukt umzusetzen. Reaktionsmischung in Wasser gießen und mehrmals mit DCM extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ trocknen und das Lösungsmittel unter verminderem Druck entfernen.

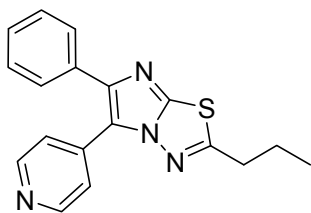
Zu 5.0 mmol des des Intermediates in 1.60 ml Mesitylene werden 5.0 mmol elementaren Schwefel zugesetzt. Durch Destillation verbliebenes Pyridin abtrennen, anschließend den Ansatz 2 h auf Siedetemperatur erwärmen. Nach dem Abkühlen das Produkt durch Säulenchromatographie reinigen. (Gradient: *n*-Hexan zur vollständigen Abtrennung des Mesitylen (DC-Kontrolle) anschließen Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2).

C₂₃H₁₇FN₄S (M_r = 400.47)

Ausbeute: 59%

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.14 (t, 2H, ³*J* = 7.55 Hz, -CH₂-), 3.39 (t, 2H, ³*J* = 7.37 Hz, -CH₂-), 7.21-7.48 (m, 9H, 2', 3', 4', 5', 6', 3'', 5'', 2'', 6''-H), 7.51-7.59 (m, 2H, 2''', 6'''-H), 8.48-8.51 (m, 2H, 3'', 5''-H).

LC-MS (EI+): 19.71 min, m/z [%] = 401.2 ([M⁺] 100).

6-Phenyl-2-propyl-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazol (92):

3.0 mmol des 2,6-disubstituierte Imidazo[2,1-*b*]-[1,3,4]thiadiazol in 10 ml DCM und 15.0 mmol Pyridin lösen. Die Mischung auf 0 °C abkühlen und tropfenweise 10 mmol Ethylchloroformiat zugeben ohne die Temperatur der Reaktionsmischung über 5

°C ansteigen zu lassen. Den Ansatz über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach erfolgter DC Kontrolle (Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2) eine weitere Portion Pyridin und Ethylchloroformiat bei 0 °C zugeben, um verbliebenes Edukt umzusetzen. Reaktionsmischung in Wasser gießen und mehrmals mit DCM extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ trocknen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernen.

Zu 5.0 mmol des des Intermediates in 1.60 ml Mesitylene werden 5.0 mmol elementaren Schwefel zugesetzt. Durch Destillation verbliebenes Pyridin abtrennen, anschließend den Ansatz 2 h auf Siedetemperatur erwärmen. Nach dem Abkühlen das Produkt durch Säulenchromatographie reinigen. (Gradient: *n*-Hexan zur vollständigen Abtrennung des Mesitylen (DC-Kontrolle) anschließen Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2).

C₁₈H₁₆N₄S (M_r = 320.41)

Ausbeute: 57%

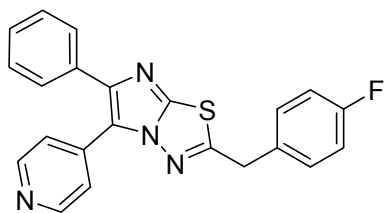
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.09 (t, 3H, ³*J* = 7.28 Hz, -CH₃), 1.86 (Sechstett, 2H, ³*J* = 7.54 Hz, -CH₂-), 3.02 (t, 2H, ³*J* = 7.30 Hz, -CH₂-), 7.35-7.39 (m, 3H, 2'', 4'', 6'', -H), 7.57-7.63 (m, 4H, 3'', 5'', 2''', 6'''-H), 8.59-8.62 (3''', 5'''-H).

GC-MS (EI): 19.84 min, *m/z* [%] = 322.1 (18), 321.1 (56), 320.1 ([M⁺], 100), 319.1 (24), 250.0 (10), 148.0 (22), 147.0 (87), 146.0 (17), 104.1 (23), 103.1 (78). (Methode 2)

IR: [cm⁻¹] = 1560 (m), 1458 (w), 1344 (w), 1216 (w), 1063 (w), 989 (w), 921 (w), 759 (m), 698 (s), 646 (m), 515 (w).

HRMS: berechnet für C₁₈H₁₆N₄S [M⁺] 320.1096, gemessen 320.1078.

Schmelzpunkt: 137.7 °C

2-(4-Fluorobenzyl)-6-phenyl-5-(pyridin-4-yl)imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazol (93):

3.0 mmol des 2,6-disubstituierte Imidazo[2,1-*b*]-[1,3,4]thiadiazol in 10 ml DCM und 15.0 mmol Pyridin lösen. Die Mischung auf 0 °C abkühlen und tropfenweise 10 mmol Ethylchloroformiat zugeben ohne die Temperatur der Reaktionsmischung über 5

°C ansteigen zu lassen. Den Ansatz über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach erfolgter DC Kontrolle (Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2) eine weitere Portion Pyridin und Ethylchloroformiat bei 0 °C zugeben, um verbliebenes Edukt umzusetzen. Reaktionsmischung in Wasser gießen und mehrmals mit DCM extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ trocknen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernen.

Zu 5.0 mmol des des Intermediates in 1.60 ml Mesitylene werden 5.0 mmol elementaren Schwefel zugesetzt. Durch Destillation verbliebenes Pyridin abtrennen, anschließend den Ansatz 2 h auf Siedetemperatur erwärmen. Nach dem Abkühlen das Produkt durch Säulenchromatographie reinigen. (Gradient: *n*-Hexan zur vollständigen Abtrennung des Mesitylen (DC-Kontrolle) anschließen Ethylacetat/*n*-Hexan 1:2).

C₂₂H₁₅N₄S (M_r = 386.44)

Ausbeute: 56%

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 4.33 (s, 2H, -CH₂), 7.08-7.12 (m, 2H, 2'', 6''-H), 7.28-7.38 (m, 5H, 3'', 4'', 5'', 3', 7'-H), 7.57-7.61 (m, 4H, 4', 3', 6', 2''', 6'''-H), 8.61-8.64 (m, 2H, 3''', 5'''-H).

GC-MS (EI): 33.11 min, m/z [%] = 387.1 (29), 386.1 ([M^{*}], 100), 147.0 (28), 103.1 (24). (Methode 2)

IR: [cm⁻¹] = 1597 (m), 1505 (w), 1456 (m), 1344 (w), 1217 (m), 1066 (w), 990 (m), 818 (w), 759 (m), 698 (s), 645 (m), 546 (w), 515 (w), 478 (w).

HRMS: berechnet für C₂₂H₁₅N₄SF [M⁺] 386.1001, gemessen 386.0996.

Schmelzpunkt: 208.2 °C

8 Literaturverzeichnis

- [1] Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2002, 9, 727–730.
- [2] Margutti, S.; Laufer, S. A. Are MAP kinases drug targets? Yes, but difficult ones *Chem. Med. Chem.*, 2007, 8, 1116-1140.
- [3] Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, 298, 1912 – 1934.
- [4] Grant, S. K. Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 7, 1163-1177.
- [5] Cohen, P. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2002, 4, 309–315.
- [6] Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; TenEyck, L. F.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, 1991, 5018, 407-414.
- [7] Hanks, S. K.; Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 1995, 8, 576-596.
- [8] Domeyer, D. Docking-basiertes virtuelles Wirkstoff-Design von p38 MAP Kinase-Inhibitoren. Doktorarbeit, Universität Tübingen, 2005.

- [9] Holm, M.; Lehmann, F.; Laufer, S. Medicinal chemistry and molecular inhibitor mechanism of tyrosine kinase inhibitors. *Pharmazie in unserer Zeit*, 2008, 37, 382-392.
- [10] Hanks, S. K. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *GenomeBiology*, 2003, 5, III.
- [11] Zheng, J.; Knighton, D. R.; TenEyck, L. F.; Karlsson, R.; Xuong, N.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry*, 1993, 9, 2154-2161.
- [12] Huse, M.; Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, 2002, 3, 275-282.
- [13] Niculescu-Duvaz, D.; Whittaker, S.; Springer, C.; Marais, R. The EGF receptor Hokey-Cokey. *Cancer Cell*, 2007, 3, 209-211.
- [14] Schulze-Gahmen, U.; Brandsen, J.; Jones, H. D.; Morgan, D. O.; Meijer, L.; Vesely, J.; Kim, S. H. Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins*, 1995, 4, 378-391.
- [15] Lochhead, P. A. Protein kinase activation loop autophosphorylation in cis: overcoming a Catch-22 situation. *Science signaling*, 2009, 54, 1-4.
- [16] Traxler, P. Tyrosine kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 1998, 8, 1599-1625.
- [17] Hauser, D. R. J. Purinderivate als mögliche ATP-kompetitive Kinase Inhibitoren. *Doktorarbeit*, Universität Tübingen, 2004.
- [18] Liedtke, A. J. Synthese, Analytik und biologische Testung von tri- und tetrasubstituierten Imidazolen als ATP-kompetitive Hemmstoffe der p38 MAP Kinase - Optimierung der Wechselwirkungen mit der „Hydrophoben Enzymregion I“. *Doktorarbeit*, Universität Tübingen, 2008.
- [19] McInnes, C.; Fischer P. M. Strategies for the design of potent and selective kinase inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2005, 14, 1845-1863.

-
- [20] Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, 2004, *5665*, 1800-1805.
- [21] Liao, J. J.-L. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2007, *50*, 409-424.
- [22] Ghose, A. K.; Herbertz, T.; Pippin, D. A.; Salvino, J. M.; Mallamo, J. P. Knowledge based prediction of ligand binding modes and rational inhibitor design for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.*, 2008, *51*, 5149-5171.
- [23] Lehmann, F. Struktur- bzw. Liganden-basierte Suche nach neuen p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase Pharmakophoren. *Doktorarbeit*, Universität Tübingen, 2008.
- [24] Chen, Z.; Gibson, T. B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Xu, B.; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M. H. MAP Kinases. *Chemical Reviews*, 2001, *8*, 2449-2476.
- [25] Herlaar, E.; Brown, Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today*, 1999, *10*, 439-447.
- [26] Tong, L.; Pav, S.; White, D. M.; Rogers, S.; Crane, K. M.; Cywin, C. L.; Brown, M. L.; Pargellis, C. A. A highly specific inhibitor of human p38 map kinase binds in the ATP pocket. *Nature Structural Biology*, 1997, *4*, 311-316.
- [27] Wang, Z.; Canagarajah, B. J.; Boehm, J. C.; Kassisa, S.; Cobb, M. H.; Young, P. R.; Abdel-Meguid, S.; Adams, J. L.; Goldsmith, E. J. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* 1998, *9*, 1117-1128.
- [28] Wilson, K. P., Fitzgibbon, M. J.; Caron, P. R.; Griffith, J. P.; Chen, W.; McCaffrey, P. G.; Chambers, S. P.; Su, M. S. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1996, *44*, 27696-27700.
- [29] Bellon, S.; Fitzgibbon, M. J.; Fox, T.; Hsiao, H. M.; Wilson, K. P. The structure of phosphorylated p38 γ is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure*, 1999, *9*, 1057-1065.

- [30] Hale, K. K.; Trollinger, D.; Rihanek, M.; Manthey, C. L. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase α , β , γ and δ in inflammatory cell lineages. *J. Immunol.*, 1999, 7, 4246-4252.
- [31] Johnson, G. L.; Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 2002, 5600, 1911-1912.
- [32] Saklatvala, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4, 372-377.
- [33] Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2003, 9, 717-726.
- [34] <http://www.cellsignal.com>. Signaling Pathways Activating p38 MAPK. Cell Signaling, 2008.
- [35] Lombardino, J. G.; Wiseman, E. H. Preparation and antiinflammatory activity of some nonacidic trisubstituted imidazoles. *J. Med. Chem.*, 1974, 11, 1182-1188.
- [36] Lantos, I.; Bender, P. E.; Razgaitis, K. A.; Sutton, B. M.; DiMartino, M. J.; Griswold, D. E.; Walz, D. T. Antiinflammatory activity of 5,6-diaryl-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]thiazoles. Isomeric 4-pyridyl and 4-substituted phenyl derivatives. *J. Med. Chem.*, 1984, 1, 72-75.
- [37] Bender, P. E.; Hill, D. T.; Offen, P. H.; Razgaitis, K.; Lavanchy, P.; Stringer, O. D.; Sutton, B. M.; Griswold, D. E.; DiMartino, M.; Walz, D. T.; 5,6-Diaryl-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]thiazoles: a new class of immunoregulatory antiinflammatory agents. *J. Med. Chem.*, 1985, 9, 1169-1177.
- [38] Bender, P. E. 5,6-Diphenyl-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]thiazoles. US 4263311, 1981.
- [39] Cherkofsky, S. C.; Sharpe, T. R. Antiinflammatory diarylimidazothiazoles and their corresponding S-oxides. US 4064260, 1977.

- [40] Shilcrat, S. C.; Hill, D. T.; Bender, P. E.; Griswold, D. E.; Bauers, P. W.; Eggleston, D. S.; Lantos, I.; Pridgen, L. N. Synthesis, x-ray crystal structure determination and antiinflammatory activity of the regioisomers: 5-phenyl-6-(4-pyridyl)-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]thiazole and 6-phenyl-5-(4-pyridyl)-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]thiazole. A structural reassignment. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1991, 5, 1181-1187.
- [41] Lee, J. C.; Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D.; McNulty, D.; Blumenthal, M. J.; Keys, J. R.; Landvatter, S. W.; Strickler, J. E.; McLaughlin, M. M.; Siemens, I. R.; Fisher, S. M.; Livi, G. P.; White, J. R.; Adams, J. L.; Young, P. R. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 1994, 372, 739-746.
- [42] Stefan Laufer, Steffen Gay, und Kay Brune. Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen. Georg Thieme Verlag, 2002.
- [43] Strand, V.; Kimberly, R.; Isaacs, J. D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, 1, 75-92.
- [44] Fugger, L.; Friese, M. A.; Bell, J. I. From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 6, 408-417.
- [45] Bouma, G.; Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Immunology*, 2003, 7, 521-533.
- [46] Lee, M. R.; Dominguez, C. MAP kinase p38 inhibitors: Clinical results and an intimate look at their interactions with p38 α protein. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 25, 2979-2994.
- [47] Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 11, 1210-1250.
- [48] Foster, M. L.; Halley, F.; Souness, J. E. Potential of p38 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug News & Perspectives*, 2000, 8, 488-497.

- [49] Adams, J. L.; Boehm, J. C.; Kassis, S.; Gorycki, P. D.; Webb, E. F.; Hall, R.; Sorenson, M.; Lee, J. C.; Ayrton, A.; Griswold, D. E.; Gallagher, T. F. Pyrimidinylimidazole inhibitors of CSBP/p38 kinase demonstrating decreased inhibition of hepatic cytochrome P450 enzymes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 22, 3111-3116.
- [50] Wilson, K. P.; McCaffrey, P. G.; Hsiao, K.; Pazhanisamy, S.; Galullo, V.; Bemis, G. W.; Fitzgibbon, M. J.; Caron, P. R.; Murcko, M. A.; Su, M. S. The structural basis for the specificity of pyridinylimidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chemistry & Biology*, 1997, 6, 423-31.
- [51] Natarajan, S. R.; Wisnoski, D. D.; Singh, S. B.; Stelmach, J. E.; O'Neill, E. A.; Schwartz, C. D.; Thompson, C. M.; Fitzgerald, C. E.; O'Keefe, S. J.; Kumar, S.; Hop, C. E.; Zaller, D. M.; Schmatz, D. M.; Doherty, J. B. p38 MAP kinase inhibitors. Part 1: design and development of a new class of potent and highly selective inhibitors based on 3,4-dihydropyrido[3,2-*d*]pyrimidone scaffold *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 2, 273-276.
- [52] Ottosen, E. R.; Sorensen, M. D.; Bjorkling, F.; Skak-Nielsen, T.; Fjording, M. S.; Aaes, H.; Binderup, L. Synthesis and structure-activity relationship of aminobenzophenones. A novel class of p38 MAP kinase inhibitors with high antiinflammatory activity. *J. Med. Chem.*, 2003, 46 (26), 5651-5662.
- [53] Goldberg, D. R.; Hao, M. H.; Qian, K. C.; Swinamer, A. D.; Gao, D. A.; Xiong, Z.; Sarko, C.; Berry, A.; Lord, J.; Magolda, R. L.; Fadra, T.; Kroe, R. R.; Kukulka, A.; Madwed, J. B.; Martin, L.; Pargellis, C.; Skow, D.; Song, J. J.; Tan, Z.; Torcellini, C. A.; Zimmiti, C. S.; Yee, N. K.; Moss, N. Discovery and optimization of p38 inhibitors via computer-assisted drug design. *J. Med. Chem.*, 2007, 17, 4016-4026.
- [54] Simard, J. R.; Klueter, S.; Gruetter, C.; Getlik, M.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Rauh, D. A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nature Chemical Biology*, 2009, 6, 394-396.
- [55] Blum, G.; Gazit, A.; Levitzki, A. Substrate Competitive Inhibitors of IGF-1 Receptor Kinase. *Biochemistry*, 2000, 51, 15705-15712.
- [56] Adams, J. A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical Reviews*, 2001, 8, 2271-2290.

-
- [57] Wagner, G.; Laufer, S. Small molecular anti-cytokine agents. *Medicinal Research Reviews*, 2006, 1, 1-62.
- [58] Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H. Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002.
- [59] Bleicher, K. H.; Böhm, H.-J.; Müller, K.; Alanine, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nature reviews Drug discovery*, 2003, 5, 369-378.
- [60] Von Ahsen, O.; Boemer, U. High-throughput screening for kinase inhibitors. *ChemBioChem*, 2005, 3, 481-490.
- [61] Jung, G. Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening. 1999, 601 pp. Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland.
- [62] 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. *Advanced drug delivery reviews*, 2001, 1-3, 3-26.
- [63] Dumas, J.; Sibley, R.; Riedl, B.; Monahan, M. K.; Lee, W.; Lowinger, T. B.; Redman, A. M.; Johnson, J. S.; Kingery-Wood, J.; Scott, W. J.; Smith, R. A.; Bobko, M.; Schoenleber, R.; Ranges, G. E.; Housley, T. J.; Bhargava, A.; Wilhelm, S. M.; Shrikhande, A. Discovery of a new class of p38 kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, 18, 2047 - 2050.
- [64] Kramer, J. A.; Sagartz, J. E.; Morris, D. L. The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, 8, 636-649.
- [65] Agrafiotis, D. K.; Lobanov, V. S.; Salemme, F. R. Combinatorial informatics in the post-genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 5, 337-346.
- [66] Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 2002, 4, 409-443.

- [67] Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 11, 882-894.
- [68] Ehrlich, P. Present Status of Chemotherapy. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1909, 42, 17-47.
- [69] Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1985, 7, 849-57.
- [70] Ashton, M.; Barnard, J.; Casset, F.; Charlton, M.; Downs, G.; Gorse, D.; Holliday, J.; Lahana, R.; Willett, P. Identification of diverse database subsets using property-based and fragment-based molecular descriptions. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 2002, 6, 598-604.
- [71] Rarey, M.; Dixon, J. S. Feature trees: a new molecular similarity measure based on tree matching. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1998, 5, 471-490.
- [72] Zhang, Q.; Muegge, I. Scaffold Hopping through Virtual Screening Using 2D and 3D Similarity Descriptors: Ranking, Voting, and Consensus Scoring. *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 1536-1548.
- [73] Lee, H. S.; Choi, J.; Kufareva, I.; Abagyan, R.; Filikov, A.; Yang, Y.; Yoon, S. Optimization of high throughput virtual screening by combining shape-matching and docking methods. *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, 48, 489-497.
- [74] Xiao, Z.; Varma, S.; Xiao, Y. D.; Tropsha, A. Modeling of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors using the Catalyst HypoGen and k-nearest neighbor QSAR methods. *J. Mol. Graph. Model.*, 2004, 23, 129-138.
- [75] Hauser, D. R. J.; Scior, T.; Domeyer, D. M.; Kammerer, B.; Laufer, S. A. Synthesis, Biological Testing, and Binding Mode Prediction of 6,9-Diarylpurin-8-ones as p38 MAP Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2007, 50, 2060-2066.
- [76] Cheeseright, T. J.; Mackey, M. D.; Melville, J. L.; Vinter, A. FieldScreen: Virtual Screening using Molecular Fields. Application to the DUD dataset. *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, 48, 2108-2117.

- [77] Cheeseright, T.; Mackey, M.; Rose, S.; Vinter, A. Molecular Field Extrema as Descriptors of Biological Activity: Definition and Validation. *J. Chem. Inf. Model.*, 2006, 46, 665-676.
- [78] Stelmach, J. E.; Liu, L.; Patel, S. B.; Pivnichny, J. V.; Scapin, G.; Singh, S.; Hop, C. E. C. A.; Wang, Z.; Strauss, J. R.; Cameron, P. M.; Nichols, E. A.; O'Keefe, S. J.; O'Neill, E. A.; Schmatz, D. M.; Schwartz, C. D.; Thompson, C. M.; Zaller, D. M.; Doherty, J. B. Design and synthesis of potent, orally bioavailable dihydroquinazolinone inhibitors of p38 MAP kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 277-280.
- [79] Laughlin, S. K.; Clark, M. P.; Djung, J. F.; Golebiowski, A.; Brugel, T. A.; Sabat, M.; Bookland, R. G.; Laufersweiler, M. J.; VanRens, J. C.; Townes, J. A.; De, B.; Hsieh, L. C.; Xu, S. C.; Walter, R. L.; Mekel, M. J.; Janusz, M. J. The development of new isoxazolone based inhibitors of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 9, 2399-2403.
- [80] Liverton, N. J.; Butcher, J. W.; Claiborne, C. F.; Claremon, D. A.; Libby, B. E.; Nguyen, K. T.; Pitzenberger, S. M.; Selnick, H. G.; Smith, G. R.; Tebben, A.; Vacca, J. P.; Varga, S. L.; Agarwal, L.; Dancheck, K.; Forsyth, A. J.; Fletcher, D. S.; Frantz, B.; Hanlon, W. A.; Harper, C. F.; Hofsess, S. J.; Kostura, M.; Lin, J.; Luell, S.; O'Neill, E. A.; Orevillo, C. J.; Pang, M.; Parsons, J.; Rolando, A.; Sahly, Y.; Visco, D. M.; O'Keefe, S. J. Design and Synthesis of Potent, Selective, and Orally Bioavailable Tetrasubstituted Imidazole Inhibitors of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J. Med. Chem.*, 1999, 12, 2180-2190.
- [81] Cheeseright, T. J.; Holm, M.; Lehmann, F.; Luik, S.; Goettert, M.; Melville, J. L.; Laufer, S. Novel Lead Structures for p38 MAP Kinase via Field-Screen Virtual Screening. *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 4200-4209.
- [82] Laufer, S.; Thuma, S.; Peifer, C.; Greim, C.; Herweh, Y.; Albrecht, A.; Dehner, F. An immunosorbent, nonradioactive p38 map kinase assay comparable to standard radioactive liquid-phase assays. *Analytical Biochemistry*, 2005, 344, 135-137.
- [83] Kanaoka, M. Synthesis of related compounds of thiosemicarbazide. III. s-Triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Pharm. Bull.*, 1957, 5, 385-389.

- [84] Chaturvedi, B.; Tiwari, N.; Nizamuddin. A convenient and novel synthesis of 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles as potential pesticides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1988, 5, 1229-1232.
- [85] Invidiata, F. P.; Simoni, D.; Scintu, F.; Pinna, N. 3,6-Disubstituted 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles: synthesis, antimicrobial and antiviral activity. *Farmaco*, 1996, 51, 659-664.
- [86] Prasad, D. Jagadeesh; Ashok, Mithun; Karegoudar, Prakash; Poojary, Boja; Holla, B. Shivarama; Kumari, Nalilu Sucheta. Synthesis and antimicrobial activities of some new triazolothiadiazoles bearing 4-methylthiobenzyl moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 2, 551-557.
- [87] Bhat, K. S.; Prasad, D. J.; Poojary, B.; Holla, B. S. Synthesis of some new 1,2,4-triazolo[3,4-*b*]-thiadiazole derivatives as possible anticancer agents. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 2004, 179, 1595-1603.
- [88] Holla, B. S.; Mahalinga, M.; Poojary, B.; Akbarali, P. M.; Shetty, N. S. Studies on some new fluorene incorporated 1,2,4-triazoles. *Indian J. Heterocyc. Ch.*, 2004, 14, 69-70.
- [89] Manjunath, G. D.; Sreenivasa, A. Synthesis and pharmacological activity of 3-alkyl-6-aryl-1,2,4-triazolo [3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazoles. *Indian J. Heterocyc. Ch.*, 2002, 11, 255-256.
- [90] Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 111, 544-547.
- [91] Amir, M.; Kumar, H.; Javed, S. A. Synthesis and pharmacological evaluation of condensed heterocyclic 6-substituted-1,2,4-triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazole derivatives of naproxen. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 2007, 17, 4504-4508.
- [92] Curtis, A. D. M.. Product class 14: 1,2,4- triazoles. *Science of Synthesis*, 2004, 13, 603-639.

-
- [93] Bladin, J. A. On cyanogen compounds of the aromatic orthodiamines. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, 1885, 18, 1544.
- [94] Colanceska-Ragenovi C. K.; Dimova, V.; Kakurinov, V.; Molnar, D. G.; Buzarovska, A. Synthesis and antibacterial and antifungal activity of 4-substituted 5-aryl-1,2,4-triazoles. *Molecules*, 2001, 6, 815-824.
- [95] Holla, B. S.; Poojary, K. N.; Kalluraya, B.; Gowda, P. V. Synthesis, characterization and antifungal activity of some N-bridged heterocycles derived from 3-(3-bromo-4-methoxyphenyl)-4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole. *Farmaco*, 1996, 51, 793-799.
- [96] George, T.; Mehta, D. V.; Tahilramani, R.; David, J.; Talwalker, P. K. Synthesis of some s-triazoles with potential analgesic and antiinflammatory activities. *J. Med. Chem.*, 1971, 14, 335-338.
- [97] Eweiss, N. F.; Bahajaj, A. A.; Elsherbini, E. A. Synthesis of heterocycles. Part VI. Synthesis and antimicrobial activity of some 4-amino-5-aryl-1,2,4-triazole-3-thiones and their derivatives. *J. Heterocyclic Chem.*, 1986, 5, 1451-1458.
- [98] Sweetman, S. C. Martindale: The Complete Drug Reference, 34th Edition, Deutscher Apotheker Verlag, 2004.
- [99] Garratt, Peter J. 1,2,4-Triazoles. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, 1996, 4, 127-163, 905-1006.
- [100] Potts, K. T. The chemistry of 1,2,4-triazoles. *Chemical Reviews*, 1961, 61, 87-127.
- [101] Balasubramanian, M.; Keay, J. G.; Scriven, E. F. V.; Shobana, N. Approaches to the synthesis of 1-substituted 1,2,4-triazoles. *Heterocycles*, 1994, 3, 1951-75.
- [102] Temple, Carroll, Jr. 1,2,4-Triazoles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 1981, 37, 791.

- [103] Bayer, H.; Kroeger, C. F.; Busse, G. 1,2,4-Triazoles. I. The reaction of thiocarbohydrazide and thiosemicarbazide with aliphatic carbonic acids and their derivatives. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1960, 637, 135-145.
- [104] Invidiata, F. P.; Furno, G.; Lampronti, I.; Simoni, D. Improved synthesis of 5-substituted 4-amino-3-mercapto-(4*H*)-1,2,4-triazoles and a facile route to 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles. *J. Heterocyclic Chem.*, 1997, 34, 1255-1258.
- [105] Simicus, R.; Burbuliene, M. M.; Jakubkiene, V.; Udrenaitė, E.; Vainilavicius, P. J. Convenient way to 5-substituted 4-amino-2,3-dihydro-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiones. *Heterocyclic Chem.*, 2007, 44, 279-284.
- [106] Reid, J. R.; Heindel, N. D. Improved syntheses of 5-substituted-4-amino-3-mercapto-(4*H*)-1,2,4-triazoles. *J. Heterocyclic Chem.*, 1976, 13, 925-926.
- [107] Deeb, A.; Saad, H. Pyridazine derivatives and related compounds. Part 9. Tetrazolo[1,5-*b*]pyridazine-8-carbohydrazide synthesis and some reactions. *Heterocycles*, 2003, 60, 1873-1879.
- [108] Joshi, S. S.; Karnik, A., V. Rapid and efficient microwave-assisted synthesis of 4-amino-3-mercapto-5-substituted-1,2,4-triazoles. *Indian J. Chem B*, 2006, 45B, 1057-1059.
- [109] Malhotra, S.; Manher, V.; Chadha, V. K. Bridgehead nitrogen heterocycles: Syntheses of 3,6-disubstituted-s-triazolo [3,4-*b*][1,3,4] thiadiazoles, and related systems. *Indian J. Heterocycl. Ch.*, 2003, 12, 257-262.
- [110] Holm, M.; Schollmeyer, D.; Laufer, S. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online*, 2008.
- [111] Meyer, H.; Horstmann, H.; Moeller, E.; Garthoff, B. Imidazoazolealkenoic acid amides, their intermediate products and their use in drugs. DE 3020421 A1 19811210, 1981.
- [112] Budriesi, R.; Ioan, P.; Locatelli, A.; Cosconati, S.; Leoni, A.; Ugenti, M. P.; Andreani, A.; Di Toro, R.; Bedini, A.; Spampinato, S.; Marinelli, L.; Novelino, E.; Chiarini, A. Imidazo[2,1-*b*]thiazole system: a scaffold endowing dihydropyridines with selective cardiodepressant activity. *J. Med. Chem.*, 2008, 6, 1592-600.

- [113] Meakins, G. D.; Musk, S. R. R.; Robertson, C. A.; Woodhouse, L. S. Substituted imidazo[2,1-*b*]thiazoles from 2-aminothiazoles and α -bromo ketones: efficient preparation and proof of structure. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, 1989, 3, 643-648.
- [114] Paul, H.; Sitte, A.; Wessel, R. On some reactions of 2,5-diamino- and 2-amino-1,3,4-thiadiazoles with α -halogen ketones to imidazo[2,1-*b*]-1,3,4-thiadiazoles. *Monatshefte fuer Chemie*, 1977, 3, 665-680.
- [115] Pentimalli, L.; Milani, G.; Biavati, F. Preparation and reactivity of imidazo[2,1-*b*]-1,3,4-thiadiazoles. *Gazzetta Chimica Italiana*, 1975, 7-8, 777-87.
- [116] Hegde, V. S.; Kolavi, G. D.; Lamani, R. S.; Khazi, I. A. M. Mannich bases and novel benzothiazole derivatives of imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles and their biological evaluation. *Journal of Sulfur Chemistry*, 2006, 6, 553-569.
- [117] Matsukawa, T.; Ban, S. Derivatives of imidazothiadiazole. JP 28005879, 1953.
- [118] Pevarello, P.; Garcia Collaazo, A. M.; Rodriguez Hergueta, A.; Saluste, C.-G. P.; Ramos Lima, F. J.; Gonzalez Cantalapiedra, E.; Oyarzabal Santamariana, J. Preparation of imidazo[1,2-*b*]pyridazines as protein kinase inhibitors. WO 2009060197 A1 20090514, 2009.
- [119] Collier, S. J. Product class 12: 1,3,4- thiadiazoles. *Science of Synthesis*, 2004, 13, 349-414.
- [120] Miller, W. H.; Dessert, A. M.; Roblin, R. O., Jr. Heterocyclic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 1950, 72, 4893-4896.
- [121] Rzeski, W.; Matysiak, J.; Kandefler-Szerszen, M. Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole based compound. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2007, 9, 3201-3207.

- [122] Burgdorf, L.; Buchstaller, H.-P.; Stieber, F.; Anzali, S.; Amendt, C.; Greiner, H.; Grell, M.; Sirrenberg, C.; Zenke, F. Preparation of thiadiazole urea derivatives for use in controlling signal transduction of kinases. DE 102004009933 A1 20050915, 2005.
- [123] Spillane, Wm. J.; Kelly, L. M.; Feeney, B. G.; Drew, M. G. B.; Hattotuwa-gama, C. K. Synthesis of heterosulfamates. Search for structure-taste relationships. *ARKIVOC*, 2003, *vii*, 297-309.
- [124] Shukla, J. S.; Agarwal, K. Synthesis of some newer 1-heterocyclic amino/iminomethyl-2-substituted benzimidazoles as a potent CNS, anticonvulsant and monoamine oxidase inhibitory agents. *Current Science*, 1982, *51*, 817-820.
- [125] Chubb, F. L.; Nissenbaum, J. Hypoglycemic thiadiazoles. *Canadian Journal of Chemistry*, 1959, *37*, 1121-1123.
- [126] Carvalho, S. A.; Da Silva, E. F.; Santa-Rita, R. M.; De Castro, S. L.; Fraga, C. A. M. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives, designed as non-mutagenic megazol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, *24*, 5967-5970.
- [127] Yu, Y. Microwave-assisted synthesis and biological activity of 2,5-disubstituted-1,3,4-thiadiazole. *Asian Journal of Chemistry*, 2007, *4*, 3141-3144.
- [128] Jatav, V.; Mishra, P.; Kashaw, S.; Stables, J. P. Synthesis and CNS depressant activity of some novel 3-[5-substituted 1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styryl quinazoline-4(3*H*)-ones. *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, *43*, 135-141.
- [129] Shaban, M.A.E.; Mostafa, M.A.; Nasr, A.Z. Oxidative cyclization of D-fructose thiosemicarbazones to 2-amino-5-(D-arabino-1,2,3,4-tetrahydroxybut-1-yl)-1,3,4-thiadiazoles through carbon-carbon bond cleavage of the sugar chain. *Pharmazie*, 2003, *58*, 367-371.
- [130] Fujita, M.; Hirayama, T.; Ideka, N. Design, synthesis and bioactivities of novel diarylthiophenes: inhibitors of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, *10*, 3113-3122.

- [131] Miwatashi, S.; Arikawa, Y.; Kotani, E.; Miyamoto, M.; Kimura, H.; Tanaka, T.; Asahi, S.; Ohkawa, S. Novel Inhibitor of p38 MAP Kinase as an Anti-TNF- α Drug: Discovery of N-[4-[2-Ethyl-4-(3-methylphenyl)-1,3-thiazol-5-yl]-2-pyridyl]benzamide (TAK-715) as a Potent and Orally Active Anti-Rheumatoid Arthritis Agent. *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 5966-5979.
- [132] Revesz, Laszlo. Preparation of 2-substituted 4,5-diarylimidazoles as anti-inflammatories and immunosuppressants. WO 9901449 A1 19990114, 1999.
- [133] Gadad, A. K.; Palkar, M. B.; Anand, K.; Noolvi, M. N.; Boreddy, T. S.; Wagwade, J. Synthesis and biological evaluation of 2-trifluoromethyl/ sulfonamido-5,6-diaryl substituted imidazo [2,1-*b*]-1,3,4-thiadiazoles: A novel class of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 1, 276-283.
- [134] Kolavi, G.; Hegde, V.; Khazi, I.A.; Gadad, P. Synthesis and evaluation of antitubercular activity of imidazo [2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14, 3069-3080.
- [135] Gauthier, J. Y.; Lau, C. K.; Leblanc, Y.; Li, C.-S.; Roy, P.; Therien, M.; Wang, Z. Preparation of aryl-substituted, 5,5-fused aromatic nitrogen compounds as cyclooxygenase-2-inhibiting antiinflammatory agents. WO 9621667 A1 19960718, 1996.
- [136] Ingendoh, A.; Meyer, H.; Garthoff, B. (Aminoalkyl)imidazothiadiazole-alkene-carboxylic acid amides and their use in drugs. DE 3329621 A1 19850228, 1985.
- [137] Horstmann, H.; Meng, K.; Seuter, F.; Moeller, E. Imidazo[2,1-*b*][1.3.4]-thiadiazoles. DE 2823686 A1 19791206, 1979.
- [138] Andreani, A.; Burnelli, S.; Granaiola, M.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Varoli, L.; Calonghi, N.; Cappadone, C.; Farruggia, G.; Zini, M.; Stefanelli, C.; Masotti, L.; Radin, N.S., Shoemaker, R.H. New Antitumor Imidazo[2,1-*b*]thiazole Guanyldiazones and Analogues. *J. Med. Chem.*, 2008, 4, 809-816.
- [139] Wang, X.; Wang, M.; Quan, Z.; Li, Z. A neat and rapid synthesis of 2-aryloxymethylene-6-arylimidazo[2,1-*b*]-1,3,4-thiadiazole under microwave irradiation. *Synthetic Comm.*, 2005, 35, 2881-2888.

- [140] Kidwai, M.; Rastogi, S. Green route to the 2,6-disubstituted imidazo[2,1-*b*]-1,3,4-thiadiazoles by the cyclocondensation of α -bromoacetophenone derivative and 1,3,4-thiadiazoles using ionic liquids. *Let. Org. Chem.*, 2006, 3, 149-152.
- [141] Lagoja, I. M.; Pannecouque, C.; Van Aerschot, A.; Witvrouw, M.; Debyser, Z.; Balzarini, J.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. *N*-Aminoimidazole Derivatives Inhibiting Retroviral Replication via a Yet Unidentified Mode of Action. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, 8, 1546-1553.
- [142] Zeiger A. V.; Joullie M. M. Oxidation of 1,2-diaminobenzimidazoles to 3-amino-1,2,4-benzotriazines. *The Journal of organic chemistry*, 1977, 3, 542-545.
- [143] Pyl, T.; Wasehk, F.; Beyer, H. Bicyclic heterocyclic compounds with a common nitrogen atom. VI. Formation of 1-amino-2-mercaptoimidazoles from 2-benzylthioimidazo[2,1-*b*]-1,3,4-thiadiazoles. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1963, 663, 113-19.
- [144] Parlanti, L.; Discordia, R. P.; Hynes, J., Jr.; Miller, M. M.; O'Grady, H. R.; Shi, Z. Amination of Heterocyclic Compounds with *O*-Benzoylhydroxylamine Derivatives. *Organic Letters*, 2007, 19, 3821-3824.
- [145] Kohda, K.; Yasuda, M.; Ukai, H.; Baba, K.; Yamagata, Y.; Kawazoe, Y. Synthesis and properties of *N*-aminoguanines. *Tetrahedron*, 1989, 20, 6367-6374.
- [146] Hamley, P.; Tinker, A. C. 1,2-Diaminobenzimidazoles: selective inhibitors of nitric oxide synthase derived from aminoguanidine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1995, 15, 1573-6.
- [147] Labanauskas, L.; Bucinskaite, V.; Brukstus, A.; Urbelis, G.; Sharlauskas, I. Synthesis of a novel heterocyclic system: 3-chloro-7,8-dihydro[1,4]dioxino[2'',3'':4',5']benzo[4,5]imidazo[1,2-*c*][1,2,3]thiadiazole. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2005, 6, 802-803.
- [148] Heim-Riether, A.; Healy, J. A Novel Method for the Synthesis of Imidazo[5,1-*f*][1,2,4]triazin-4(3*H*)-ones. *Journal of Organic Chemistry*, 2005, 18, 7331-7337.

-
- [149] Wagner, G. Pyridinyl-pyrimidine und -imidazole – Neue Hemmstoffe der Zytokinfreisetzung. *Doktorarbeit*, 2002.
- [150] Lantos, I.; Gombatz, K.; McGuire, M.; Pridgen, L.; Remich, J.; Shilcrat, S. J. Synthetic and mechanistic studies on the preparation of pyridyl-substituted imidazothiazoles. *Org. Chem.*, 1988, 53, 4223-4227.
- [151] Forrer, P.; Tamaskovic, R.; Jaussi, R. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of JNK, ERK, and p38 kinase activities. *Biological Chemistry*, 1998, 8/9, 1101-1111.
- [152] Schrödinger Suite 2008 Induced Fit Docking Protocol; Glide version 5.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005; Prime version 1.7; Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005.

Akademische Lehrer

Mein Dank gilt den nachstehenden Professor(inn)en und Dozent(inn)en an der *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg* für ihre ansprechende Lehre und Unterstützung während des gesamten Studiums.

Meine akademischen Lehrer im Grundstudium der Pharmazie waren die Damen und Herren:

Dr. Krämer	Anorganische Chemie
Dr. Lindel	Organische Analytik
Prof. Dr. Ludwig	Physikalische Chemie und Mathematik
Dr. de Kieviet	Physik
Prof. Dr. Reichling	Pharmazeutische Biologie
Dr. Bultmann	Pharmazeutische Technologie und Terminologie
Prof. Dr. Metzler-Nolte	Pharmazeutische Chemie und Stereochemie
Dr. Mier	Nomenklatur
Dr. Massing	Instrumentelle Analytik
PD Dr. Schmeiser	Toxikologie
Dr. Borchert	Geschichte der Pharmazie

Meine akademischen Lehrer im Hauptstudium der Pharmazie waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Fricker	Pharmazeutische Technologie
PD Dr. Reich	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. Hilgenfeldt	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. Jäschke	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. Metzler-Nolte	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. Eisenhut	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. Wießler	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. Wink	Pharmazeutische Biologie
Prof. Dr. Reichling	Pharmazeutische Biologie
AP Dr. Hope-Tichy	Klinische Pharmazie

Curriculum Vitae

Melanie Holm

Rollengasse 27

72119 Ammerbuch

Persönliche Daten

Geburtsdatum 01.11.1979

Geburtsort Ludwigshafen

Familienstand ledig

Schule

08 / 1990 - 06 / 1999 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Neustadt an der Weinstraße

Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

09 / 1999 - 03 / 2000 Pharmazeutisch-Technische Assistentin am Naturwissenschaftlichen
Technikum Dr. Künkele, Landau

Studium

04 / 2000 - 09 / 2004 Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

Pharmaziepraktikum

11 / 2004 - 04 / 2005 Rathausapotheke, Neustadt an der Weinstraße

05 / 2005 - 10 / 2005 DKFZ Heidelberg, Abteilung Molekulare Toxikologie

01 / 2006 Approbation zum Apotheker

Promotion

04 / 2006 - 07 / 2009 Anfertigung der Dissertation an der Eberhard Karls Universität,
Tübingen

Weiterbildung

seit 04 / 2006 Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik