

Kinaseinhibitoren als molekulare Sonden
in der Chemischen Biologie

DISSERTATION

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

Fakultät Chemie
der Technischen Universität Dortmund

Vorgelegt von

André Richters

aus Lichtenau (Westf.)

Dortmund 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2009 bis Mai 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft sowie der TU Dortmund angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Allgemeiner Teil	1
1.1 Proteinkinasen.....	1
1.2 Kinaseinhibitoren	4
1.3 Zielgerichtete Tumorthherapie	8
2 Zielsetzung und Motivation	11
3 Strukturbasierte Verfahren der Medizinischen Chemie	13
3.1 Umgehung von Wirkstoffresistenzen in Abl und KIT	17
3.2 Ergebnisse.....	19
3.2.1 HTS zur Identifizierung von Abl T315I Inhibitoren.....	19
3.2.2 Strukturbasiertes Design zur Optimierung von Typ-II Inhibitoren	23
3.2.3 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek.....	27
3.2.4 Biochemische Charakterisierung der Hybridinhibitoren	29
3.2.5 Komplexkristallstrukturen in cSrc wt.....	34
3.2.6 Zelluläre Charakterisierung in humanen Krebszelllinien.....	36
3.3 Selektivität von Hybridinhibitoren.....	42
3.4 Ergebnisse.....	45
3.4.1 Synthese von Profilierungssonden.....	45
3.4.2 Profilierung	48
4 Chemische Genetik	57
4.1 Ark1 – chemisch-genetische Ansätze zur kovalenten Adressierung.....	61
4.2 Ergebnisse.....	65
4.2.1 Biochemische Charakterisierung der <i>bump and hole</i> Inhibitoren.....	65
4.2.2 Weiterführende Studien an Ark1	71
4.2.3 Identifikation neuartiger Modulatoren für Aurora A	72

4.3	TBK1 – biologische Funktion in Signalkaskaden.....	80
4.4	Ergebnisse.....	85
4.4.1	TBK1 Homologiemodell und Kristallstruktur	85
4.4.2	Screening und Validierung identifizierter TBK1-Binder.....	88
4.4.3	Rationales Design zur Optimierung einer Hit-Struktur.....	96
4.4.4	Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek.....	100
4.4.5	Biochemische Charakterisierung.....	103
4.4.6	Zelluläre Charakterisierung	111
4.4.7	Generierung von Sonden für das unerforschte Kinom	113
4.4.8	Ausblick.....	117
5	Strukturbiologische Untersuchungen an Kinasen.....	119
5.1	Neuartige Scharnierregion-bindende Fragmente durch strukturbasiertes <i>de novo</i> Design.....	121
5.2	Strukturbiologische Studien in cSrc.....	124
5.3	Strukturbiologische Studien zum Bindungsverhalten an p38 α	126
6	Zusammenfassung.....	131
7	Summary.....	135
8	Publikationen.....	139
9	Experimenteller Teil.....	141
9.1	Organische Synthese	141
9.1.1	Vorbemerkungen.....	141
9.1.2	Herstellung von Hybridinhibitoren und Fragmenten	143
9.1.3	Synthese von TBK1-Inhibitoren.....	159
9.2	Biochemische Charakterisierung.....	174
9.2.1	Vorbemerkungen.....	174
9.2.2	Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™).....	175
9.2.3	Assaysysteme zur direkten Bindungsdetektion in Ark1	184
9.2.4	Hochdurchsatzdurchmusterung fokussierter Substanzbibliotheken	187
9.2.5	Charakterisierung in Krebszelllinien	189

9.3	Strukturbiologische Untersuchungen	191
9.3.1	Vorbemerkungen.....	191
9.3.2	Strukturauflösung und Strukturbestimmung.....	191
9.3.3	Kristallisation	192
9.3.4	Übersicht - Kristallstrukturen und Verfeinerungsparameter	193
10	Literaturverzeichnis.....	197

Abkürzungsverzeichnis

1NM-PP1	1-(<i>tert</i> -Butyl)-3-(naphthalen-1-ylmethyl)-1 <i>H</i> -pyrazolo[3,4- <i>d</i>]-pyrimidin-4-amin
Å	Ångström
Abl	Abelson Kinase
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AGC	Proteinklasse: PKA-, PKG- und PKC-Familien
Akt	Proteinkinase B <i>alpha</i>
Ark1	Aurora-verwandte Kinase 1 (<i>Aurora-related kinase 1</i>)
Ark1-as3-cys	Allelsensitive Cysteinmutante von Ark1 (E173C, L166A)
ATP	Adenosintriphosphat
Axl	Tyrosinkinase-Rezeptor UFO
Ba/F3	Immortalisierte Murine IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie
BC ₅₀	Halbmaximale Bindungskonzentration
Bcr	<i>Breakpoint cluster region</i>
Bir1/Cut17	Protein bir1/Chromosom-Segregationsprotein cut17
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyl-oxycarbonyl
bp	Basenpaar
BRAF	Ser/Thr-Proteinkinase B-Raf
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase(n)
caMLCK	<i>myosin light chain kinase 3</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CC ₅₀	Halbmaximale Kompetitionskonzentration

CCNC	Cyclin-C
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDPK3	Calcium-abhängige Proteinkinase 3
CLK	<i>cell division control-like kinase 1</i>
CMC	<i>chromosomal messenger complex</i>
CMGC	Proteinklasse: CDK-, MAPK-, GSK3- und CLK-Familien
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
cSrc	Zelluläre Sarcoma Kinase
DCM	Dichlormethan
DDR1	<i>epithelial discoidin domain-containing receptor 1</i>
DDR2	<i>discoidin domain-containing receptor 2</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DM	Doppelmutante (S345C, T338M)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPH	5-(1,3-Diaryl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)hydantoin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
Em	Emission
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et	Ethyl
FAK	<i>focal adhesion kinase 1</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fer	Tyr-Proteinkinase Fer
FLiK	<i>Fluorescent Labels in Kinases</i>
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
ges.	gesättigt

GGW	Gleichgewicht
GI ₅₀	Halmaximale Wachstumsinhibition
GIST	Gastrointestinale Stromatumore
GNF-5	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-3-(6-(4-(trifluoromethoxy)phenylamino)pyrimidin-4-yl)benzamid
GSK3	Glykogensynthase-Kinase-3
GTPase	Guanosin triphosphat-Hydrolase
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hERG	Spannungsgesteuerter Kaliumionenkanal (Subfamilie H, Mitglied 2)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HTRF	<i>homogeneous time resolved fluorescence</i>
HTS	Hochdurchsatzdurchmusterung (<i>high throughput screening</i>)
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IKK $\alpha/\beta/\gamma/\varepsilon$	<i>inhibitor of NF-κB kinase subunit $\alpha/\beta/\gamma/\varepsilon$</i>
IL	Interleukin
INCENP	<i>inner centromer protein</i>
IP	Geistiges Eigentum (<i>intellectual property</i>)
^t Pr	Isopropyl
IPS-I	Mitochondriales, antivirales Signalprotein
IRAK1	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 1
IRF3/7	Interferon-regulierender Faktor 3/7
I κ B	Inhibitor von κ B (<i>inhibitor of κB</i>)
JNK	Stress-aktivierte Proteinkinase JNK
K562	humane CML-Zelllinie

KIT	Stammzellwachstumsfaktor-Rezeptor (auch: SCFR)
K_M	Michaelis-Konstante
KRAS	GTPase KRas
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
Lsg.	Lösung
Lyn	Tyr-Proteinkinase Lyn
MAP3K7	MAPKKK 7
MAP3K7IP1	MAPKKK 7 interagierendes Protein 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MDA5	<i>melanoma differentiation associated protein-5</i>
Me	Methyl
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MNK	MAPK-interagierende Ser/Thr-Proteinkinase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenindinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NAK	NF- κ B aktivierende Kinase
NAP1	Nef-assoziiertes Protein 1
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCK	<i>cytoplasmic protein</i> NCK1 (Adapterprotein)
Nef	Protein Nef (<i>negative factor</i>)
NF κ B	Kernfaktor kappa B (<i>nuclear factor kappa B</i>)
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NOX4	NADPH Oxidase 4

NQO2	Ribosyldihydronicotinamid Dehydrogenase (Chinon)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
p38	Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38
PCTAIRE1/2	Ser/Thr-Proteinkinase PCTAIRE1/2 (auch: CDK16/17)
PD	Privatdozent
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDB	Protein-Datenbank
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
PE	Petrolether (Siedepunkt: 40-60 °C)
PFKFB3	6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 3
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
Pic1	<i>INCENP-related protein</i> Pic1
PIP4K2	Phosphatidylinositol-5-phosphat-4-kinase Typ-2
PKA	Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase)
PKC	Proteinkinase C
PLEC1	Plectin 1
ppm	<i>parts per million</i>
PYK2/FAK2	Calcium-abhängige Tyrosinkinase (auch: Protein-Tyrosinkinase 2-β)
quant.	quantitativ
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten (<i>relative fluorescence units</i>)
RIG-I	ATP-abhängige RNA-Helicase
RIOK1	Ser/Thr-Proteinkinase RIO1
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RK	Reaktion/Reaktionen
RMS	<i>residual mean square</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung (<i>structure activity relationship</i>)
SDD	Gerüstgebende und Dimerisierungsdomäne (<i>scaffolding and dimerization domain</i>)
SEB	<i>supplement enzymatic buffer</i>
sec	Sekunde
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SINTBAD	TBK1-Adapterprotein
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SLK	STE20-ähnliche Ser/Thr-Proteinkinase
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
SM	Einfachmutante (<i>single mutant</i>)
smMLCK	<i>smooth muscle myosin light chain kinase</i>
STE	<i>homologs of yeast sterile kinases</i>
STE20	Ser/Thr-Proteinkinase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
STK	Ser-/Thr-Kinase(n)
STV	Streptavidin
T2K	TRAF2-assoziierte Kinase
TANK	TRAF Familienmitglieder-assoziiierter NFκB-Aktivator
TBK1	TANK-bindende Kinase 1 (<i>TANK-binding kinase 1</i>)
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TIR	Toll-Interleukin-1 Rezeptor
TK	Tyrosinkinase(n)
TKL	Tyrosin-ähnliche Kinase(n)

TLR	Toll-artiger Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TMPO	Lamina-assoziiertes Polypeptid 2
TNF	Tumornekrosefaktor
TPX2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein (auch: Protein TPX2)
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRIF	TIR-Domäne-enthaltendes Adaptermolekül 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol <i>p</i> -(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenylether
TRKA	<i>high affinity nerve growth factor receptor</i>
Troc	2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl
ULD	Ubiquitinartige Domäne (<i>ubiquitin-like domain</i>)
vs.	versus
vSrc	Virale Sarkoma Kinase
wt	Wildtyp
XL665	Heterohexameres Phycobiliprotein-Pigment aus Rotalgen
ZAK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase MLT
ZC1/HGK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase Kinase 4
ZC2/TNIK	TRAF2/NCK-interagierende Proteinkinase
ZC3/MINK	<i>misshapen-like kinase 1</i>
κB	<i>kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

1 Allgemeiner Teil

1.1 Proteinkinasen

Das humane Genom codiert für 518 Proteinkinasen, die als wichtiger Bestandteil in Signalkaskaden viele physiologische Prozesse wie zelluläre Proliferation und Differenzierung, Wachstum, Zellzyklusregulation, Metabolismus sowie Zell-Zell-Interaktionen, neuronale Entwicklung, Gentranskription und die Auslösung von Immunantworten steuern. Ihre Aufgabe besteht vornehmlich in der posttranslationalen, reversiblen Phosphorylierung der Hydroxyl-Seitenketten der Aminosäuren Ser, Thr und Tyr und damit verbundener Aktivierung oder Inaktivierung spezifischer Proteinsubstrate zur Transduktion von Signalen extra- oder intrazellulären Ursprungs. Entsprechend ihrer Funktion werden sie als Transferasen und dabei in die übergeordneten Klassen der Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen kategorisiert.^{1, 2} Obwohl das Element Phosphor schon 1839 als Bestandteil von Proteinen identifiziert wurde, konnte erst 1954 der enzymatisch katalysierte Transfer von Phosphatgruppen auf proteinogene Substrate nachgewiesen werden.^{3, 4} Im historischen Kontext und in Bezug auf die klinische Relevanz betrachtet spielen Proteinkinasen erst seit 1976, durch die Entdeckung dieser Enzymklasse in Assoziation mit deren Fehlregulation als Mediatoren unkontrollierter Proliferation durch Bishop und Varmus, eine Rolle. Diese identifizierten das für eine Tyrosinkinase codierende Proto-Onkogen cSrc als zelleigenes Homolog des ersten bekannten Onkogens vSrc und legten damit einen Meilenstein in der Historie der Entwicklung von Wirkstoffen für die Krebstherapie.⁵ Gleichzeitig war dies die Geburtsstunde der Idee zur Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe in der Krebstherapie, die seit 1942 und bis zur Etablierung und Zulassung des ersten therapeutischen Kinaseinhibitors Imatinib (Gleevec, 2001)^{6, 7} primär auf der chirurgischen Entfernung von Tumoren sowie Verabreichung von Zytostatika oder aber Radiotherapie mit ionisierender Strahlung beruhte.^{8, 9} Ein weiteres einschneidendes Ereignis war die Veröffentlichung der ersten Komplexkristallstruktur einer Phosphotransferase, nämlich der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), im Jahr 1991.¹⁰ Konstitutionell betrachtet zeigt die Gesamtheit aller Kinasen konservierte, übergeordnete Struktur motive (Abbildung 1.1). Im Detail besitzen diese eine N-terminale, vorwiegend aus β -Faltblatt-Strukturen aufgebaute, sowie C-terminale, α -helical dominierte Subdomäne. Beide Domänen werden über einen flexiblen Linker aus bis zu acht Aminosäuren, die sogenannte Scharnierregion, verknüpft. Diese garantiert eine relative Flexibilität beider Domänen zueinander und stellt gleichzeitig einen Interaktionspunkt für die Bindung des

Adenin-Bindungstasche orientiert ist, um dort zur Komplexierung der terminalen Phosphate von ATP beizutragen (Abbildung 1.1B). Im inaktiven Zustand (DFG-out) aber erfolgt die Orientierung *vice versa*, sodass einerseits die Adenin-Bindestelle durch das sterisch anspruchsvolle Phenylalanin zum Teil belegt ist und auch das für die Fixierung der terminalen Phosphatgruppen benötigte Aspartat nicht zur Verfügung steht. Durch diese Umlagerung wird zusätzlich eine hydrophobe allosterische Tasche im Bereich der benachbarten Strukturelemente Helix C und DFG-Motiv zugänglich (vgl. Kapitel 1.2).^{14, 15} Letztlich nimmt auch die Aktivierungsschleife eine entscheidende Rolle in der Ausprägung von aktiven oder inaktiven Konformationen ein. Oftmals führt die Phosphorylierung eines Ser/Thr- oder Tyr-Restes innerhalb dieser Schleife durch die Einführung hoher Ladungsdichte zur Aktivierung der Kinase, indem ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäureresten der katalytischen Schleife, des DFG-Motivs und der Helix C aufgebaut wird, so dass diese Strukturelemente in einer für den Katalysemechanismus bevorzugten Orientierung fixiert werden.^{1, 16} Für den Phosphattransfer unter physiologischen Bedingungen wird der Cofaktor ATP durch diverse Strukturelemente und die Ausbildung eines komplexen Netzwerks aus Wasserstoffbrücken und koordinativen Bindungen zu Mg^{2+} -Ionen fixiert, um eine ideale Positionierung des Triphosphatrestes zu gewährleisten. Im Detail wird die Scharnierregion durch zwei konservierte Wasserstoffbrücken zum Adenin adressiert und der Purin-Ribose-Kern durch die Glycin-reiche Schleife „gedeckt“. Die terminalen Phosphatgruppen werden durch zwei Mg^{2+} -Ionen sowie Lys72ⁱ koordiniert, welches seinerseits Glu91 (Helix C) kontaktiert. Die Metallionen werden zusätzlich von Asp184 des DFG-Motivs komplexiert, welches die charakteristische *in*-Konformation einnimmt. Um den Angriff von Oxonukleophilen und somit den exergonischen Transfer des γ -Phosphats auf ein spezifisches Substrat zu ermöglichen, wird die negative Ladung durch die koordinative Bindung der Metallionen abgeschirmt und weiterhin Asp166 als katalytische Base bereitgestellt (Abbildung 1.1B).^{1, 16}

Das durch Kinasen und Phosphatasen als ihre „Gegenspieler“ fein regulierte dynamische Gleichgewicht posttranslationaler Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse stellt den fehlerfreien Ablauf ihrer physiologisch regulierten Prozesse sicher. Fehlregulationen der Phosphotransferasen bzw. -hydrolasen und deren assoziierten Signalkaskaden führen unweigerlich zu Störungen in präzise regulierten Prozessen, wie beispielsweise Zellzyklus, Proliferation und Apoptose, und in einer Vielzahl der Fälle zur Entstehung von Krankheiten wie Krebs, rheumatoide Arthritis oder Autoimmunerkrankungen. Aus diesem Grund

ⁱ Die Nummerierung erfolgt analog der Aminosäureabfolge von PKA in der Komplexkristallstruktur 1ATP. Hier wurden, im Gegensatz zu physiologischen Bedingungen, die Mg^{2+} - durch Mn^{2+} -Ionen ersetzt, um die Geometrie der Komplexierung des terminalen Triphosphatrestes von ATP im Detail studieren zu können.

und wegen des immer besseren Verständnisses über Struktur und Funktionsweise von Kinasen innerhalb komplexer Netzwerke, stellen diese attraktive Targets in der Wirkstoffforschung dar.¹⁷

1.2 Kinaseinhibitoren

Es existieren unterschiedliche Wege, um eine Inhibition der katalytischen Aktivität von Kinasen hervorzurufen. Im zellulären Netzwerk von Signalkaskaden führen beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen oder Dephosphorylierungsprozesse der Aktivierungsschleife zur Adaption inaktiver Konformationen.¹³ Einen alternativen, artifiziellen Weg repräsentiert die Adressierung der Phosphotransferasen durch niedermolekulare Verbindungen zur Modulation der Transferaseaktivität. Die Klassifizierung der unterschiedlichen Inhibitoren erfolgt prinzipiell nach dem am Zielprotein hervorgerufenen Bindungsmodus. Es gilt dabei Typ-I, Typ-II Typ-III, Typ-IV, sowie kovalent bindende Inhibitoren und Substratmimetika zu unterscheiden (Abbildung 1.2 und Abbildung 1.3).^{14, 15}

Typ-I Inhibitoren binden innerhalb der ATP-Bindetasche und weisen ein ATP-kompetitives Verhalten auf. Dabei wird die Scharnierregion durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu funktionellen Motiven des Liganden adressiert. Die Kinase befindet sich weiterhin in der aktiven *DFG-in* Konformation, eine Katalyseaktivität kann jedoch nicht erfolgen, da die Cofaktor-Bindestelle durch den artifiziellen Liganden belegt ist. Als Beispiel sei der therapeutisch eingesetzte Wirkstoff Dasatinib (Sprycel) zur Behandlung der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) genannt.¹⁸ Dieser bildet zusätzlich am Zielenzym (Abl) eine direkte Interaktion zur Türsteheraminosäure (Thr) aus.

Typ-II Inhibitoren interagieren im initialen Schritt ebenfalls kompetitiv zu ATP, belegen aber im Gegensatz zu Typ-I Liganden nicht ausschließlich die ATP-Bindetasche sondern ebenfalls die hydrophobe allosterische Tasche, die von Helix C und DFG-Motiv flankiert wird und lediglich in der inaktiven Kinasekonformation (*DFG-out*) zugänglich ist. Da signifikante konformationelle Änderungen zur Adaption dieses Zustands kinetisch kontrolliert verlaufen, wird durch die Belegung der hydrophoben Subtasche die Verweildauer des Inhibitors am Zielenzym verlängert.¹⁹ Einen Vertreter dieser Klasse stellt der ebenfalls zur Behandlung von CML eingesetzte Inhibitor Imatinib (Gleevec) dar.⁷

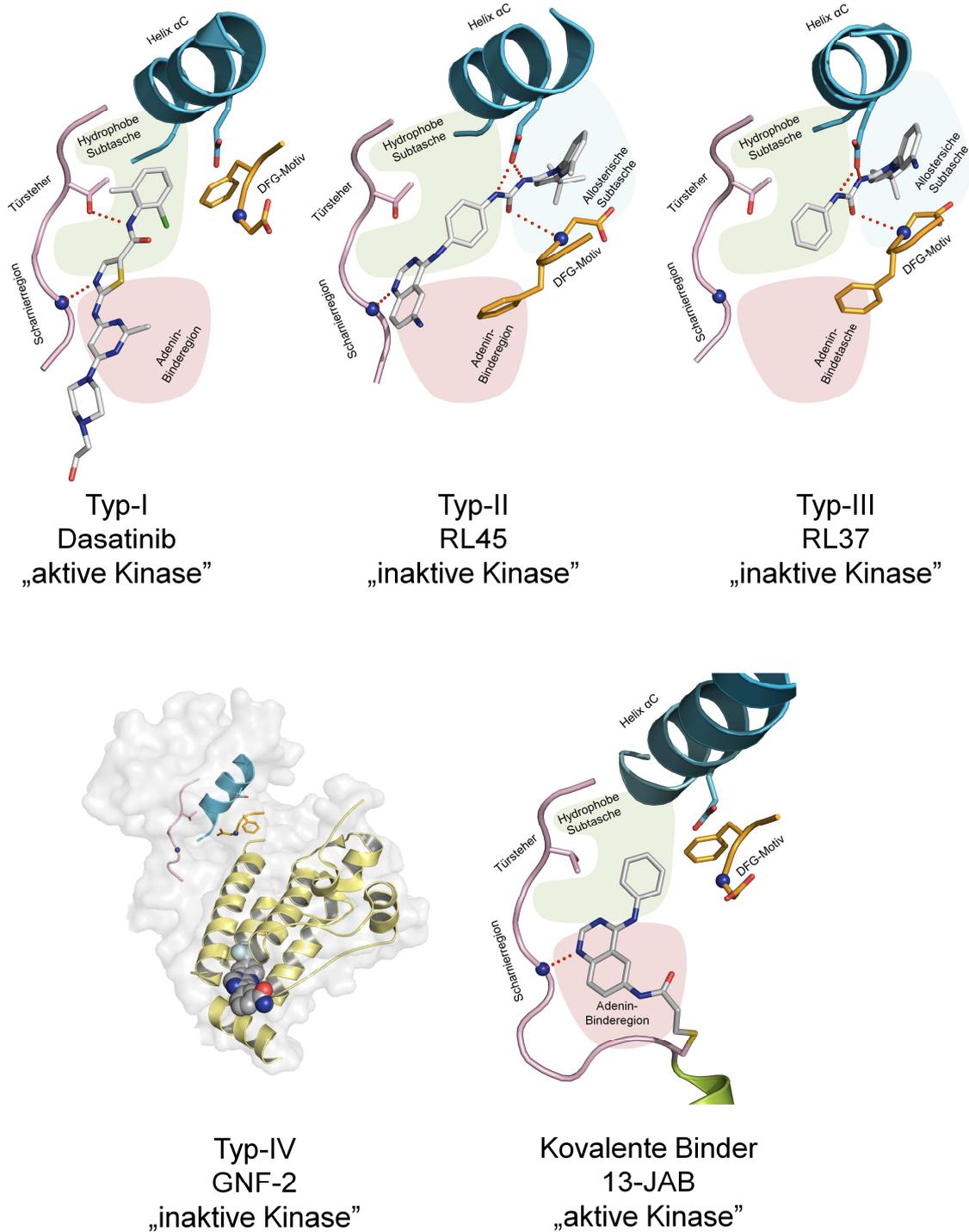


Abbildung 1.2: Bindungsmodi verschiedener Inhibortypen: Der Typ-I Inhibitor Dasatinib im Komplex mit cSrc (PDB-Eintrag: 3G5D) bindet innerhalb der katalytischen Bindungsfurche. Im Falle des Typ-II Inhibitors RL45 wird zusätzlich die zur ATP-Bindetasche angrenzende allosterische Subtasche belegt (hier: p38 α , PDB-Eintrag: 3GCQ). Diese wird im Falle einer Typ-III Inhibition, wie beispielsweise der Interaktion von RL37 mit cSrc (PDB-Eintrag: 3F3U), exklusiv adressiert. GNF-2 als Vertreter eines Typ-IV Inhibitors bindet innerhalb einer entfernt vom aktiven Zentrum der Abelson Kinase lokalisierten, allosterischen Myristoyl-Tasche (PDB-Eintrag: 3K5V). Kovalente Inhibitoren können prinzipiell durch die Gesamtheit der aufgezeigten Bindemodi repräsentiert werden, da die initiale Bindung reversibel verläuft und erst im nachgeschalteten Schritt eine kovalente Bindung ausgebildet wird. Hier ist beispielhaft die kovalente Bindung des initial im Typ-I Modus bindenden 4-Anilinochinazolins 13-JAB zu einem reaktiven Cystein innerhalb der ATP-Bindetasche von EGFR (PDB-Eintrag: 2J5F) gezeigt.

Typ-III Inhibitoren, wie beispielsweise substituierte Pyrazolharnstoffe, belegen exklusiv die in der DFG-*out* Konformation zugängliche allosterische Subtasche und bilden in den meisten Fällen Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureseitenketten der Helix C und zum Peptidrückgrat des DFG-Motivs jedoch nicht zur Scharnierregion aus. Pyrazolharnstoffe zählen zu bekannten Vertretern dieser Klasse, welche jedoch in der klinischen Anwendung eine untergeordnete Rolle spielen. Trotzdem dienen diese vielfach als aussichtsreiche Startpunkte zur Entwicklung von Typ-II Inhibitoren.^{20, 21}

Als Typ-IV Inhibitoren werden rein allosterisch interagierende Liganden bezeichnet, die räumlich weit entfernt von der katalytisch aktiven Tasche binden, aber trotzdem die Kinaseaktivität modulieren können, etwa durch die Rekrutierung regulatorischer Domänen oder aufgrund intrinsischem *cross-talk* zur Induktion konformationeller Änderungen. Voraussetzung für eine allosterische Inhibition ist die Verfügbarkeit einer Bindetasche, die neben dem katalytisch aktiven Zentrum an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt ist, wie z.B. die Myristoyl-Tasche der Abelson Kinase. Neuartige Detektionssysteme wie die Technologie der *Fluorescent Labels in Kinases* (FLiK) schaffen dabei die Grundlage zur Detektion und Identifizierung allosterischer Bindungspartner.²² Für die Myristoyl-Tasche wurden bereits Liganden identifiziert, die inhibitorischen, oder auch aktivierenden Einfluss nehmen können, wie beispielsweise GNF-5²³ (inhibierend) oder DPH²⁴ (aktivierend). In Kombination von GNF-5 mit einem Typ-II Inhibitor wie Nilotinib (Tasigna),^{25, 26} wurden bereits Synergieeffekte bei der Inhibierung der wirkstoffresistenten Abl T315I Mutationsvariante beobachtet.²⁷ Da aber vielfach die relevanten Bindungsstellen, wie etwa die Lipidbindetasche in p38 α , noch nicht hinreichend charakterisiert und in Bezug auf ihre biologischen Funktion evaluiert wurden, werden innovative Methoden und Assaysysteme benötigt, um allosterische Liganden zu identifizieren.

Kovalente Inhibitoren tragen ein reaktives Elektrophil (z.B. Michael-Akzeptorsystem) und können in der Art der primären reversiblen Bindung zum Target grundsätzlich jeglichen o.g. Typus annehmen. Im Anschluss an die initiale Bindung erfolgt die Ausbildung einer direkten kovalenten Bindung zu nukleophilen Aminosäureseitenketten des Zielproteins (in der Regel Cysteine). Dabei kann eine Aktivierung der betreffenden Seitenkette durch die jeweilige Lösungsumgebung und Lokalisierung erfolgen und die Bindungsbildung fördern.^{28, 29} Lange Zeit waren kovalent modulierende Moleküle nicht attraktiv für die Wirkstoffforschung, da sie durch das reaktive Strukturelement oftmals toxische Nebeneffekte hervorriefen. Aktuell findet jedoch ein Aufleben dieser Inhibitoriklasse statt, denn durch gezieltes Feintuning können die unerwünschten Nebeneffekte auf zellulärer Ebene minimiert werden.³⁰ Die Vorteile liegen in der Verweildauer am Zielprotein, die aufgrund der kovalenten

Bindung direkt mit der Proteinneubildung assoziiert ist, sowie der Selektivität, da lediglich wenige Kinasen Cysteine im Bereich der adressierbaren Bindetaschen aufweisen.^{31, 32} Dacomitinib, ein Vertreter dieser Inhibitor-Klasse, befindet sich beispielsweise derzeit in Phase II klinischen Studien zur Behandlung von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.³³

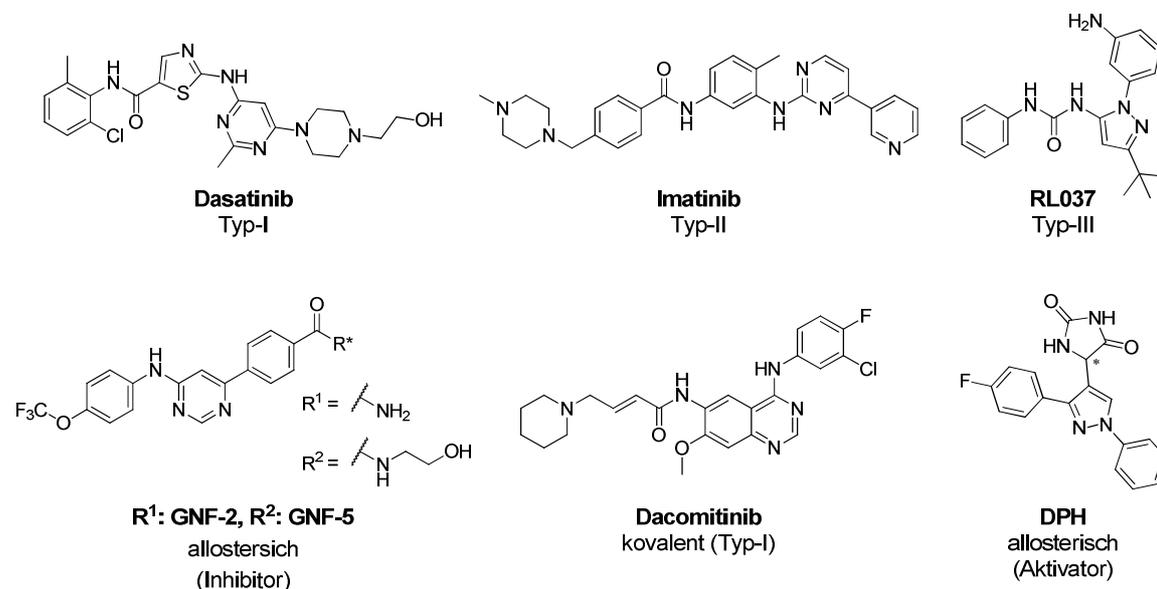


Abbildung 1.3: Übersicht verschiedener Kinaseinhibitoren sowie eines -aktivators.

Substratmimetika stellen eine Klasse der weniger untersuchten Kinaseinhibitoren dar, welche die Aktivierungsschleife bzw. Substratbindestelle in Konkurrenz zum tatsächlichen Proteinsubstrat besetzen. Als Analoga zur Belegung dieser Interaktionsfläche dienen sowohl niedermolekulare organische, als auch peptidische Verbindungen.³⁴ Da die Substratbindestellen unter den Proteinkinasen nicht so stark konserviert sind und darüber hinaus keine Konkurrenz mit ATP in physiologischen Konzentrationen erfolgt, stellt die Verwendung von Substratmimetika als Inhibitoren eine durchaus adäquate Methode zur selektiven Adressierung dar.³⁵

Die Effizienz der Bindung eines Inhibitors oder Liganden zu seinem zugehörigen Zielprotein hängt grundlegend von der Fähigkeit ab konformationelle Änderungen am Target zu induzieren oder selektiv bestimmte Proteinkonformationen zu adressieren. Eine ausgedehnte Verweildauer des Liganden am Protein, welche von der konformationellen Stabilisierung des Protein-Ligand-Komplexes gekennzeichnet ist, ist dabei essentiell für die Effektivität *in vivo*. Historisch betrachtet wurde lange Zeit ein statisches Modell der Protein-Ligand-Interaktion propagiert (Schlüssel-Schloss-Prinzip),^{36, 37} in dem die Bindungstasche als invariabel erachtet wurde. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Bindung eines Inhibitors oder

Liganden als dynamischer Prozess von Assoziation und Dissoziation zum/vom Protein aufzufassen ist. Die konformationelle Dynamik von Zielproteinen (aktive vs. inaktive Konformationen) beeinflusst dabei die Bindung sowie Dissoziation von Liganden. In Bezug auf diese Bindungsereignisse werden die Modelle der konformationellen Selektion und des *induced-fit* unterschieden. Im ersten Fall basiert die Bindung eines Liganden auf der Selektion eines definierten konformationellen Zustands des Zielproteins, welches in einem dynamischen Gleichgewicht verschiedene räumliche Anordnungen adaptieren kann. Ein Ligand bindet nun lediglich eine bestimmte Konformation des Enzyms und entfernt dieses Konformer aus dem Gleichgewicht, so dass es in Richtung dieses Zustands verschoben wird. Im *induced-fit* Modell hingegen werden keine Konformationen selektiert, sondern durch die Bindung des Liganden am Protein induziert. Dabei sind die Erkennungselemente innerhalb der Bindetasche zunächst nicht komplementär zum Binder, sondern erst im Anschluss an die strukturelle Reorganisation des Proteins. In der Literatur sind beide Modelle zur Inhibitor-Target-Interaktion bekannt, aber auch eine Kombination der beiden Extreme zur Ligandenbindung ist möglich.³⁸

Seit der Identifizierung der Kinasen als klinisch relevante Onkogene ist die Entwicklung selektiver Inhibitoren sowohl im akademischen Umfeld als auch in der pharmazeutischen Industrie in den Fokus gerückt. Doch trotz anfänglichem Optimismus, und vielversprechender Perspektiven, beispielsweise aufgrund der Einführung von Imatinib als CML-Therapeutikum, sind bis heute lediglich 15 Kinaseinhibitoren sowie fünf therapeutische Antikörper zur Anwendung in der Krebstherapie zugelassen.³⁹ Viele Wirkstoffe scheitern aufgrund mangelnder Wirksamkeit am Patienten und damit einhergehend an der nicht verstandenen Tumorbiologie, einige am Auftreten toxischer Nebeneffekte, wie im Falle des Inhibitors Tozasertib zur Behandlung von NSCLC, welcher kardiale Nebenwirkungen hervorrief.^{40, 41}

1.3 Zielgerichtete Tumorthherapie

Durch den heutigen Standard in der Sequenzieretechnik besteht die Möglichkeit Tumorzellen zu studieren und die Gründe für ihre Fehlregulation auf der Ebene des Erbguts festzumachen. Mit dem Wissen über die genetischen Läsionen und der Identifizierung treibender Onkogene kann eine personalisierte Therapie mit geeigneten niedermolekularen Inhibitoren, die das gewünschte Zielprotein ausschalten, entwickelt und angewendet werden. Kinasen wurden in vielen Fällen als die ausschlaggebenden, fehlregulierten Proteine in Assoziation mit Tumorwachstum identifiziert und stellen daher einen wichtigen Ansatzpunkt in der

Krebstherapie dar.⁴² Grundlage für die Anwendung einer zielgerichteten Therapie ist einerseits der Zugang zu Informationen über die unterschiedlichen genetischen Abnormitäten, die den Phänotyp der unkontrolliert proliferierenden Tumorzelle bestimmen und andererseits die Verfügbarkeit technischer Methoden, um das Tumorgewebe jedes Patienten individuell zu untersuchen und so die Verabreichung des optimalen Wirkstoffs oder entsprechender Kombinationen zu garantieren. Darüber hinaus müssen folgerichtig auch maßgeschneiderte Moleküle zur Inhibition der fehlregulierten Proteine verfügbar sein. Es wurden große Anstrengungen unternommen, um den Fortschritt in diesen Bereichen voranzutreiben.

Tumore zeichnen sich durch ein hochgradig instabiles Genom aus, das sich in der Theorie mit jeder weiteren Zellteilung verändern kann, da in Tumorzellen vielfach auch DNA-Reparaturmechanismen ausgeschaltet sind. Eine Klassifizierung der vorhandenen genetischen Information ist demnach eine Herausforderung, die nur mit großem Aufwand bewältigt werden kann. Die Initiative zur Gründung des *The Cancer Genome Atlas*⁴³ im Jahr 2006 hatte zum Ziel, möglichst viele Tumore im Hinblick auf ihre genomischen Variationen zu charakterisieren und in einer weltweit zugänglichen Datenbank zusammenzutragen. Bis heute sind die genetischen Annotationen von 24 Tumorarten erfasst. Diese Informationen stellen einen essentiellen Baustein der personalisierten Therapie dar, denn basierend auf diesen Daten können zielgerichtete Therapien eingeleitet und auch zielgerichtete Wirkstoffe gegen charakteristische, onkogene Proteine entwickelt werden. Eine Charakterisierung des vorliegenden Tumors im Patienten und die Identifizierung der relevanten genetischen Biomarker in jedem Einzelfall sind dazu unumgänglich. Für die Diagnostik zur Sequenzierung von Patiententumoren, in den für die Krebsentstehung relevanten Gensegmenten zur Identifikation genetischer Läsionen, müssen derzeit noch Kosten von rund 4000 € aufgewendet werden, doch eine Reduktion dieser Kosten auf 1000 € in einem Zeitfenster von 3-5 Jahren, z.B. durch die Anwendung von DNA-Microarrays,⁴⁴ wird prognostiziert.⁴⁵

Letztlich stellt auch die Verfügbarkeit an klinisch zugelassenen Kinaseinhibitoren (Anzahl: 15) oder therapeutischen Antikörpern (5) eine Limitation dieser personalisierten Therapie dar. Aufgrund des begrenzten Arsenal an Medikamenten, wird auch die Masse an behandelbaren Patienten eingeschränkt, denn so vielversprechend zielgerichtete Therapien für eine präselektierte Population an Probanden erscheinen mögen, so zeigen sie auch, dass Patienten, die nicht die charakteristischen genetischen Läsionen tragen in keiner Weise von dieser Art der Therapie profitieren, obwohl die Tumore einer Entität des gleichen Gewebetyps abgeleitet sind.⁴⁶⁻⁴⁸ Diese Tatsache illustriert, dass die Biologie eines Tumors offensichtlich komplexer ist und vielfach nicht auf die Fehlregulation eines einzelnen Proteins

zurückgeführt werden kann. Ein tiefgreifendes Verständnis der Tumorbiologie ist daher erforderlich, um möglichst alle genetisch veränderten Varianten adressieren zu können.⁴⁵ Bis heute können lediglich einige Krebserkrankungen mit Ausprägung solider Tumore wie Hodenkrebs durch chirurgische Entfernung des Tumors und anschließender Therapie mit Zytostatika und/oder Bestrahlung vollständig geheilt werden. Eine Chemotherapie allein erweist sich in der Vielzahl der übrigen Fälle jedoch als wirkungslos und führt zur dramatischen Verschlechterung der Lebensqualität der Patienten, da durch die Gabe von Zytostatika keine selektive sondern generische Toxizität auf alle sich teilenden Zellen des Organismus ausgeübt wird. Auch durch die innovative Herangehensweise einer zielgerichteten Therapie zeigt sich, dass Krebserkrankungen wie CML oder NSCLC nicht *per se* heilbar sind, da die Patienten immer wieder Rückfälle erleiden, die durch das Auftreten von Resistenzmutationen (vgl. Kapitel 3) bedingt sind. Doch zweifelsfrei besitzen diese Ansätze Vorteile gegenüber der Standardchemotherapie, denn der Einsatz selektiver Kinaseinhibitoren in personalisierten Therapien führt zu weitaus geringerer Toxizität im Vergleich zur klassischen Chemotherapie sowie gesteigerter Überlebenswahrscheinlichkeit.⁴⁹ Letztere steigt beispielsweise bei der Behandlung von CML mit Imatinib über einen Zeitraum von 5 Jahren auf 89%.⁵⁰

Kinaseinhibitoren zeigen enormes Potential in der Krebstherapie und daher wird in der Medizinischen Chemie verstärkt versucht neue Verbindungen zu identifizieren, die durch rationale Optimierungsstudien zu therapeutischen Wirkstoffen weiterentwickelt werden können. Auch in der Chemischen Genetik, zur selektiven Adressierung weitgehend unerforschter Kinasen und Aufklärung ihrer Funktionen sowie Identifikation von Interaktionspartnern in komplexen Signalkaskaden, kommen sie zum Einsatz und leisten so einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Tumorbiologie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kinaseinhibitoren sowohl in medizinalchemischen Studien zur Optimierung von Inhibitoren und Umgehung von Wirkstoffresistenzen in klinisch relevanten Zielproteinen (Kapitel 3), als auch als molekulare Werkzeuge in chemisch-genetischen Ansätzen zum Studium und der Charakterisierung wenig untersuchter Kinasen sowie ihrer assoziierten Signalkaskaden (Kapitel 4) eingesetzt.

2 Zielsetzung und Motivation

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuartiger Kinaseinhibitoren, deren chemische Optimierung sowie biochemische und zellbiologische Charakterisierung. Die so erhaltenen Substanzen sollten anschließend als Sonden in der Chemischen Genetik Anwendung finden.

Sekundärmutationen, die den Aminosäureaustausch an der Türsteherposition von Proteinkinase bewirken, stellen therapeutisch relevante Wirkstoffresistenzen in der zielgerichteten Tumorthherapie dar. Es ist daher von grundlegender Bedeutung, die Mechanismen dieser Resistenz auf molekularer und atomarer Ebene zu verstehen, um strukturbasiert Inhibitoren zu entwickeln, die in der Lage sind, diese Veränderungen in der Bindungstasche der Zielproteine zu umgehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten dazu, ausgehend von Hochdurchsatz-Screens, Hit-Strukturen identifiziert und chemisch auf die Inhibition wirkstoffresistenter Mutationsvarianten der Abelson Kinase (Abl) sowie des Stammzellfaktorrezeptors KIT optimiert werden. Eine Konservierung der inhibitorischen Aktivität gegenüber Türsteher-mutierten Kinasen sollte z.B. durch die Einführung flexibler Strukturmodule angegangen werden. Zur Bestätigung des Bindungsmodus und der rational designten Protein-Ligand-Interaktionen sollte das bekannte cSrc-Kristallisationssystem adaptiert werden. Abschließend war zu prüfen, ob und in welchem Maße die in biochemischen Assaysystemen evaluierten Resultate auch auf zelluläre Ansätze, unter Verwendung von Abl- und KIT-abhängigen Tumorzelllinien (K562 und GIST-T1, GIST-T1 T670I), anwendbar sind. Basierend auf den zuvor generierten Inhibitoren sollten weiterhin klar abgegrenzte Selektivitätsprofile durch eine zelluläre Profilierungsstudie in K562-Zelllysaten erstellt werden. Dazu sollten Teile der bestehenden, fokussierten Bibliothek aus repräsentativen Vertretern durch strukturell verwandte Fragmente und ein Referenzmolekül (BIRB-796-Analogon) erweitert werden.

Um die Tumorbiologie mit Hilfe von chemisch-genetischen Methoden tiefgreifend zu verstehen, ist das Verständnis und die Aufklärung der biologischen Funktion relevanter Onkogene in Signalkaskaden essentiell. Daher sollten in einem weiterführenden chemisch-genetischen Ansatz zunächst die in Vorarbeiten erzeugten chemischen Sonden zur Adressierung von Ark1, einem zur humanen Aurora Kinase verwandtem Homolog aus Spaltheife, biochemisch charakterisiert werden. Der Fokus lag dabei auf der Bestätigung, dass die Elektrophil-tragenden Sonden ausschließlich und spezifisch die rational entworfene *bump and hole* Kinase Ark1-as3-cys (L166A, E173C), aber nicht den Wildtyp inhibieren. Darüber

hinaus sollte der Nachweis erbracht werden, dass die Sondenmoleküle kovalent an das abgewandelte Target binden und im Falle der unveränderten Kinase keine Modifizierung erfolgt. Abschließend sollte eine Substanzbibliothek gegenüber der homologen, humanen Aurora A nach inhibitorisch aktiven Verbindungen durchmustert werden, um neuartige Binder zur Nutzung in weiterführenden chemisch-genetischen Studien zu identifizieren. Angelehnt an diese chemisch-genetischen Studien an Ark1 sollten für das kürzlich als onkogen beschriebene Target TBK1 (TANK-bindende Kinase 1),⁵¹ dessen biologische Funktion bis heute noch nicht vollständig untersucht und nachvollzogen ist,⁵² Hit-Strukturen identifiziert werden, die als Ansatzpunkte für Studien zur Optimierung von Affinität und Selektivität dienen können. Als Basis für rationales Design sollten Substanzbibliotheken mit Hilfe eines aktivitätsbasierten Assaysystems durchmustert werden und TBK1-Homologiemodelle basierend auf bekannten Kristallstrukturtemplatens verwandter Kinasen erstellt werden. Durch die Analyse strukturell ähnlicher, literaturbekannter Moleküle sollten mögliche Bindungsmodi für die biochemisch validierten Trefferverbindungen in TBK1 erarbeitet werden. Die anschließend im rationalen Design entwickelten Verbindungen sollten im Zuge der Generierung einer kleinen, fokussierten Substanzbibliothek synthetisch dargestellt und biochemisch charakterisiert werden. Zudem sollte der Fokus auf dem Design von selektiven und gegebenenfalls kovalenten chemischen Sonden liegen, die im Anschluss für die Untersuchung der biologischen Funktion von TBK1 auf zellulärer Ebene herangezogen werden können. Für den Fall einer möglichen, irreversiblen Adressierung von TBK1 sollte durch ATP-Kompetitionsexperimente der Charakter der Inhibition (reversibel/kovalent) untersucht und gegebenenfalls die Ausbildung einer σ -Bindung zum Zielprotein belegt werden.

Das Verständnis über den Bindungsmodus niedermolekularer Verbindungen ist für deren weitere chemische Optimierung hilfreich. Daher sollten diverse Verbindungen im Komplex mit cSrc sowie p38 α kristallisiert und die erhaltenen Röntgenkristallstrukturen analysiert werden.

3 Strukturbasierte Verfahren der Medizinischen Chemie

Speziell in der Behandlung von Krebs und im Zusammenhang mit Kinasen als onkogene Zielproteine wird oftmals im Rahmen der personalisierten Medizin eine zielgerichtete Therapie verfolgt, die theoretisch eine selektive Adressierung des veränderten, meist konstitutiv aktiven Proteins gewährleisten soll. Aufgrund der konservierten Struktur von Kinasen ist eine selektive Inhibition einzelner Kinasen schwer zu erreichen, doch in Profilierungsstudien zeigte sich, dass einige Therapeutika ebenfalls eine inhibitorische Breitbandwirkung zeigen und diese nicht notwendigerweise nachteilige Auswirkungen mit sich bringt.⁵³⁻⁵⁵ Um jedoch selektive Inhibitoren für stratifizierte Therapien zu entwickeln, muss zunächst ein Target identifiziert und dessen Assoziation zu einem bestimmten Krankheitsbild hergestellt werden. Grundsätzlich sind zwei Arten der zielgerichteten Verfahren bekannt: Einerseits durch die direkte Adressierung der intrazellulär lokalisierten Kinasen mit Hilfe niedermolekularer Inhibitoren und somit Inhibierung der katalytischen Funktion und andererseits die Adressierung extrazellulärer Rezeptorteile mit Antikörpern, die eine Dimerisierung und damit Aktivierung der angehängten intrazellulären Kinasedomäne unterbinden. Weiterhin können letztere ebenfalls dazu genutzt werden selektiv tumorspezifische, an der Zelloberfläche exponierte Strukturen zu erkennen, daran zu binden und so die Aktivierung des Immunsystems zu induzieren.⁴⁵

In den 1960er Jahren konnte für das krankhafte Erscheinungsbild der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) das zugehörige Onkogen identifiziert werden. Die Generierung des Krankheitsbildes basiert auf der reziproken Translokation der Gensegmente *Breakpoint cluster region* (Bcr, Chromosom 22) und des regulatorischen Teils von Abl (Chromosom 9) zum konstitutiv aktiven Fusionsprotein Bcr-Abl (Philadelphia-Chromosom). Permanent aktivierte Kinasen gehen mit der Fehlregulation von Signalkaskaden einher und resultieren daher vielfach in Krebserkrankungen. Das dynamische Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Form liegt dabei vollständig auf der Seite der aktiven Konformation. Anhand der erfolgreichen Entwicklung des Kinaseinhibitors Imatinib (Gleevec, Abbildung 3.1) zur Behandlung dieses Krankheitsbildes kann der Erfolg einer Anwendung zielgerichteter Verfahren belegt werden. Dieser Typ-II Inhibitor zeigt eine antiproliferative Wirkung gegenüber Bcr-Abl exprimierenden Zellen und wurde basierend auf einer identifizierten Leitstruktur zur Hemmung von Proteinkinase C (PKC) rational zur klinischen Reife weiterentwickelt.⁵⁶

Im Detail belegt der Ligand die allosterische Subtasche mit dem Methylpiperazin-Motiv sowie Amid-verbrücktem Aromaten und wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Helix C (Glu286) und Peptidrückgrat des DFG-Motivs (Asp381) fixiert. Das Pyrimidin ist in der ATP-Bindetasche lokalisiert und das verknüpfende Amin an 2-Position kontaktiert den Thr-Türsteher unter Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrücke, während das terminale Pyridin die Scharnierregion über das Peptidrückgrat von Phe317 adressiert.

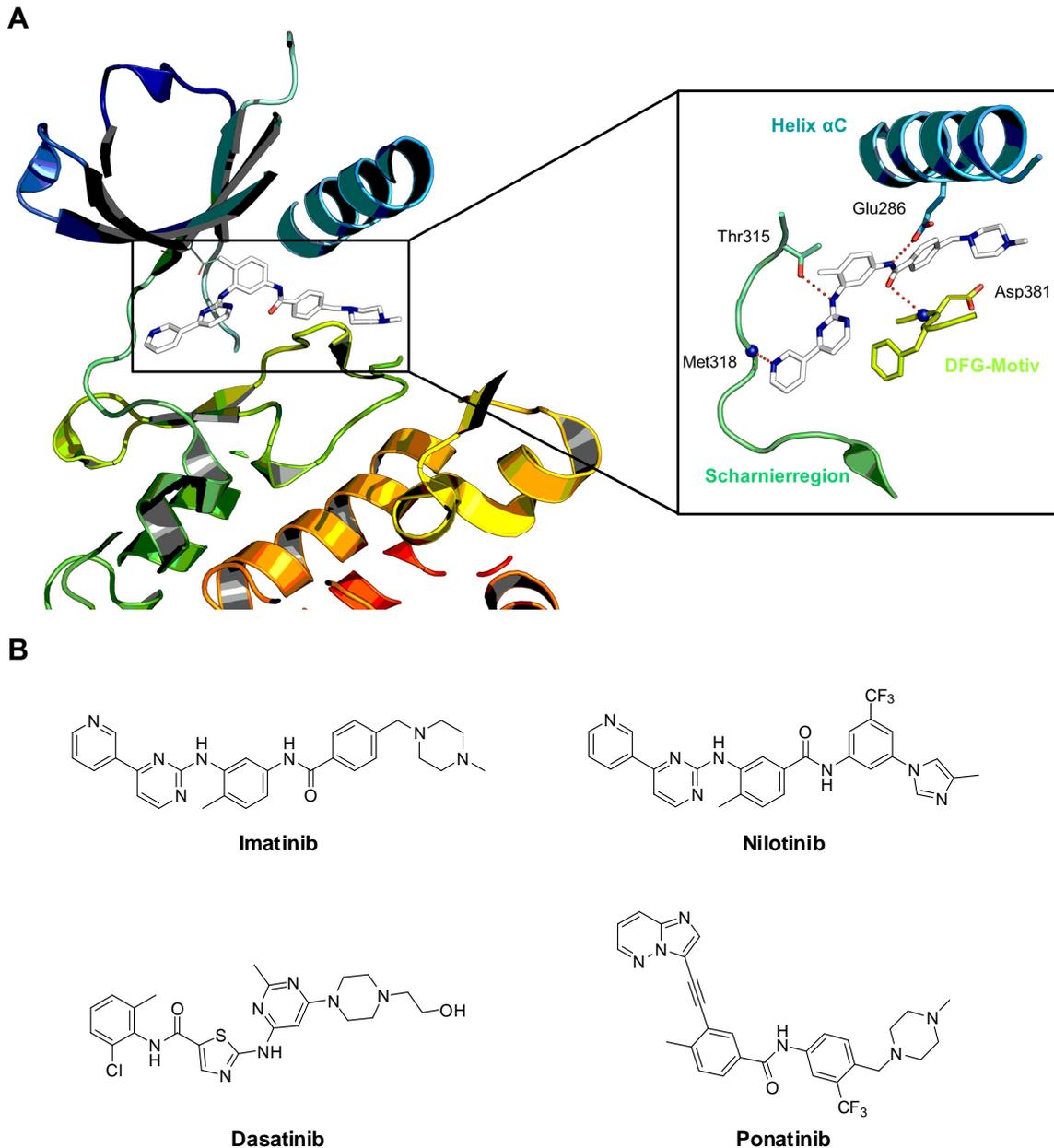


Abbildung 3.1: **A)** Bindungsmodus von Imatinib innerhalb der katalytisch aktiven Tasche von Abl (PDB-Eintrag: 2HYY); **B)** Verschiedene für die therapeutische Anwendung zugelassene Kinaseinhibitoren.

Die CML-Ersttherapie erfolgt heute im Standardverfahren mit Imatinib, doch aufgrund der enormen genetischen Instabilität sowie Inhomogenität und einer hohen Teilungsrate sind Tumorzellen empfänglich für die Adaption von Sekundärmutationen, die die Wirkung von Imatinib herabsetzen. Im Fall von CML sind mehr als 50 erworbene Resistenzmutationen in Form einzelner Basenpaaraustausche auf genetischer Ebene bekannt, die auf proteingener Ebene für die Substitution einzelner Aminosäuren in der katalytischen Kinasedomäne verantwortlich sind.⁵⁷ Durch den von Imatinib hervorgerufenen Selektionsdruck besitzen diese veränderten Krebszellen einen evolutiven Vorteil gegenüber solchen, die lediglich die konstitutiv aktive Fusionsform Bcr-Abl exprimieren und so wird trotz Therapie die Progression der Tumorzellen gefördert. Sämtliche Resistenzformen können durch Inhibitoren der zweiten und dritten Generation, wie Dasatinib (Sprycel)¹⁸ respektive Nilotinib (Tasigna)²⁶ und aktuell Ponatinib (Iclusig),⁵⁸ therapiert werden. Lange Zeit stellte jedoch die Türstehermutation T315I die einzige Resistenzmutation dar, die nicht durch niedermolekulare Wirkstoffe adressierbar war. Durch sterische Repulsion der Liganden aufgrund der im Gegensatz zu Thr315 raumfordernden Aminosäureseitenkette Ile und dem Verlust der essentiellen Wasserstoffbrückenbindung der Inhibitoren zum ursprünglichen Türsteher, wird die Bindungsaffinität soweit herabgesetzt, dass die applizierten Wirkstoffe keinen signifikanten inhibitorischen Effekt mehr herbeiführen. Aktuell gibt die Verbindung Ponatinib (Abbildung 3.1) jedoch Anlass zur Hoffnung, denn der Phase III Kandidat erhielt im Dezember 2012 die beschleunigte Zulassung der FDA zur Behandlung von CML-Patienten nach erfolgloser Ersttherapie.^{6, 59} Trotzdem zeigen sich bei der Therapie, mit dem Auftreten von Hepatotoxizität sowie arteriellen Thrombosen, ernstzunehmende Nebenwirkungen. Wirkstoffresistenzen stellen demnach ein massives Problem in der Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung von Krebserkrankungen dar und daher berücksichtigen die Bemühungen zum rationalen Design von Inhibitoren derzeit schon in frühen Phasen die Möglichkeit auftretender Mutationen. Unter anderem kann die Einführung flexibler Elemente dazu führen, dass eine sterische Repulsion von Ligand und Türsteher vermieden und die Resistenzmutante inhibiert wird (vgl. Kapitel 3.1ff.). In der Entwicklung von Ponatinib durch O'Hare *et al.* führten die Autoren eine C-C-Dreifachbindung als lineares verbrückendes Element ein, das eine relative Flexibilität der Termini gewährleistet, sterisch wenig anspruchsvoll ist und so diese spezielle Form der Resistenzmutation (T315I) umgehen kann.⁵⁸

Aufgrund der hoch konservierten Struktur der katalytischen Tasche stellt auch die Entwicklung selektiver Kinaseinhibitoren immer noch eine große Herausforderung in der Wirkstoffentwicklung dar. So inhibiert Imatinib beispielsweise nicht ausschließlich das Fusionsprotein Bcr-Abl, sondern auch die Rezeptortyrosinkinase KIT und ihre konstitutiv aktiven Formen, welche eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Dies stellt jedoch in diesem Fall

keinesfalls eine Hürde in der klinischen Verwendung dar, denn mit dem weiteren Target war auch eine Anwendung in der Behandlung solider Gastrointestinaler Stromatumore (GIST) möglich, in denen konstitutiv aktives KIT das onkogene Zielenzym darstellt. Aktuelle Studien sowie die Erstellung von Inhibitions- und Selektivitätsprofilen belegen, dass neben Imatinib viele der für die klinische Therapie verfügbaren Kinaseinhibitoren, wie beispielsweise Gefitinib (Iressa) oder Erlotinib (Tarceva) ein breites Spektrum unterschiedlicher Kinasen adressieren.⁵⁴ Diese belegen, dass die Promiskuität der Bindung eine untergeordnete Rolle in der Anwendung spielt, sofern kein potentiell Toxizität-auslösendes Zielprotein adressiert wird. Aus diesem Grund werden aktuell vermehrt Anstrengungen unternommen, um Inhibitoren im Vorfeld der weiteren Entwicklung und klinischen Prüfung distinkte Selektivitätsprofile zuzuordnen und die Möglichkeit einer generischen Toxizität, hervorgerufen durch den Liganden, zu minimieren. Dazu stehen unterschiedlichste Methoden der Profilierung zur Verfügung (vgl. Kapitel 3.3). Im Falle der selektiven Inhibition eines Zielproteins in der zielgerichteten Tumortherapie besteht die Möglichkeit, dass unter physiologischen Bedingungen eine spezifische inhibitorische Wirkung durch Aktivierung redundanter Signalwege aufgehoben wird. Daher ist es oftmals vorteilhaft neben dem treibenden Onkogen simultan auch den analogen Signalwegen assoziierte Enzyme zu adressieren.⁶⁰ Obwohl heutzutage bekannt ist, dass die Biologie eines Tumors hochgradig komplex und in den meisten Fällen nicht ausschließlich von einem Onkogen abhängig ist und diese Erkenntnis den Ansatz der auf ein Zielenzym fokussierten zielgerichteten Therapie grundlegend aushebelt, kann dennoch die Möglichkeit einer kombinierten Therapie, unter Verwendung verschiedener selektiver Inhibitoren, verfolgt werden. In vielen Fällen zeigte sich bis heute, dass das Zusammenspiel mehrerer Wirkstoffe durchaus erfolgversprechend ist, wie im Fall des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin) und des niedermolekularen Inhibitors Lapatinib (Tykerb) in der Therapie von Brust und Magenkrebs.^{61, 62}

Viele akademische Gruppen halten an der Entwicklung bzw. Identifizierung möglichst selektiver Inhibitoren fest, da diese ideale Werkzeuge für die Entschlüsselung von wenig untersuchten Signalkaskaden und Interaktionsnetzwerken darstellen (vgl. Kapitel 4) und so das Verständnis über die biologische Funktion onkogener Proteine und ihrer assoziierten Interaktionsnetzwerke gefördert wird. Basierend auf diesem grundlegenden Verständnis der regulatorischen Komplexität von Signalkaskaden können neue Ansatzpunkte für die rationale Entwicklung neuartiger Inhibitoren definiert, sowie attraktive Zielenzyme identifiziert werden.³⁹

3.1 Umgehung von Wirkstoffresistenzen in Abl und KIT

Der überwiegende Teil an Kinaseinhibitoren bindet innerhalb der ATP-Bindetasche einer Kinase (Typ-I und Typ-II). Diese stellen heute leistungsfähige Werkzeuge im therapeutischen Ansatz zur zielgerichteten Tumorthherapie dar. Als Leitbild sei der oben beschriebene Fall von Imatinib (Gleevec) zur Behandlung von CML⁶³ und GIST^{64, 65} mit den zugehörigen Onkogenen *Bcr-Abl* und *KIT* genannt, um nur ein Beispiel für den Einsatz von Kinaseinhibitoren als Wirkstoffe in der Krebstherapie anzuführen. Obwohl diese Art der Inhibitoren sehr erfolgreich in der Ersttherapie eingesetzt wird, birgt das Auftreten von Resistenzmutationen innerhalb der katalytischen Domäne während späterer Phasen der Krankheit eine immer größer werdende Herausforderung.⁵⁰ Mit Beginn der Etablierung von DNA-Sequenzierungsmethoden und fortschreitender Optimierung dieses Ansatzes ist es heute möglich primäre Tumoren auf ihre genetische Alteration und den Amplifikationsstatus onkogener Genabschnitte zu untersuchen. Inzwischen wurde festgestellt, dass für einen Teil der Tumore ein hohes Aufkommen an Mutationen im aktiven Zentrum von Kinasen für diese Resistenzen verantwortlich ist.⁶⁶ Aus dieser Tatsache ergibt sich das Problem der erworbenen Wirkstoffresistenz in der Langzeitbehandlung von Krebs.⁶⁷⁻⁶⁹ Die Behandlung einer klinisch observierten Patientenpopulation von CML-Patienten führt beispielsweise in durchschnittlich 30% der Fälle zu Wirkstoffresistenzmutationen in der katalytischen Domäne von Bcr-Abl oder Unverträglichkeiten gegenüber Imatinib innerhalb der ersten fünf Jahre.⁵⁰ Im Falle von Patienten, welche an GIST leiden stellt sich die Situation sogar deutlich dramatischer dar, denn 14% aller Patienten zeigen keine initiale Resonanz auf Imatinib und weitere 50% entwickeln innerhalb der ersten zwei Jahre der Behandlung eine Wirkstoffresistenz durch Mutationen innerhalb der Kinasedomäne des Stammzellwachstumsfaktorzepetors KIT.⁶⁴ Diese Situation verdeutlicht, dass die Entwicklung neuartiger Inhibitoren, die klinisch relevante Kinasen modulieren, noch immer hohe Priorität genießt.

Eine der bekanntesten wie auch auf molekularer Ebene auffälligsten Mutationen stellt der Austausch der Türsteheraminosäure dar, welche den Zugang zur ATP-Bindetasche sowie die Selektivität gegenüber Bindungspartnern kontrolliert, wie beispielsweise im Falle der T315I-Mutation des onkogenen Fusionsproteins Bcr-Abl in CML. Diese spezifische Genfusion sorgt einerseits für die konstitutive Aktivität der Abl-Kinase, andererseits ist es der mutationsbedingte Austausch der Türsteheraminosäure, welcher eine sterische Abstoßung von Typ-I und Typ-II Bindern induziert.⁷⁰ Zudem repräsentiert die T315I-Mutante die einzige unter mehr als 50 Resistenzmutationen der katalytischen Domäne, die bis heute - mit Ausnahme des Wirkstoffs Ponatinib - in der Krebstherapie nicht mit den bekannten Kinaseinhibitoren therapierbar ist.^{57, 71} In Relation dazu führt bei GIST nicht die Fusion zweier

Gensegmente, sondern der primär erworbene Austausch V559D innerhalb der regulatorischen Juxtamembran-Region von KIT zur permanenten Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase, während die Sekundärmutation T670I an der Türsteherposition mit einer Unempfindlichkeit gegen die Ersttherapie mit Imatinib einhergeht.^{72, 73}

Eine Möglichkeit die Problematik der Resistenzmutationen innerhalb der ATP-Bindetasche zu umgehen ist die Verwendung von Inhibitoren mit allosterischem Bindungsmodus. Da keine direkte Interaktion innerhalb des katalytischen Zentrums stattfindet, können auf diese Weise die bisher bekannten Mutationen umgangen werden sodass aktuell auch die Entwicklung allosterisch bindender Wirkstoffe, welche die Zielkinase in ihrer inaktiven Konformation stabilisieren, verfolgt wird.^{14, 21, 74}

Eine weitere Alternative, die nicht die allosterische Interaktion beinhaltet, stellt die Einführung flexibler Strukturmodule dar, um einer sterischen Hinderung mit einem räumlich anspruchsvollen Türsteher aus dem Weg zu gehen. 2009 wurde dazu in der AG Rauh die strukturbasierte Entwicklung von Typ-II cSrc-Inhibitoren beschrieben.²⁰ Die Fusion schwach affiner Pyrazolharnstoffe (Typ-III, $IC_{50} \approx 20 \mu\text{M}$) mit Chinazolinkernen (Typ-I, $\approx 6 \mu\text{M}$) führte zu potenten Typ-II Hybriden ($\approx 23 \text{ nM}$) mit konservierter Bindungsaffinität hinsichtlich der Türstehermutante T338M in biochemischen als auch zellulären Untersuchungen. Basierend auf Röntgenstrukturanalysen von Protein-Inhibitor-Kristallkomplexen konnte die intrinsische Flexibilität eines verbrückenden Strukturelements, welches durch Rotation einer sterischen Hinderung mit dem Türsteher aus dem Weg geht, als Grund für die aufrechterhaltene Wirkung manifestiert werden.

Auch O'Hare *et al.*⁵⁸ zeigten bereits, dass verbrückende Elemente wie z.B. Alkine, die sterisch wenig anspruchsvoll sind und zudem noch die Rotation der terminalen Brückenglieder ermöglichen, zur Umgehung von Türstehermutationen nutzbar sind. Hier wurden ebenfalls Typ-I und Typ-III Binder verknüpft, um die T315I-Variante von Abl zu umgehen. Die erzeugten Derivate waren in der Tat dazu geeignet die evaluierte *in vitro* Aktivität sowohl in zellulären Studien als auch in *Xenograft*-Modellen zu konservieren.⁷⁵ Ein Vertreter aus der Reihe der entwickelten Verbindungen (Ponatinib) befindet sich derzeit in Phase III klinischen Studien als pan-Bcr-Abl Inhibitor für die Behandlung von CML^{59, 76} und wurde im Dezember 2012 durch die FDA im beschleunigten Verfahren für die Therapie von CML-Patienten nach erfolgloser Ersttherapie zugelassen.⁶

3.2 Ergebnisse

3.2.1 HTS zur Identifizierung von Abl T315I Inhibitoren

Um einen Ansatzpunkt für die Synthese und strukturelle Optimierung von Inhibitoren zur Umgehung der wirkstoffresistenten T315I-Variante der Abelson-Kinase zu erhalten, wurden zwei Substanzbibliotheken nach interessanten Kerngerüsten mit inhibitorischer Aktivität durchmustert. Dabei wurden die laboreigene Substanzbibliothek („RL“) bestehend aus 839 Verbindungen als auch eine kommerziell erhältliche Bibliothek mit 968 Strukturen („Vichem“) eingesetzt. Zur Durchmusterung wurde das aktivitätsbasierte Testsystem KinEASE™ (Cisbio) genutzt, welches die relative Aktivität einer Kinase in An- und Abwesenheit von Inhibitoren durch Quantifizierung der Phosphorylierung eines artifiziellen Peptidsubstrats determiniert. Mit 29 Verbindungen, die bei einer Konzentration von jeweils 13.2 μM eine verbleibende Restaktivität von $\leq 20\%$ am untersuchten Enzym hervorriefen, konnte unter Verwendung der „RL“-Bibliothek eine Trefferrate von 3.5% erzielt werden. Aus der Clusteranalyse der erhaltenen Ergebnisse, welche sowohl den strukturellen Verwandtschaftsgrad der unterschiedlichen Gerüste, als auch deren inhibitorische Aktivität in Bezug auf das untersuchte Zielenzym illustriert und korreliert (Abbildung 3.2), gehen geeignete Grundstrukturen für Optimierungsstudien hervor. Besonderes Interesse erweckten in diesem Zusammenhang die zuvor in der AG Rauh entwickelten Hybridinhibitoren (**1**) zur Adressierung der Tyrosinkinase cSrc sowie der Türsteher-mutierten Form T338M.²⁰ Diese wurden explizit für die Adressierung der Mutante entworfen, die jedoch klinisch im Gegensatz zu Abl T315I und KIT T670I lediglich eine untergeordnete Rolle einnimmt. Eine Übertragbarkeit des Wirkverhaltens schien aufgrund der stark konservierten Struktur beider Tyrosinkinasen durchaus sinnvoll und daher wurde diese Klasse an Substanzen biochemisch validiert und als Grundlage für weitere Optimierungsstudien herangezogen, zumal der Bindungsmodus (Typ-II) in cSrc bereits untersucht wurde²⁰ und so ein Ansatzpunkt für rationales Design zur Verfügung stand. Der im Zuge der Validierung der Trefferverbindung ermittelte IC_{50} -Wert gegenüber Abl T315I lieferte mit 141 nM noch Freiraum für weitere Optimierungen.

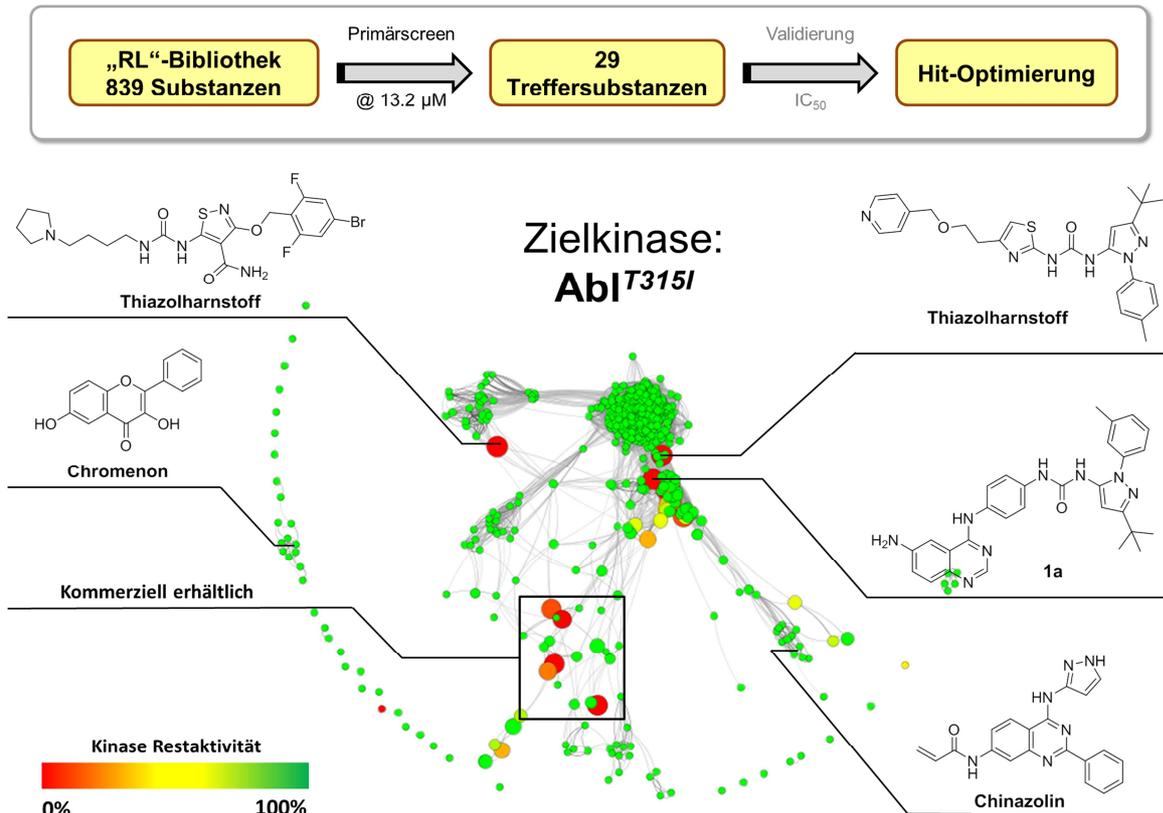


Abbildung 3.2: Durchmusterung einer internen Bibliothek der AG Rauh gegen Abl T315I: Generelle Vorgehensweise: In einer initialen Durchmusterung bei einer Konzentration der entsprechenden Substanzen von 13.2 µM wurden 29 Treffersubstanzen identifiziert. Strukturell interessante Verbindungen wurden in weiteren Validierungsschritten bestätigt (oben); Clusteranalyse der gesamten Substanzzusammenstellung hinsichtlich struktureller Ähnlichkeit in Korrelation mit inhibitorischer Aktivität (unten). Die Größe der Kreise illustriert die Diskontinuität der SAR im Hinblick auf strukturell eng verwandte Verbindungen.

Neben den Hybridverbindungen zeigten sich auch Vertreter der Klassen von Thiazolharnstoffen, sowie Harnstoff-verbrückten Pyrazolothiazole als potente Verbindungen zur Adressierung der wirkstoffresistenten T315I-Mutante (vgl. Abbildung 3.2). Ebenfalls unter den Trefferverbindungen waren die in der Bibliothek implementierten kommerziell erhältlichen Kinaseinhibitoren Erlotinib, Sunitinib, Bosutinib, Vandetanib und Axitinib. Diese Gerüstklassen sowie bereits kommerzialisierte Inhibitoren wurden jedoch im Rahmen dieses Projekts nicht weiter verfolgt.

In einer zweiten Studie konnten auch aus der kommerziell erhältlichen „Vichem“-Bibliothek geeignete Vertreter identifiziert werden, die die Mutationsvariante T315I in signifikantem Maße ($\leq 25\%$ Restaktivität) inhibierten. Unter diesen befanden sich literaturbekannte Grundgerüste, welche vielen bekannten Kinaseinhibitoren gemein sind wie beispielsweise Oxindole, Pyrimidine und Pyrazolopyrimidine.^{7, 77} Darüber hinaus wurden aber auch Benzothiophene, Pyridopyrimidinone, Dihydropyrrolopyrazole und Tetrahydroxyphenanthridinone identifiziert (Abbildung 3.3). Die Trefferrate innerhalb der Bibliothek, bestehend aus

bekannten Inhibitorgrundgerüsten, lag mit 70 herausgestellten Verbindungen bei 7.2%, von denen 13 repräsentative Vertreter biochemisch in einem einfachen Bestätigungsexperiment (vgl. Kapitel 9.2.2) validiert wurden.

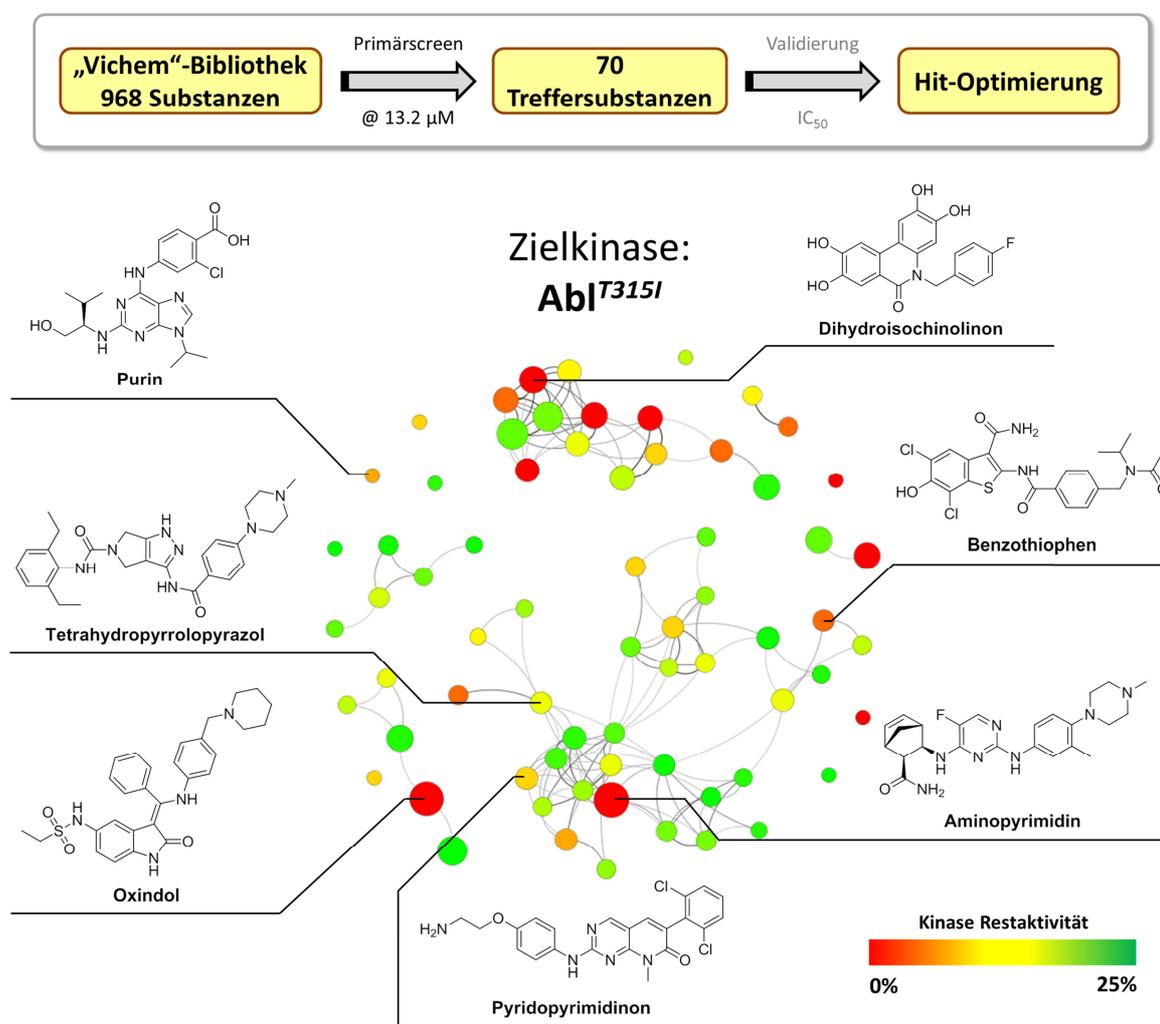


Abbildung 3.3: Durchmusterungskampagne einer Sammlung an fokussierten Kinaseinhibitoren gegen Abl T315l: Generelle Verfahrensweise sowie Clusteranalyse der Strukturähnlichkeiten der 70 Trefferverbindungen in Korrelation mit dem erzielten Effekt im aktivitätsbasierten Assaysystem. Die Größe der Kreise illustriert die Diskontinuität der SAR im Hinblick auf strukturell eng verwandte Verbindungen.

Die biochemische Evaluierung zeigte für das Gros der ausgewählten Moleküle einen IC_{50} -Wert im Bereich ≤ 500 nM und damit ebenso Potential, um durch strukturelle Optimierungen eine signifikante Erhöhung der inhibitorischen Effekte herbeizuführen (vgl. Abbildung 3.4). So bieten beispielsweise das Thiazol **V6** (181 nM) oder aber das Triazol **V7** (65 nM) einerseits adäquate Inhibitionsstärke, andererseits aufgrund ihrer strukturellen Komposition und ihres in Relation betrachtet geringen Molekulargewichts (≈ 400 Da) Ansatzpunkte zur weiteren Derivatisierung. Darüber hinaus besitzen diese Verbindungen, mit

Ausnahme des verbrückenden Elements, eine vergleichbare Struktur und zeigen daher bereits eine SAR in Bezug auf ihre terminalen Substituenten. Im Falle eines Sulfonamids in *para*-Position des anilinischen Aromaten wie in **V7** wurde im Vergleich zum Morpholin-substituierten Analogon **V6** eine dreifach höhere inhibitorische Aktivität (65 nM vs. 181 nM) nachgewiesen.

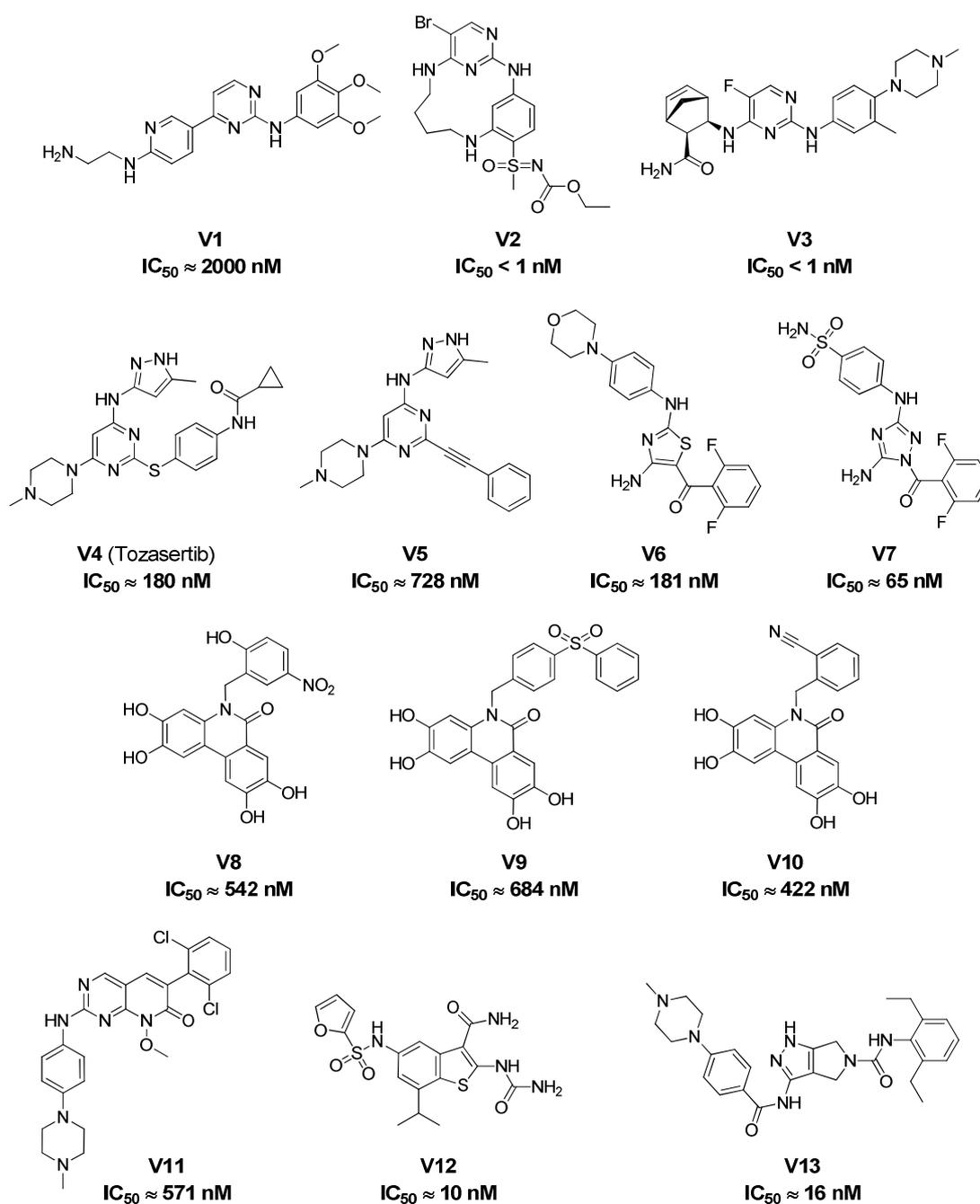


Abbildung 3.4: IC_{50} -Validierung einer Auswahl an strukturell vielversprechenden Treffern der „Vichem“-Bibliothek (Einfach durchgeführtes Experiment in Triplikaten).

Trotz zahlreicher Vertreter aus „RL“- und „Vichem“-Bibliothek, die eine grundsätzliche Affinität zu Abl T315I aufwiesen, wurde der Fokus für die nachfolgenden Studien zur Optimierung der Gerüststruktur auf die Hybridverbindung **1a** (Abbildung 3.5A) gelegt, da zu dieser bereits der Bindungsmodus im Komplex mit cSrc evaluiert wurde, welcher als Grundlage für das aufbauende rationale Design diente. Aus der Gesamtheit der übrigen Verbindungen wurden keine weiteren Strukturen für tiefergehende Untersuchungen selektiert.

3.2.2 Strukturbasiertes Design zur Optimierung von Typ-II

Inhibitoren

Aufgrund der Tatsache, dass cSrc, Abl und KIT zu einer eng verwandten Familie von Tyrosinkinasen zählen, wurde cSrc als initiales Modellsystem zum rationalen Design neuartiger Hybridinhibitoren auf bekannten 1,3- und 1,4-verknüpften Grundgerüsten²⁰ herangezogen. Die strukturelle Ähnlichkeit aller drei Transferasen stellte dabei sicher, dass die durch Modellierung erzielten Resultate zumindest in der Theorie ebenfalls auf die Kinasen Abl und KIT übertragbar waren. Aus den Optimierungsstudien, welche auf die Verlängerung bzw. Derivatisierung der 6-Position des Chinazolin-Kerns mit H-Brücken-Akzeptoren abzielten (Abbildung 3.5C,D), ging hervor, dass die Einführung polarer, tertiärer Stickstoffmotive zu zusätzlichen Interaktionen mit Aminosäuren führen kann, die am Rande des aktiven Zentrums in der Scharnierregion lokalisiert sind. Dabei sollten Asp348 in cSrc bzw. Asp325 in Abl und Asn680 in KIT adressiert werden. Gleichzeitig versprach diese Veränderung eine Erhöhung der zuvor moderaten Löslichkeit der niedermolekularen Moleküle durch Maximierung polarer Interaktionen im Umgebungslösungsmittel (Wasser).

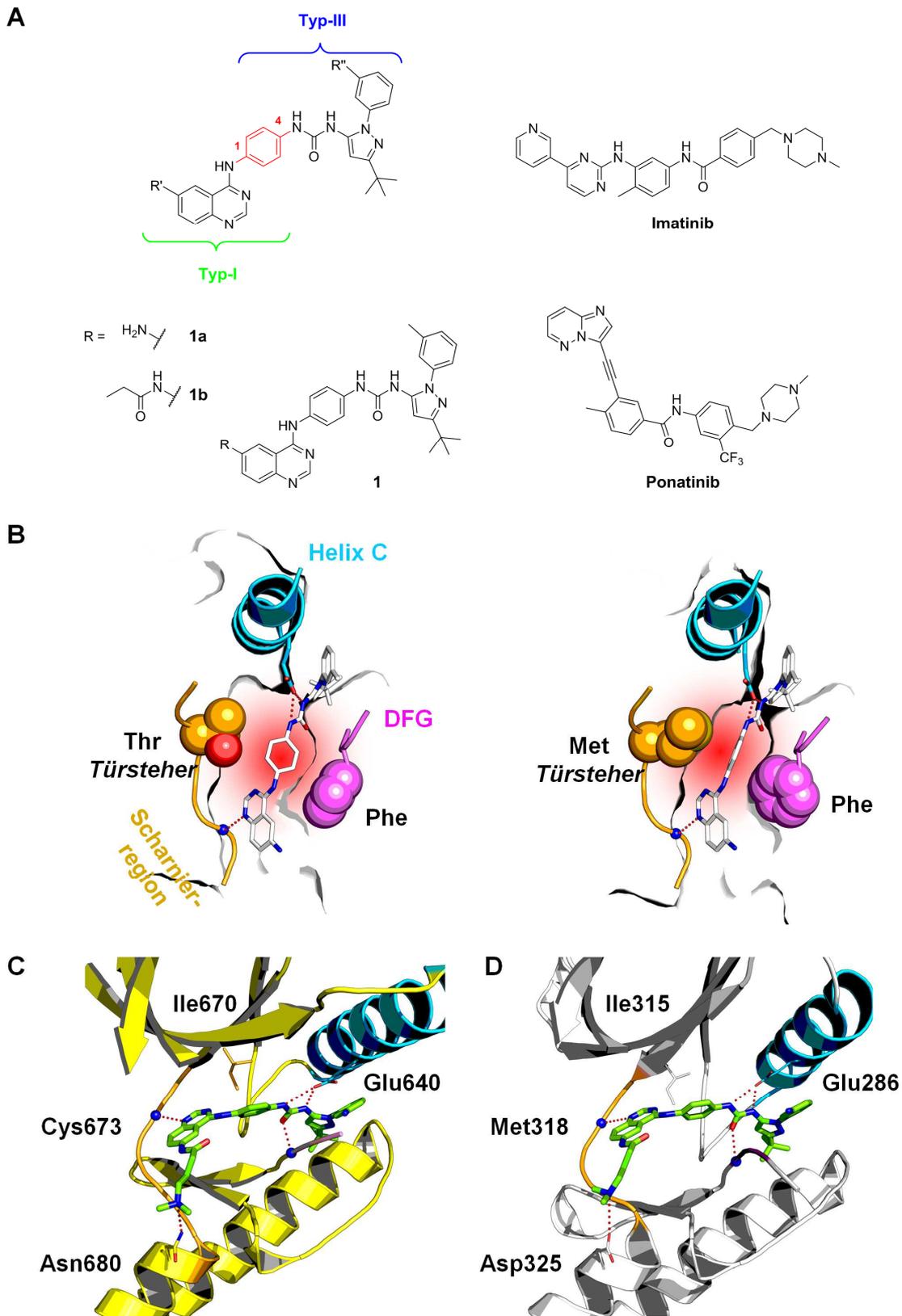
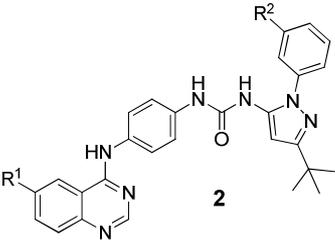
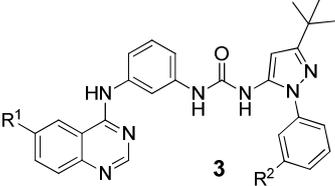
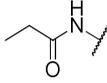
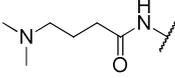
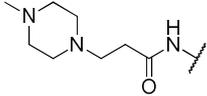
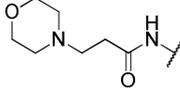
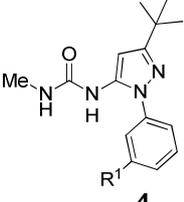
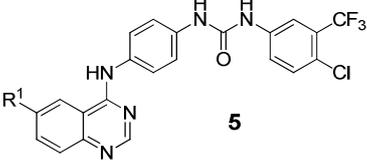


Abbildung 3.5: A) Allgemeines Grundgerüst eines 1,4-verknüpften Typ-II Hybridinhibitors, bestehend aus Typ-I und Typ-III Fragmenten. **1** repräsentiert die in Vorarbeiten rational designten Moleküle, um cSrc wt und die T338M-mutierte Form zu adressieren. B) Schematische Übersicht zur Umgehung sterischer Repulsion an raumfordernden Türsteheraminoacids (z.B. Met) am Beispiel von **1a** im Komplex mit cSrc wt (links) und cSrc T338M (rechts). C/D) Modellierung von **2g** (vgl. Tabelle 3.2.1) in das aktive Zentrum der *in silico* mutierten Wirkstoff-resistenten KIT T670I (adaptiert von PDB-Eintrag: 1T46, C) sowie Abl T315I (PDB-Eintrag: 3IK3, D) durch Superposition mit der korrelierenden cSrc-**1a**-Komplexstruktur (PDB-Eintrag: 3F3W).

Als Kontrollmoleküle wurden ebenfalls die entsprechenden Vertreter ohne jegliche Substitution an der Chinazolin-6-Position als auch 1,3-verbrückte Moleküle entworfen. Zusätzlich zu den Veränderungen am Chinazolinkern wurde die *m*-Methylgruppe des Pyrazol-verknüpften aromatischen Rings durch eine Amino-Funktionalität ersetzt. Auf diese Weise können polare Interaktionen mit einer polaren Furche oberhalb der allosterischen Subtasche begünstigt werden, die durch die Seitenketten der Aminosäuren Glu310 (Helix C), Asp404 (Aktivierungsschleife) und Lys295 (katalytisch aktiv) gebildet wird. Unter der Vermutung, dass diese polaren Interaktionen nicht nur die Affinität zu den wt-Kinasen, sondern auch zu ihren Türsteher-mutierten Pendants cSrc T338M, Abl T315I und KIT T670I steigern, wurde diese charakteristische Abänderung am Inhibitorgrundgerüst vorgenommen. Ferner wurde der Pyrazolo-Teil der Struktur durch das hydrophobe Motiv des literaturbekannten Multikinaseinhibitors Sorafenib (Nexavar)⁷⁸ ersetzt, um a) eine weitere Steigerung der inhibitorischen Potenz zu erzielen und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zwischen den unterschiedlichen Strukturen herauszustellen als auch b) die Relevanz dieses strukturellen Motivs innerhalb der Hybridinhibitoren zu studieren (Tabelle 3.2.1).

Basierend auf den Modellierungsstudien von Verbindung **2g** mit KIT (PDB-Eintrag: 1T46) und Abl (PDB-Eintrag: 3IK3) auf Grundlage der Kristallstruktur von **1a** im Komplex mit cSrc (PDB-Eintrag: 3F3W) bleibt der vorausgesagte Bindungsmodus von Typ-II Inhibitoren der zweiten Generation konsistent mit der Art der Protein-Inhibitor Interaktion, die in früheren Studien eruiert wurde (Abbildung 3.5C,D).²⁰ Dabei adressiert das N1 des Chinazolins die Scharnierregion und das Harnstoffmotiv wird zwischen Helix C und DFG-Motiv, welches die *out*-Konformation einnimmt, fixiert. Der flexible 1,4-verknüpfte Phenylring fungiert als verbrückender Teil und interagiert seinerseits mit dem DFG-Phenylalanin in einer durch induzierte Dipole hervorgerufenen, energetisch günstigen *face-to-edge* Orientierung,⁷⁹ wobei die aromatischen π -Elektronensysteme orthogonal zueinander stehen. Der Pyrazolo-Teil ist innerhalb der allosterischen Tasche lokalisiert, welche exklusiv in der inaktiven Konformation der Kinase zugänglich ist.

Tabelle 3.2.1: Übersicht über die rational erzeugte Substanzbibliothek bestehend aus unterschiedlich substituierten 1,4- und 1,3-Hybridinhibitoren, sowie Fragmenten und Strukturen mit abgewandeltem Pyrazolo-Part.

	Verbindung	R ¹	R ²
 <p>2</p>	2a	NO ₂	NO ₂
	2b	H	NO ₂
	2c	NH ₂	NH ₂
	2d	H	NH ₂
	2e	NH ₂	NHFmoc
 <p>3</p>	2f		NH ₂
	2g		NH ₂
	2h		NH ₂
	2i		NH ₂
 <p>4</p>	3a	H	NO ₂
	3b	H	NH ₂
 <p>5</p>	4a	NO ₂	---
	4b	NH ₂	---
	5a	NO ₂	---
	5b	NH ₂	---

Im Falle der 1,3-verknüpften Kontrollverbindungen wurde lediglich eine inhibitorische Aktivität gegenüber dem Wildtyp der Tyrosinkinasen erwartet, während die mutierten Transferasen aufgrund der Rigidität des Inhibitors und der zu erwartenden sterischen Hinderung mit der räumlich anspruchsvollen Türsteheraminosäure nicht adressiert werden sollten.²⁰

Abschließend wurden auch Fragmente (**4a,b**) in die zu synthetisierende, fokussierte Substanzbibliothek aufgenommen, um die Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) zwischen diesen und den erweiterten Inhibitoren (**2**, **3** und **5**) biochemisch zu evaluieren. In nachfolgenden Studien konnten diese ebenfalls dazu herangezogen werden unterschiedliche zelluläre Target- und Affinitätsprofile und den Beitrag der einzelnen Struktur motive zu Affinität sowie zellulärer Selektivität zu untersuchen (vgl. Kapitel 3.4).

3.2.3 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothekⁱⁱ

Zur Synthese einer kleinen Bibliothek unterschiedlich verbrückter Typ-II Inhibitoren von cSrc, Abl und KIT (Tabelle 3.2.1) wurde besonderes Augenmerk auf die Derivatisierung der Chinazolin-6-Position mit polaren Motiven, die in der Kinaseinhibitor-Forschung häufig zur Erhöhung der Löslichkeit eingesetzt werden (z.B. Morpholin, Methylpiperazin), gelegt.^{80, 81} Durch die unterschiedliche strukturelle Zusammensetzung dieser neuen Verbindungen konnten sowohl distinkte Inhibitionsprofile als auch SARs erwartet werden, die im Falle der 1,4-fusionierten Inhibitoren mit einer Umgehung der Türstehermutationen einhergehen sollten. In die Bibliothek wurden ebenfalls Typ-III ähnliche Fragmente (**4a,b**) der Hybridinhibitoren implementiert, um den Einfluss der Summe der einzelnen Teile eines Typ-II Inhibitors untersuchen und illustrieren zu können.

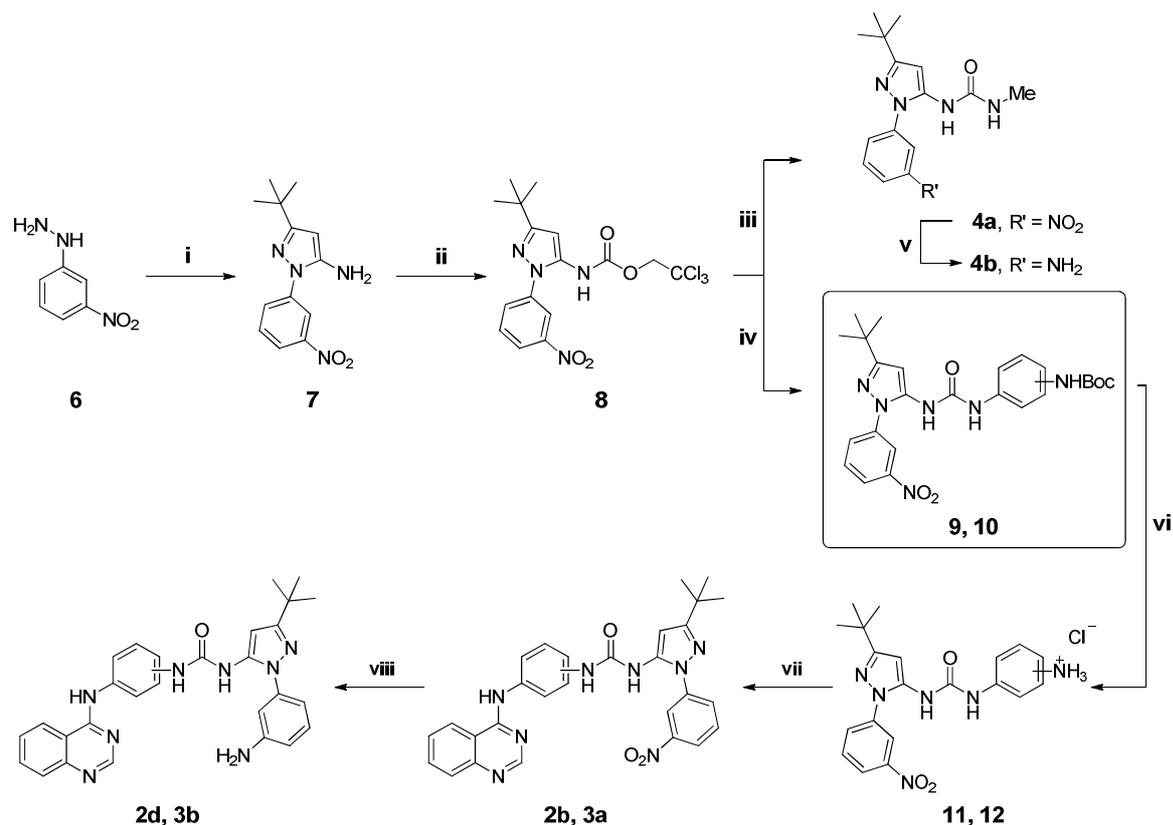
Für die Synthese der unterschiedlichen Moleküle wurden überwiegend literaturbekannte Verfahren²⁰ angewendet und die Hybridverbindungen über eine allgemeine, konvergente Syntheseroute (Schema 3.2.1) dargestellt. Ausgehend von den Reaktanten *m*-Nitrophenylhydrazin (**6**) und Pivaloylacetoneitril wurde zunächst in einer *Pinner*-artigen Kondensation mit anschließendem Ringschluss das entsprechende 5-Aminopyrazol (**7**) hergestellt. Im Folgenden wurde das verbleibende primäre Amin in einer S_N2 -Reaktion mit der Troc-Schutzgruppe dekoriert. Resultierendes Carbamat **8** konnte anschließend mit verschiedenen Aminen bzw. Phenylendiaminen substituiert werden, um das zentrale Harnstoffmotiv zu erzeugen.

Fragmente **4a** und **4b** wurden dabei zunächst durch die Behandlung von **8** mit Methylamin Hydrochlorid, zum Aufbau von **4a** und sukzessiver Reduktion der *m*-Nitrogruppe mit Pd/C zum korrespondierenden Amin **4b** in hinreichenden Ausbeuten (83% für **4a** und 70% für **4b**), generiert. Darüber hinaus konnten ausgehend von Verbindung **8** die Schlüsselintermediate **9** und **10** hergestellt werden. Dazu war eine nukleophile Substitution am Carbamat mit einfach *tert*-Butoxycarbonyl-dekoriertem 1,3- bzw. 1,4-Phenylendiamin erforderlich, welche in moderaten bis guten Ausbeuten (81% für **9**, 61% für **10**) verlief. Anschließend wurde die mit dem Fragmentbaustein eingeführte Boc-Schutzgruppe beider Intermediate durch Behandlung mit 4 M HCl unter quantitativem Umsatz entfernt, sodass die Zwischenstufen **11** und **12** erzeugt wurden, die als Vorläufersubstanzen für die finale Darstellung des Hybridgrundgerüsts dienten. Ausgehend von diesen Amino-substituierten Hydrochloriden erfolgte die nukleophile aromatische Substitution an frisch hergestelltem 4-Chlorchinazolin

ⁱⁱ Teile der Substanzbibliothek (**2a,c,e,f,g,h,i**) wurden bereits während der Masterarbeit „Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und biochemische Charakterisierung von Typ-II Kinaseinhibitoren“ am Chemical Genomics Centre Dortmund hergestellt.

zu den intermediären Verbindungen **2b** und **3a**, welche ebenfalls Bestandteil der Bibliothek waren, da diese für SAR-Studien zum Einfluss des *meta*-Substituenten (NO_2 vs. NH_2) auf die inhibitorische Aktivität der Moleküle essentiell waren. Abschließend wurden die Zwischenstufen durch Reduktion der Nitrogruppe mit SnCl_2 in die korrespondierenden Aminoderivate **2d** und **3b** überführt.

Schema 3.2.1: Synthese von Hybridinhibitoren der zweiten Generation.^a

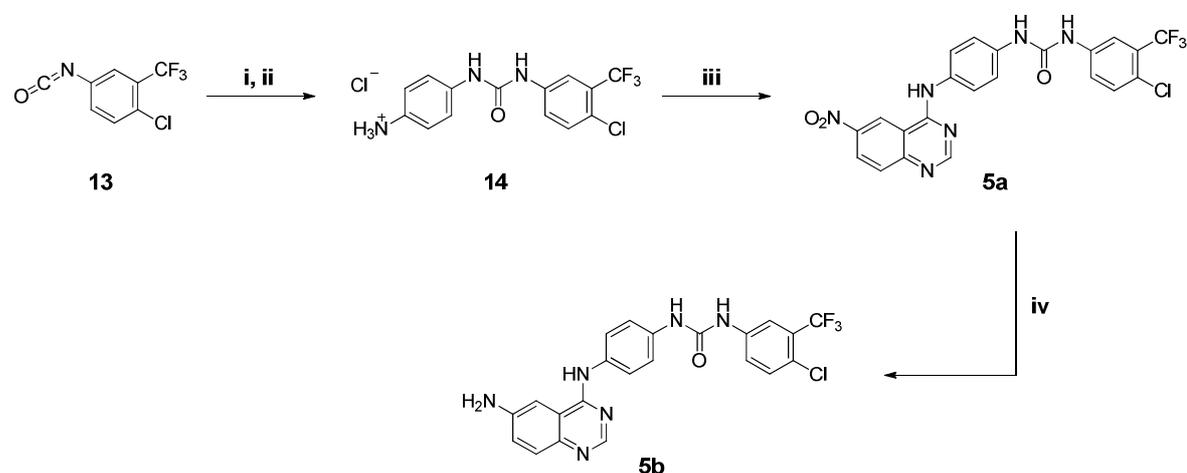


^aReagenzien und Konditionen: i) Pivaloylacetonitril, konz. HCl, EtOH, 90 °C, 12 h, 94%; ii) Troc-Cl, NaOH, EtOAc/H₂O, 0 °C – RT, 4 h, 97%; iii) Methylamin Hydrochlorid, DIPEA, DMSO, RT, 5 h, 83%; iv) *N*-Boc-Phenyldiamin, DIPEA, DMSO, RT, 24 h, 61-81%; v) Pd/C, NH₄HCOO, EtOH, 90 °C, 1 h, 70%; vi) 4 M HCl in Dioxan, RT, 45 min, quant.; vii) 4-Chlorchinazolin, ^tPrOH, 75 °C, 3 h, 47-65%; viii) SnCl₂, EtOH, 70 °C, 1.5-3 h, 61-63%.

Weitere Verbindungen (**5a,b**), welche die fokussierte Bibliothek ergänzten (Schema 3.2.2) wurden unter Verwendung einer alternativen Route synthetisch aufgebaut. Beginnend mit der Reaktion von 1-Chlor-4-isocyanato-2-trifluormethylbenzol **13** mit *tert*-Butyl-4-aminophenylcarbamate erfolgte die direkte, quantitative Entfernung der Boc-Schutzgruppe mit 4 M HCl zur Herstellung des Harnstoffs **14** (Ausbeute: 89%). Analog zur ersten Syntheseroute wurde darauf folgend eine S_NAr mit frisch hergestelltem 6-Nitro-4-chlorchinazolin durchgeführt und so das Hybridderivat **5a** in guter Ausbeute von 70% erzeugt. Eine

abschließende Reduktion der Nitrogruppe zum Amin mit SnCl_2 lieferte das entsprechende Amino-substituierte Molekül **5b** in mäßiger Ausbeute von 15%.

Schema 3.2.2: Synthese von Hybridinhibitoren mit substituiertem allosterischen Motiv.^a



^aReagenzien und Konditionen: i) *tert*-Butyl 4-Aminophenylcarbamate, DCM, RT, 30 min, 90%; ii) 4 M HCl in Dioxan, RT, 8 h, quant.; iii) 4-Chlor-6-nitrochinazolin, 2-Propanol, 75 °C, 3 h, 70%; iv) SnCl_2 , EtOH, 70 °C, 1 h, 15%.

Detaillierte synthetische Vorschriften und Analytikstudien aller finalen Produkte und Zwischenstufen sind im Experimentellen Teil (Kapitel 9.1.2) aufgeführt.

3.2.4 Biochemische Charakterisierung der Hybridinhibitorenⁱⁱⁱ

Mit Hilfe eines bereits etablierten Assaysystems (KinEASE™), welches die Aktivität einer Kinase durch relative Quantifizierung ihres Substratumsatzes in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Inhibitor determiniert, wurden IC_{50} -Werte aller hergestellten Moleküle gegenüber Wildtyp und Türsteher-mutierten Kinasen bestimmt (cSrc, Abl und KIT; Tabelle 3.2.2). Als Referenzverbindungen dienten dabei sowohl die kommerziell erhältlichen Kinaseinhibitoren Dovitinib, Imatinib, Sunitinib und Ponatinib als auch der Hybridinhibitor erster Generation (**1b**), welcher dem rationalen Design zugrunde lag.²⁰

ⁱⁱⁱ Die biochemische Charakterisierung ausgewählter Substanzen (**2a,c,e,f,g,h,i**) gegenüber cSrc (wt und T338M) sowie Abl (T315I) wurde bereits im Zuge der Masterarbeit „Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und biochemische Charakterisierung von Typ-II Kinaseinhibitoren“ am Chemical Genomics Centre Dortmund durchgeführt.

Bei der Untersuchung von Wildtyp und Türsteher-mutierten Kinasen unter Verwendung flexibler bzw. rigider Inhibitoren und auch Fragmente ließen sich distinkte Inhibitionsprofile eruieren. Dabei konnten sowohl die Modellkinase cSrc, als auch die klinisch relevanten Phosphotransferasen Abl und KIT und ihre Türsteher-mutierten Pendanten in signifikanter Art und Weise inhibitorisch adressiert werden.

Tabelle 3.2.2: IC₅₀-Bestimmung der Hybridinhibitoren und Fragmente gegenüber verschiedenen Zielenzymen.

Verbindung	IC ₅₀ (nM)					
	cSrc ^{WT}	cSrc ^{T338M}	Abl ^{WT}	Abl ^{T315I}	KIT ^{WT}	KIT ^{V559D/T670I}
2a	34 ± 23	126 ± 82	157 ± 76	561 ± 222	69 ± 19	637 ± 91
2b	20 ± 12	33 ± 5	42 ± 23	355 ± 116	7.3 ± 5.4	38 ± 16
2c	12 ± 1	5.9 ± 3.7	73 ± 36	81 ± 23	6.1 ± 1.9	7.6 ± 3.8
2d	38 ± 12	33 ± 10	40 ± 20	120 ± 43	3.3 ± 2.2	24 ± 4
2e	145 ± 47	211 ± 120	1273 ± 301	3620 ± 1180	21 ± 7	305 ± 69
2f	1.2 ± 0.5	1.7 ± 1.6	112 ± 45	441 ± 124	7.6 ± 1.6	22 ± 13
2g	1.1 ± 0.6	1.3 ± 0.2	124 ± 54	1170 ± 450	2.6 ± 0.5	2.7 ± 1.7
2h	1.1 ± 0.7	0.9 ± 0.4	61 ± 53	176 ± 47	3.5 ± 1.9	6.9 ± 2.7
2i	4.7 ± 2.1	3.5 ± 1.5	379 ± 70	820 ± 304	5.7 ± 3.4	9.2 ± 3.7
3a	39.3 ± 6.1	ni	9 ± 7	ni	29 ± 21	ni
3b	304 ± 94	ni	23 ± 4	ni	30 ± 22	ni
4a	ni	ni	ni	ni	ni	ni
4b	ni	ni	ni	ni	ni	ni
5a	ni	ni	ni	ni	4.5 ± 2.2	ni
5b	3037 ± 200	ni	ni	ni	1.0 ± 0.4	923 ± 305
1b	14 ± 1	23 ± 4	388 ± 88	141 ± 50	22 ± 6	155 ± 84
Imatinib	2784 ± 481	ni	20 ± 3	ni	22 ± 7	≥100000
Sunitinib	555 ± 48	134 ± 41	1613 ± 938	504 ± 102	0.7 ± 0.3	264 ± 92
Ponatinib	0.9 ± 0.3	156 ± 27	2.9 ± 1.2	1.0 ± 0.5	1.7 ± 0.2	4.9 ± 0.6
Dovitinib	81 ± 35	50.1 ± 15.4	450 ± 65	228 ± 67	1.1 ± 0.3	48 ± 5

ni = nicht inhibierend bei 100 µM Konzentration an zu evaluierender Substanz

3.2.4.1 cSrc – Biochemische Evaluierung

Die inhibitorische Aktivität der Vertreter der fokussierten Substanzbibliothek wurde zunächst gegenüber der Modellkinase cSrc im aktivitätsbasierten (vgl. Kapitel 9.2.2) Testsystem untersucht. Insbesondere die 1,4-verknüpften Hybridverbindungen **2f-h** wiesen eine signifikante Inhibition mit IC_{50} -Werten im Bereich von ≈ 1 nM auf, sowohl für cSrc wt als auch die T338M-Mutante. Im Vergleich zum potentesten Inhibitor der ersten Generation (**1b**) zur Umgehung von Wirkstoffresistenzen lag hier eine deutliche Steigerung der Wirksamkeit um das 14-fache gegenüber dem Wildtyp bzw. 23-fache bezüglich der Türstehermutierten Form von cSrc vor. Die erwartete Steigerung der Effektivität durch rationales Design konnte demnach bei der exklusiven Untersuchung isolierter katalytischer Domänen bestätigt werden. Eine Derivatisierung zu verschiedenen 6-Amidochinazolinen (**2f-i**, $IC_{50} \approx 1$ nM) resultierte dabei in gesteigerter inhibitorischer Aktivität im Vergleich zu nicht-substituierten 6-Amino- und 6-Nitrochinazolinen (**2a-e**, $IC_{50} \approx 6-200$ nM).

Eine Abänderung des ursprünglichen Grundgerüsts durch Ersatz des allosterischen Teils durch das 4-Chlor-3-trifluormethoxy-Motiv (**5a,b**) führte nicht zur erhofften Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften, sondern endete in beträchtlicher Herabsetzung der IC_{50} -Werte in den μ M-Bereich (≈ 3 μ M, **5b**, cSrc wt) bis hin zu vollständigen Aktivitätsverlust (**5a**). Dieses Ergebnis illustriert deutlich die strukturelle Relevanz des 1-Aryl-substituierten Pyrazols innerhalb der allosterischen Tasche obwohl dieses Element allein (**4a,b**) ebenfalls keinen Effekt auf die Transferaseaktivität zeigt. Es ist vielmehr das Zusammenspiel von allosterischem und ATP-kompetitiven Teil eines Inhibitors, welches die substantielle Effektivität gegenüber Kinasen hervorruft und die Art der Inhibition charakterisiert.

Eine klare, generelle SAR, die schon in früheren Studien²⁰ bestätigt wurde, konnte auch hier bei der Untersuchung unterschiedlich verknüpfter Derivate beobachtet werden: 1,4- und 1,3-fusionierte Inhibitoren (**2a-i** und **3a,b**) zeigten für den Wildtyp eine weitgehend vergleichbare Effektivität, doch lediglich die flexiblen 1,4-verbrückten Verbindungen konservierten diese gegenüber der T338M Mutante mit sterisch anspruchsvollem Türsteherrest. Dabei geht die Rigidisierung des Grundgerüsts mit einer sterischen Repulsion zwischen Türsteher und zentralem verbrückendem Phenylring einher und bedingt so die verminderte Affinität zum Zielprotein (vgl. Kapitel 3.2.5). Interessanterweise zeigen **2f** und **2h** die gleichen IC_{50} -Werte sowohl gegenüber dem wt als auch der T338M-Variante (jeweils ≈ 1 nM), obwohl **2f** keine Erweiterung aufweist, die zur Interaktion mit Asp348 geeignet ist. Dies lässt darauf rückschließen, dass nicht die neu ausgebildete Interaktion mit den 6-Position-Substituenten, sondern das in *meta*-Position eingeführte anilinische Amin am

Pyrazol-verknüpften Aromaten in Kombination mit einem obligatorischen Amid an der Chinazolin-6-Position essentiell für die Wirkungssteigerung ist.

3.2.4.2 Abl - Biochemische Evaluierung

Aufgrund der Modellierungsstudien wurde angenommen, dass die Hybridinhibitoren neben der Inhibition der Modellkinase konzeptionell ebenfalls in der Lage sind strukturell eng verwandte Proteinkinasen zu adressieren. Weiterhin waren diese niedermolekularen Verbindungen ideal für die Umgehung von Türstehermutationen verwendbar und daher auch zur Adressierung der in CML hervortretenden Abl T315I geeignet, einer Mutationsvariante, für die im klinischen Ansatz bis dato mit Ausnahme des kürzlich durch die FDA zugelassenen Inhibitors Ponatinib (Iclusig)⁶ kein passendes Therapeutikum zur Verfügung steht. Basierend auf der Kristallstruktur von cSrc T338M im Komplex mit **1a** (PDB-Eintrag: 3F3W) und der daraus generierten Überlagerung mit Abl T315I (Abbildung 3.5) konnte ein hochgradig konservierter Bindungsmodus im Vergleich zur Modellkinase observiert werden, was die These einer substanziellen Interaktion mit der Transferase unterstützte.

Die Resultate der aktivitätsbasierten Studien waren weitgehend vergleichbar mit denen, die zuvor für das Modellsystem erzielt wurden, denn obwohl die absoluten Werte Abweichungen unterlagen, folgten sie den gleichen Trends. Wie postuliert zeigten die 1,3-verknüpften Verbindungen (**3a,b**) signifikante Affinität gegenüber dem Wildtyp, resultierend in niedrigen IC₅₀-Werten von 9-23 nM, verlieren jedoch vollständig an Wirksamkeit im Falle der T315I Mutation (vgl. Tabelle 3.2.2). Anhand der analogen 1,4-substituierten Moleküle wird die Fähigkeit zur Umgehung der Türstehersubstitution durch das räumlich anspruchsvollere Isoleucin erneut deutlich. Diese beruht auf der freien Rotation des zentralen Phenylrings um 90°, um einer sterischen Hinderung mit Ile315 aus dem Weg zu gehen (vgl. Abbildung 3.5B). Sowohl **2a-d** als auch **2f-h** zeigen dabei Aktivität gegenüber Abl wt (IC₅₀ = 42-157 nM) und behalten diese in Teilen (**2c,d,h**) auch gegen die Mutationsvariante bei (IC₅₀ = 81-176 nM). Konsistent mit den Beobachtungen in cSrc wiesen weder die Fragmente **4a,b** noch die Grundgerüste mit 1-Chlor-4-isocyanato-2-trifluormethylbenzol-Part (**5a,b**) eine Wirkung in Bezug auf die untersuchten Abelson-Varianten auf.

3.2.4.3 KIT - Biochemische Evaluierung

Nicht nur aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu cSrc, sondern auch wegen des Hervortretens im Rahmen der Erstellung eines *in vitro* Selektivitätsprofils der Hybridinhibitoren erster Generation bei 5 μ M gegenüber 27 Kinasen (KINOMEScan, Ambit Biosciences),^{iv} wurde KIT als weitere Zielkinase evaluiert. Für die Wildtyp-Variante von KIT, als auch für die kombinierte Mutationsvariante bestehend aus V559D-Aktivierungs- und T670I-Türstehermutation wurden IC₅₀-Werte ermittelt. Wie bereits im Falle der Abelson Kinase handelt es sich auch hierbei um klinisch relevante Sonderformen des entsprechenden Wildtyp Proteins mit klinischer Indikation (hier: GIST).

Die biochemischen Charakterisierungen illustrierten eine durch die 1,4-Hybride hervorgerufene, potente Inhibition der konstitutiv aktiven Form, aber auch der Doppelmutante mit zusätzlich substituiertem Türsteher. Im Detail konnten für die flexiblen Derivate **2b-d** sowie **2f-i** IC₅₀-Werte im Bereich von \approx 3-8 nM in Bezug auf den Wildtyp ermittelt werden, wobei sich auch die rigiden Vertreter der Substanzbibliothek (**3a,b**) mit Werten um 30 nM als lediglich geringfügig schwächer in der Potenz erwiesen. Konsistent zu den Untersuchungen der vorhergehenden Kinasen zeigten letztere Derivate erneut einen völligen Verlust an Wirksamkeit bei der Adressierung der V559D/T760I KIT Variante, während viele flexible 1,4-verknüpfte Repräsentanten ohne signifikante Minderung der Effektivität auch diese Sonderform inhibierten (**2c** und **2g-i**, IC₅₀ = 3-9 nM). Auch den Sorafenib-verwandten Strukturen **5a** und **5b** konnte eine Effektivität von 1 nM bzw. 4.5 nM halbmaximaler Inhibitor-konzentration in Bezug auf Wildtyp-KIT bestätigt werden, wohingegen diese Verbindungen in korrelierenden cSrc und Abl-Untersuchungen keine inhibitorische Wirkung zeigten. Ungeachtet dessen wurde beim Vergleich zur Doppelmutante ein ca. 1000-facher Effektivitätsverlust für **5b** (923 nM) festgesellt, während **5a** nicht im Ansatz einen Effekt hervorrief (Tabelle 3.2.2).

Durch die aufgezeigten Studien zur Einführung flexibler Motive als auch die Ansätze zur Verbesserung von Vorgängersubstanzen konnte gezeigt werden, dass die Vorgehensweise des strukturbasierten, rationalen Designs erfolgreich zur Entwicklung bzw. weiteren Optimierung potenter Inhibitoren von cSrc, Abl, als auch KIT und ihrer diversen klinisch relevanten Mutationsformen eingesetzt wurde, wobei die observierten Effekte zunächst lediglich auf der *in vitro* Ebene Bestand haben.

^{iv} Dissertation Matthäus Getlik, 2011, TU Dortmund

3.2.5 Komplexkristallstrukturen in cSrc wt

Zwecks Bestätigung des vorausgesagten Bindungsmodus der Typ-II Hybridinhibitoren und um die Relevanz der neu eingeführten Motive zu studieren, wurde die Modellkinase cSrc wt mit **2g** sowie **2h** kokristallisiert und einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen.

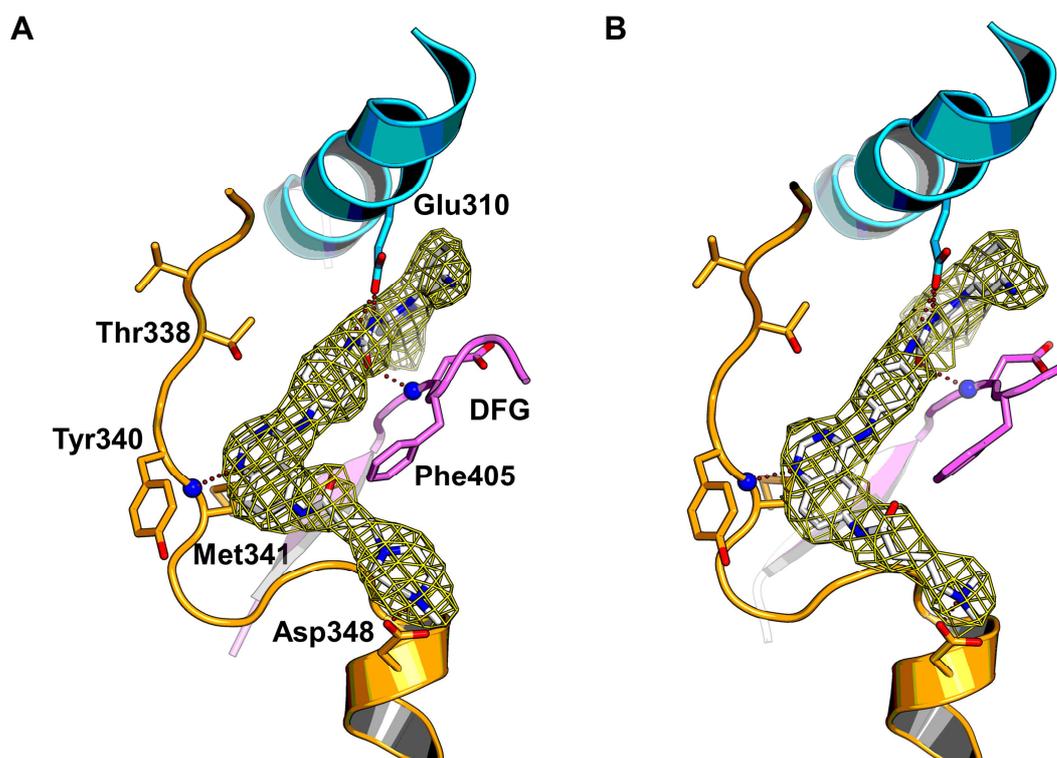


Abbildung 3.6: 1,4-substituierte Hybridinhibitoren (**2g,h**) im Komplex mit cSrc wt. **A/B**) Experimentell ermittelte Elektronendichtekarten der Liganden (gelb) von cSrc-**2h** (**A**) und cSrc-**2g** (**B**) bei einer Auflösung von 2.7 Å bzw. 3.3 Å sind dargestellt ($2Fo - Fc$ Karte konturiert bei 1σ , PDB-Einträge: 3TZ8 und 3TZ7). Interaktionen durch Wasserstoffbrücken der Inhibitoren mit Helix C (cyan), DFG-Motiv (pink) und Scharnierregion (orange) sind mit roten Punkten angedeutet. Die Kinasedomäne ist in der inaktiven Konformation fixiert und der Pyrazolharnstoff wird innerhalb der allosterischen Tasche von Helix C und DFG-Motiv flankiert. Das Chinazolin N1 bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zum Hauptkettenamid von Met341 aus, während der zentrale Chinazolin und Pyrazolharnstoff verbrückende Phenylring mit der Seitenkette von Phe405 unter der Ausbildung vorteilhafter *face-to-edge* Interaktionen wechselwirkt.

Wie bereits aus den Modellierungsstudien abgeleitet, adressieren die synthetisierten Hybridverbindungen in einer für Typ-II Inhibitoren typischen Art und Weise grundsätzlich sowohl die ATP-Bindetasche als auch die allosterische Subtasche (Abbildung 3.6). Dadurch wird die Kinase cSrc in der inaktiven DFG-out Konformation stabilisiert. Ähnlich der Vorgängermoleküle ist eine direkte Interaktion des Chinazolin N1 über eine H-Brücke zum Peptidrückgrat der Scharnierregion (Met341) zu beobachten. Weiterhin wird der flexible, verbrückende Phenylring zwischen Türsteherrest und Phe405 des DFG-Motivs unter Ausbildung vorteilhafter *face-to-edge*-Wechselwirkungen eingebettet. Die Harnstoffkomponente

wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Glu310 der Helix C und zum Peptidrückgrat des DFG-Motivs (Asp404) fixiert. Eine zusätzliche Wechselwirkung wird im Bereich des Pyrazols innerhalb der allosterischen Tasche durch eine Wasser-vermittelte, indirekte Protein-Ligand-Interaktion zu Asp404 hervorgerufen. Die eingebrachten 6-Chinazolin-Substituenten 4-Dimethylaminobutanamid sowie 3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propanamid tragen offensichtlich über zusätzliche polare Interaktionen bzw. H-Brücken zum Asp348 am Rande der aktiven Tasche zur Steigerung der Affinität bei. Im Vergleich zum potentesten Ursprungsmolekül **1b**, welches keine polaren Erweiterungen besitzt, schlägt sich diese Beobachtung ebenfalls in einem geringeren IC_{50} -Wert von **2g** und **2h** im Hinblick auf cSrc wt und T338M nieder (wt: 1.1 nM und 1.1 nM vs. 14 nM; T338M: 1.3 nM und 0.9 nM vs. 23 nM).

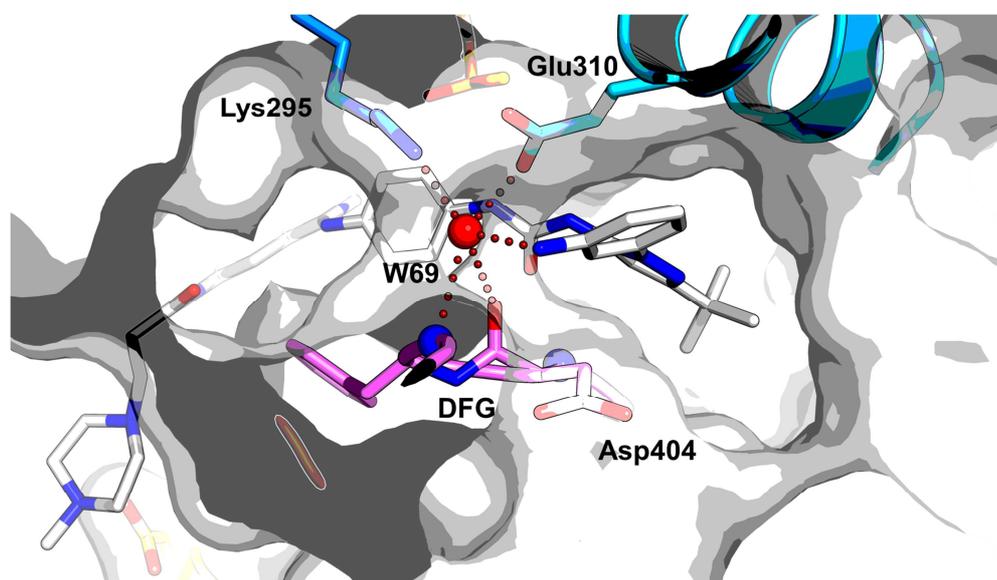


Abbildung 3.7: Das anilinische Amin in *meta*-Position von **2h** ist in Richtung einer polaren Furche oberhalb der allosterischen Tasche orientiert, die durch Formierung der Aminosäuren Lys295, Glu310 und Asp404 gebildet wird. Zusätzlich wird ein Wassermolekül (W69) koordiniert.

Weitere Verbesserungen der Protein-Ligand-Wechselbeziehung lassen sich durch eine neu generierte strukturelle Eigenschaft, die Substitution der *m*-Methyl- zur primären *m*-Aminogruppe, begründen. Durch die Veränderungen der Polarität am Aromaten sowie der damit einhergehenden Erhöhung der Elektronendichte im Ringsystem ist zu erklären, dass das polare Element in Richtung einer ebenfalls polaren Furche orientiert ist, welche durch die Zusammenlagerung dreier Aminosäuren (Lys295, Glu310 und Asp404, Abbildung 3.7) ausgebildet wird. Aufgrund dieser Wechselwirkungen werden die mit diesem charakteristischen Substitutionsmuster ausgestatteten Inhibitoren (**2c**, **2d**, **2f-i**, **3b**) „verankert“, was mit einer gesteigerten Affinität einhergeht (vgl. Tabelle 3.2.2).

Wie aus den strukturbioologischen Resultaten in Kombination mit den biochemischen Charakterisierungen hervorgeht, ist nicht die Substitution des Chinazolins mit polaren Funktionalitäten (Methylpiperazin, Morpholin) die treibende Kraft für die verbesserte Wirksamkeit der modifizierten Strukturen gegenüber cSrc. Grundlegend für den erzielten Effekt ist dagegen das Zusammenspiel des im allosterisch bindenden Teil der Grundstruktur an *meta*-Position eingeführte anilinische Amin in Koexistenz mit einem obligatorischen Amid an 6-Position des Chinazolinkerns (vgl. **2f** vs. **2h**). Dieses Resultat kann zweifelsfrei mit der Theorie der Enthalpie-Entropie-Kompensation für eine Protein-Ligand-Wechselwirkung korreliert werden, bei welcher der enthalpisch vorteilhafte Effekt durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu Asp348 aufgrund damit einhergehender entropisch ungünstiger Fixierung des Liganden aufgehoben wird. Unter der Annahme, dass die Kombination dieser Effekte das System energetisch weder auf- noch abwertet, kann nicht beurteilt werden, inwiefern die Einführung polarer Substituenten am Chinazolinkern einen negativen Einfluss auf die IC₅₀-Werte besitzt. Da aber durch Einführung eines sterisch anspruchsvolleren und zudem polaren Elements auch eine größere Hydrathülle vom Liganden entfernt werden muss, bevor eine Bindung innerhalb des katalytischen Zentrums der Transferase möglich ist, stellt der Beitrag dieser Gruppen in **2g-i** zur Erhöhung der Desolvatationsenergie eine energetische Barriere dar, die zunächst überwunden werden muss. Möglicherweise relativiert dies den Beitrag zur Affinitätssteigerung durch Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke.⁵⁶

3.2.6 Zelluläre Charakterisierung in humanen Krebszelllinien

3.2.6.1 Humane CML-Zelllinie K562^v

Aufgrund der Tatsache, dass die Mehrheit der 1,4-fusionierten Inhibitoren eine solide *in vitro* Potenz gegenüber Abl (wt und T315I) hervorbrachte, wurden **2a**, **2b**, und **2d** zur Durchführung von Studien an der humanen, Bcr-Abl positiven Krebszelllinie K562⁸² verwendet. Diese ausgewählten Verbindungen repräsentierten vielversprechende Kandidaten zur Inhibierung des konstitutiv aktiven Genprodukts von Bcr-Abl, der treibenden Kraft bei der Entstehung von CML, auf zellulärer Basis. Dazu wurden die Zellen in Charakterisierungsexperimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren (10 µM und 30 µM) für 96 h behandelt und im Anschluss die Überlebensrate in Relation zu

^v In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Roman Thomas am Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln.

unbehandelten Zellen (DMSO-Kontrolle) durch Trypanblau Vitalitätsfärbung und manueller Zellzahlbestimmung determiniert (Abbildung 3.8).

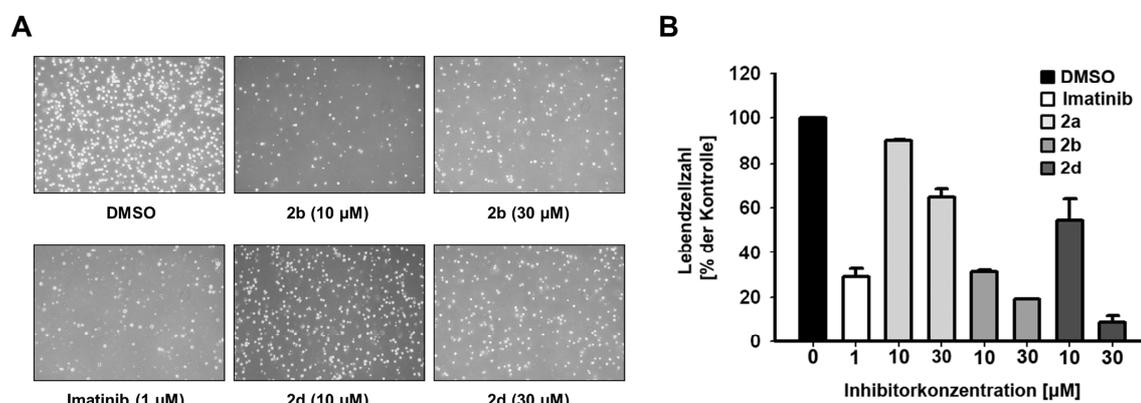


Abbildung 3.8: Viabilitätstests an Bcr-Abl positiven K562 CML-Zelllinien nach 96 h Behandlung mit **2a**, **2b** oder **2d**. **A)** Vitale Zellen wurden per Transmissionsmikroskopie nach Behandlung mit DMSO (Negativkontrolle), Imatinib (1 µM, Positivkontrolle) sowie **2b** und **2d** (10 µM, 30 µM) visualisiert. **B)** Lebendzellzahlen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau Vitalitätsfärbung ermittelt.

Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle resultierte die Behandlung mit 10 µM **2b** in einer erheblichen Reduktion an vitalen Zellen von 69%. Auf der anderen Seite führte eine Zugabe des korrespondierenden Amino-Moleküls **2d** zu einer geringeren Verminderung von 45%, während **2a** mit 10%igem Rückgang der Lebendzellzahl praktisch keinen Effekt hervorrief. In höheren Dosen von 30 µM zeigte sich der konzentrationsabhängige inhibitorische Einfluss auf die Viabilität der K562 Zellen, sodass hier 81% (**2b**) bzw. 91% (**2d**) der Zellen in Apoptose traten. Lediglich Verbindung **2a** führte auch bei dieser applizierten Menge keine signifikante Wirkung herbei, denn lediglich eine Reduktion der Gesamtzellzahl um 35% war zu beobachten.

Diese Resultate belegen, dass eine Teilmenge der synthetisierten 1,4-Hybride durchaus einen Effekt auf die konstitutiv aktive Form Bcr-Abl im Zellsystem aufweist und unterstützen die initiale Hypothese, dass diese Verbindungsklasse klinisch relevante Kinasen auf zellulärem Level adressieren kann.

3.2.6.2 Humane GIST-Zelllinien (GIST-T1, GIST-T1 T670I und GIST-48B)^{vi}

Unter Verwendung selektierter Derivate (**2b,c,d,f,h** und **5b**) wurden weiterhin Studien an der humanen, unbehandelten und metastasierenden GIST-Zelllinie GIST-T1 mit 50 bp Deletion in *KIT* Exon 11, die zur Expression von konstitutiv aktivem KIT führt, durchgeführt. Darüber hinaus wurde die korrespondierende Türsteher-mutierte (T670I) und dadurch Imatinib-resistente Linie GIST-T1 T670I zur tiefergehenden Evaluierung der inhibitorischen Potenz der ausgewählten Verbindungen im Hinblick auf Zielkinase und nachgeschalteter Signalkaskade herangezogen (Abbildung 3.9). Zunächst wurden die entsprechenden Zellen für 72 h mit einer Verdünnungsreihe (0-30 μ M) der jeweiligen Testsubstanz behandelt und im Anschluss daran die relative Menge an vitalen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (100%) ermittelt. Imatinib und Ponatinib dienten dabei als Referenzmoleküle. Ausführliche Informationen zum Verfahren und der genetischen Annotation der Zelllinien finden sich in Kapitel 4.4.6.

Die Gesamtheit der untersuchten Verbindungen führte eine signifikante Reduktion der GIST-T1 Lebendzellzahl herbei. Im Detail konnten durch **2b,d** und **5b**, die keine Substitution an der 6-Position des Chinazolinkerns tragen, GI_{50} -Werte von 11-17 nM eruiert werden und diese zeigten damit unter den getesteten Molekülen den stärksten antiproliferativen Effekt. Im Gegensatz dazu zeigten die substituierten Derivate **2f,h** sowie **2c** eine deutlich geringere Potenz (GI_{50} = 105-402 nM). In ähnlicher Weise wurde auch die Wirkstoffresistente Linie GIST-T1 T670I adressiert, gegenüber der die inhibitorische Wirkung der 1,4-verknüpften Chinazolin-Pyrazolharnstoffe konserviert blieb. Dabei waren die beobachteten Effekte im Allgemeinen vergleichbar zu denen, die für GIST-T1 ermittelt wurden. Die potentesten Derivate zeigten sich dabei in **2b** und **2d** (GI_{50} = 24-28 nM) gefolgt von **2c** mit einem GI_{50} -Wert von 110 nM.

^{vi} In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. Sebastian Bauer am Universitätsklinikum in Essen.

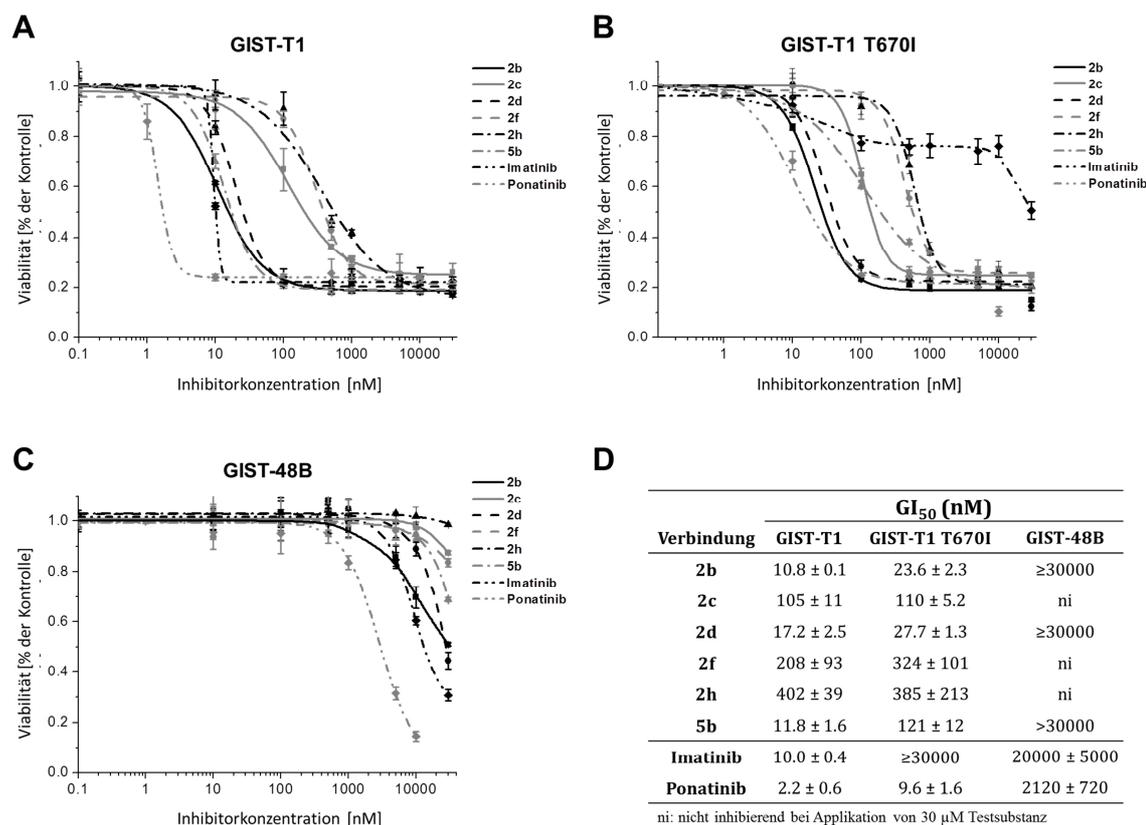


Abbildung 3.9: Dosis-Wirkungs-Kurven der Hybridinhibitoren nach 72 h Inkubation mit den entsprechenden Verbindungen gegenüber GIST-Zellen, die **A**) eine konstitutiv aktive KIT-Variante (GIST-T1) sowie **B**) die Türsteher mutierte Resistenzvariante KIT T670I (GIST-T1 T670I) exprimieren und **C**) keine Expression von KIT zeigen (GIST-48B). **D**) Zusammenstellung der GI₅₀-Werte aller zellulären Untersuchungen in Bezug auf GIST.

Beachtenswert war ebenfalls der starke inhibitorische Effekt, welcher von **5b** im Hinblick auf GIST-T1 T670I hervorgerufen wurde (GI₅₀ = 121 nM). Hier konnte eine ca. 8-Fache Diskrepanz zwischen dem unter Verwendung von isoliertem KIT V559D/T670I biochemisch evaluierten IC₅₀-Wert (923 nM) und dem korrespondierenden zellulären System beobachtet werden. Dieser Sachverhalt impliziert, dass es sich im Falle von **5b** um einen sogenannten langsamen Binder handelt, welcher eine große Assoziations- sowie Dissoziationskonstante bei der Bildung des entsprechenden Protein-Ligand-Komplexes mit KIT aufweist und daher die Aktivität im biochemischen System nicht vollständig evident erscheint. Der Unterschied in der Wirksamkeit kann in Anlehnung an die marginalen Präinkubationszeiten bei der Untersuchung isolierter Kinasedomänen (hier: 30 min) im Gegensatz zu zellulären Systemen (hier: 72 h) erklärt werden.⁸³

Um eine unspezifische Wirkung der Substanzen auszuschließen, wurde die KIT-negative Zelllinie GIST-48B herangezogen (Abbildung 3.9C). Eine Behandlung mit den zu untersuchenden Verbindungen resultierte nicht in einer verminderten Proliferation dieser Zelllinie, sodass keine toxischen Nebeneffekte für die Gesamtheit der untersuchten Verbindungen beobachtet wurden. Dabei zeigten **2b,d** und **5b** GI_{50} -Werte von $\geq 30 \mu\text{M}$ und im Falle von **2c,f,h** konnte kein antiproliferativer Effekt bei der maximal eingesetzten Testsubstanzkonzentration von $30 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Im Vergleich zu den ebenfalls evaluierten Referenzinhibitoren Imatinib ($GI_{50} = 20 \mu\text{M}$) sowie Ponatinib ($2.1 \mu\text{M}$), einen klinischen Phase III Kandidaten zur Behandlung von CML nach erfolgloser Imatinib-Ersttherapie,⁵⁹ offenbarten die Hybridinhibitoren ohne Ausnahme ein verbessertes *off-target* Profil.

Zur Untersuchung des direkten Einflusses auf die zelluläre KIT-Autophosphorylierung und der Unterbrechung der nachgeschalteten Signaltransduktion, wurden die Phosphorylierungszustände von KIT Tyr703 (Autophosphorylierungsposition) und der korrespondierenden untergeordneten Zielproteine Akt (Ser473) und MAPK (Thr202/Tyr204) durch Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 3.10). Die Behandlung der Zelllinie GIST-T1 mit **2d** und **2h** (0-30 μM) führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der zellulären Level an pKIT und gleichzeitig pAkt sowie pMAPK in GIST-T1 Zellen. Dabei wurde bei einem Einsatz von ca. 70 nM **2d** bzw. 2000 nM **2h** eine Verringerung der Gesamtproteinmenge an pKIT von 50% erreicht, während die Menge an KIT konstant blieb, was einen direkten Einfluss der Inhibitoren auf die Aktivität von KIT bestätigte. Ebenso konnte eine Verminderung der Menge an pAkt bzw. pMAPK um 50% durch **2d** ($\approx 70 \text{ nM}$) und **2h** ($\approx 2000 \text{ nM}$) und konstanter Menge an Akt bzw. MAPK nachgewiesen werden. Aufgrund des differierenden Substitutionsmusters von **2d** und **2h** konnte schon in den zellulären Studien eine unterschiedliche Effektivität auf die Proliferationsrate gegenüber der Zelllinien GIST-T1 und GIST-T1 T670I herausgestellt werden (Abbildung 3.9A,B), die durch die Analyse der Proteinlevel durch Western-Blotting bestätigt wurde. Während **2b** keine Substitution an der 6-Position des Chinazolins besitzt, trägt **2h** ein Ethylamid-verknüpftes Methylpiperazin, welches sowohl die Polarität als auch das Molekulargewicht des Inhibitors erhöht und so zu reduzierter Inhibitionsstärke führt.

Basierend auf der Untersuchung der korrespondierenden GIST-T1 T670I Zelllinie konnten diese Unterschiede erneut durch eine konzentrationsabhängige Reduktion der pKIT- sowie pAkt- und pMAPK-Level verdeutlicht werden. Die Wirksamkeit der Verbindungen im Vergleich zur nicht mutierten GIST-T1 Zelllinie war mit einer 50%igen Reduktion an pKIT bei einer Konzentration von 35 nM bzw. 400 nM für **2d** und **2h** sogar geringfügig erhöht. Diese Resultate zeigten deutlich, dass der inhibitorische Effekt gegenüber der Türsteher mutierten

Variante konserviert werden konnte und die 1,4-verknüpften Hybridinhibitoren somit durch ihr flexible zentrales Element in der Lage sind Türstehermutationen auch im zellulären Kontext klinisch relevanter Krebszelllinien zu umgehen.

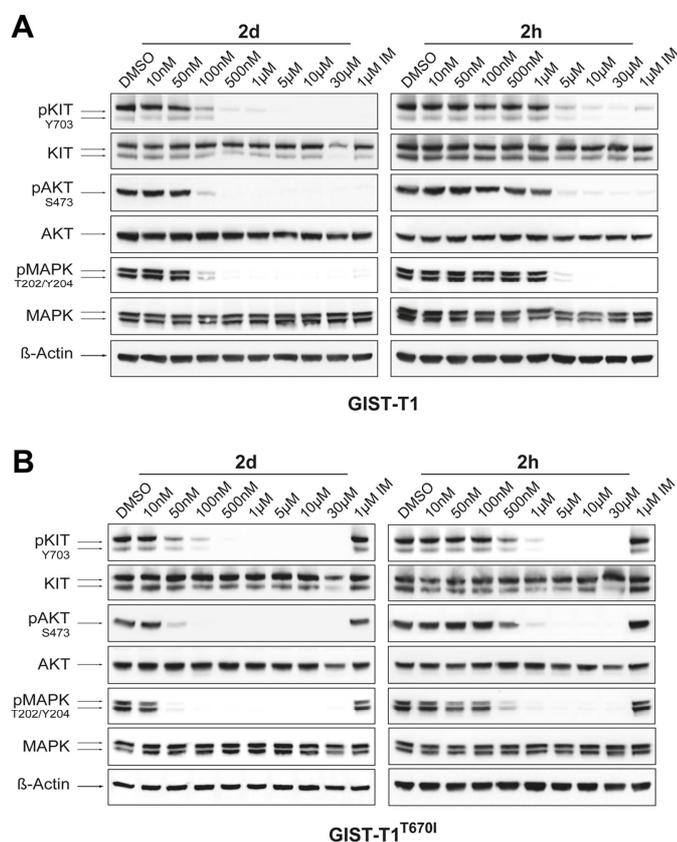


Abbildung 3.10: Immunoblot des pKIT-Rückgangs und Einfluss auf die Aktivierung/Phosphorylierung der nachgeschalteten Zielenzyme Akt und MAPK der KIT-Signaltransduktionskaskade in **A)** GIST-T1 und **B)** GIST-T1 T670I bei Verwendung einer Verdünnungsreihe von **2d** und **2h**.

Außerdem untermauern auch diese Resultate, dass die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke (hier: zu Asn680) zur Fixierung des Liganden und damit der in der Theorie potentiellen Verbesserung der inhibitorischen Wirkung nicht notwendigerweise vorteilhaft ist, da dieser positive Einfluss auf die Protein-Ligand-Wechselwirkung im Umkehrschluss durch Kompensationseffekte (Enthalpie, Entropie) aufgehoben wird. Die Einführung polarer Motive beeinflusst möglicherweise außerdem die Fähigkeit der Verbindungen die Membranbarriere zu passieren und führt so zur signifikanten Reduktion der zellulären Konzentration, einhergehend mit reduzierter Potenz im Falle der an 6-Position substituierten Verbindungen.

3.3 Selektivität von Hybridinhibitoren

Inhibitor-Selektivitätsprofile liefern grundlegende Informationen, die für das Verständnis der Effektivität einer spezifischen Wirkstoffklasse hinsichtlich ihrer zellulären Ziel- und noch bedeutsamer der Nicht-Zielproteine entscheidend sind und so z.B. Hinweise auf potentielle Toxizität liefern. Weiterhin stimulieren diese Studien durch vergleichende Betrachtung von Profilen die Entwicklung (a) selektiver oder (b) promiskuitiver, jedoch gleichzeitig nicht toxischer, Inhibitoren. Basierend auf diesen Analysen und durch das gezielte Design von Wirkstoffen ist die Möglichkeit gegeben, schon in der frühen Phase des Entwicklungsprozesses neuartiger Inhibitoren die Selektivität zu steuern und die Verwendung von Strukturelementen, die erwiesenermaßen nachteilige Effekte (Adressierung von Nicht-Zielproteinen, Toxizität etc.) mit sich ziehen, zu reduzieren.^{84,85}

In der Literatur ist eine große Bandbreite an Methoden zur Bestimmung von Selektivitätsprofilen beschrieben. Diese reichen von *in vitro* Competitionssystemen bzw. aktivitätsbasierten Systemen zur Durchmusterung von Molekülbibliotheken gegen Kollektionen an einzeln exprimierten und isolierten Kinasen^{53-55, 86, 87} über exklusive Zielproteinidentifizierung aus Zelllysaten per Immobilisation der zu untersuchenden Verbindung, Separation der Zielproteine und Massenspektrometrie^{88, 89} bis hin zu gekoppelten Verfahren zur Zielprotein-Identifizierung mit simultaner Affinitätsbestimmung.⁹⁰ Weiterhin sind Verfahren bekannt, in denen die zu profilierende Substanz mit einem sogenannten photolabilen *Crosslinker* sowie einer Alkin-Funktionalität ausgestattet und direkt im zellulären System profiliert wird. So kann der Inhibitor im ersten Schritt eine Zelle penetrieren, die jeweiligen Zielproteine adressieren und durch UV-Bestrahlung kovalent an diese geknüpft werden. Im zweiten Schritt erfolgt die Verknüpfung über Klick-Reaktionen⁹¹ an einen geeigneten Affinitätsmarker, der die bequeme Isolierung der Zielproteine sicherstellt. Die Identifikation der gebundenen Enzyme erfolgt erneut über die MS-Analyse.⁹²

Bedingt aussagekräftig unter diesen Verfahren sind die biochemischen Charakterisierungen unter Verwendung isolierter Kinasedomänen, da die Betrachtung dieser als einzelne Komponenten unter definierter ATP-Konzentration, die üblicherweise im Bereich des ATP- K_M liegt, nicht die vorherrschende Situation in der lebenden Zelle darstellt. In diesem artifiziellem System wird eine Inhibition unter Idealbedingungen bzw. laborüblichen Standardbedingungen untersucht, auf zellulärer Ebene jedoch herrschen beispielsweise ATP-Konzentrationen im mM-Bereich vor,⁹³ was die Competition mit Inhibitoren um ihre Proteinbindungsstelle erhöht und eine Ligandenbindung in der Regel erschwert. Bei der gekoppelten Vorgehensweise werden durch gezielte kovalente Knüpfung der zu profilierenden Moleküle an eine feste Phase, wie z.B. Sepharosepartikel, Sonden generiert, die es ermöglichen

spezifische Zielproteine aus einem Zelllysate über das funktionalisierte Molekül zu binden und im Falle affiner Interaktion eine bequeme Isolierung der Protein-Ligand-Komplexe über den verknüpften Marker gewährleisten (Abbildung 3.11).

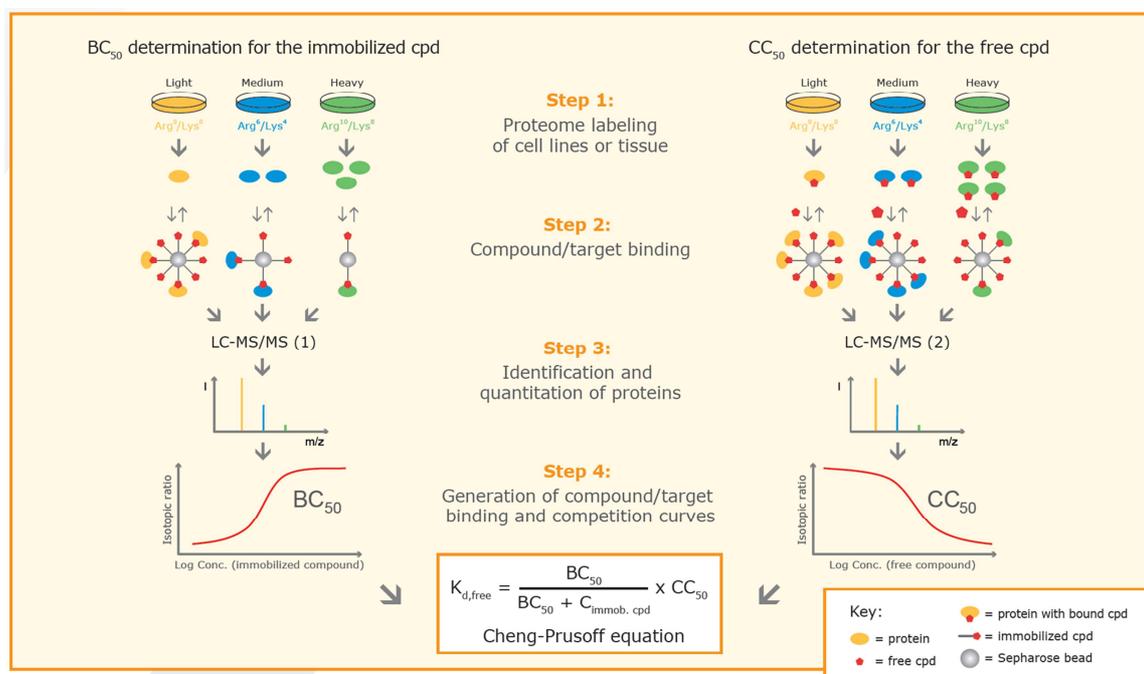


Abbildung 3.11: Methode zur Erstellung von Selektivitätsprofilen mit SILAC: Zellen werden in Medium mit gewöhnlichen und zwei verschiedenen Arten Isotopen-markierter Aminosäuren kultiviert, so dass die Proteine des Proteoms anschließend massenspektrometrisch über ihre Massendifferenz unterschieden werden können. Unterschiedlich markierte Zellsätze werden mit der in unterschiedlichen Dichten an Sepharosepartikel immobilisierten Testsubstanz inkubiert (links, BC₅₀). In einem parallelen Experiment werden die entsprechenden Zellsätze mit steigenden Konzentrationen der freien Testsubstanz in Anwesenheit der immobilisierten Verbindung inkubiert (rechts, CC₅₀). Die Proteine, welche an das immobilisierte Molekül gebunden sind, werden eluiert und vereint. Nach SDS-PAGE Analyse und proteolytischem Verdau werden die verbleibenden Peptide per LC-MS/MS identifiziert. Die Isotopen-markierten Peptide erlauben eine Berechnung der relativen Verhältnisse der angereicherten Proteine in beiden Ansätzen. Mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung können aus den ermittelten BC₅₀ und CC₅₀-Werten die korrelierenden Dissoziationskonstanten (K_D) der untersuchten Verbindungen berechnet werden; (Adaptiert von Kinaxo Biotechnologies GmbH).

Durch kompetitive Elution der Zielproteine und massenspektrometrische Untersuchungen können im Anschluss sowohl Rückschlüsse auf die Identität der isolierten Binder als auch auf ihre Bindungsaffinität zum entsprechenden Zielprotein gezogen werden (vgl. Abbildung 3.11). Diese Herangehensweise ermöglicht es nun, einem Molekül unter Berücksichtigung der definierten zellulären Umgebung (Zelllysate), ein Selektivitätsprofil zuzuordnen. Dabei können unter anderem die zelluläre bzw. physiologische Konzentration an ATP sowie die Gegenwart von Vollängen- als auch Nicht-Zielproteinen dem entsprechenden *in vivo* System exakt nachgestellt werden, was gegenüber dem *in vitro* System zur Untersuchung isolierter,

funktionaler Kinasedomänen einen wesentlichen Vorteil in Bezug auf die Aussagekraft der eruierten Daten darstellt.

Die grundlegende Vorgehensweise für die simultane Identifikation von Zielproteinen und deren Affinität beinhaltet die Nutzung der von Ong *et al.* entwickelten SILAC-Methode (Abbildung 3.11).⁹⁴ Ursprünglich diente diese der Quantifizierung von Proteinleveln, doch durch Abwandlung des Versuchsaufbaus kann diese auch zur Identifizierung von Zielproteinen sowie Determinierung der Dissoziationskonstante (K_D) herangezogen werden. Dieses Verfahren gehört heutzutage zu den Standardmethoden der Molekularbiologie in der Identifizierung biologischer Zielproteine unter Nachstellung physiologischer Rahmenbedingungen. Im Detail werden dabei im ersten Schritt BC_{50} -Werte (halbmaximale Bindungskonzentration) bestimmt, indem zunächst jeweils verschiedene Mengen eines Moleküls an einer Trägermatrix immobilisiert werden. Anschließend erfolgt die Inkubation der unterschiedlich beladenen Partikel mit Zelllysaten, die jeweils unterschiedlich Isotopenmarkierte Proteine enthalten, gefolgt von der kompetitiven Elution der Interaktionspartner und ihrer Identifikation sowie Quantifikation per LC-MS/MS. In einem weiteren Ansatz ist die Beladung der Partikel bei der Inkubation mit unterschiedlich Isotopen-markiertem Zelllysate gleich. Zusätzlich werden jedoch unterschiedliche Konzentrationen an freiem Wirkstoff zugegeben, so dass freie und gebundene Inhibitoren um die Zielproteine konkurrieren, was schließlich zur Generierung von CC_{50} -Werten (halbmaximale Kompetitionskonzentration) führt. Die Kombination beider Parameter kann im Anschluss dazu herangezogen werden, mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung,⁹⁵ die korrespondierenden K_D -Werte der freien Liganden zu ermitteln. Aufgrund der Sensitivität des Systems können bei der Anwendung dieser Methode Zielproteine bis zu einem K_D -Wert von ca. 20 μ M identifiziert werden.

Die zuvor in Bezug auf die Hybridinhibitoren eruierten Ergebnisse (vgl. Kapitel 3.2) sowie die biochemische Profilierung gegenüber 27 Kinasen (Ambit)²⁰ verdeutlichen bereits, dass die rational kreierte Hybridinhibitoren aufgrund der inhibitorischen Aktivität gegenüber mehreren Tyrosinkinasen (cSrc, Abl, KIT) möglicherweise ein breit gefächertes Spektrum an Zielproteinen adressieren. Basierend auf diesen Beobachtungen stellt die Erstellung des vollständigen Selektivitätsprofils durch zelluläre Profilierung die logische Konsequenz zur umfassenden Charakterisierung dieser Inhibitoriklasse dar. Basierend auf den zuvor generierten Hybridinhibitoren sowie einer Auswahl an Fragmenten und Referenzmolekülen wurden Selektivitätsprofile durch eine zelluläre Profilierungsstudie in K562-Zelllysaten erstellt.⁸² Die Methode der Wahl war die Profilierung mit Hilfe des „Cellular Target Profiling“ der Firma Kinaxo, welche voraussetzt, dass die zu testenden Verbindungen eine derivatisierbare Funktionalität tragen (hier: Aminogruppe).

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Synthese von Profilierungs sonden

Basierend auf diversen cSrc-Kristallstrukturen im Komplex mit Hybridinhibitoren bzw. verkürzten Fragmenten ohne Substitution an der Chinazolin 6-Position wurde eine Stelle in den strukturell verwandten Molekülen identifiziert, die für eine Linker-Funktionalisierung prädestiniert erschien, da es sich um eine Lösungsmittel-exponierte Position handelt (vgl. Abbildung 3.12).

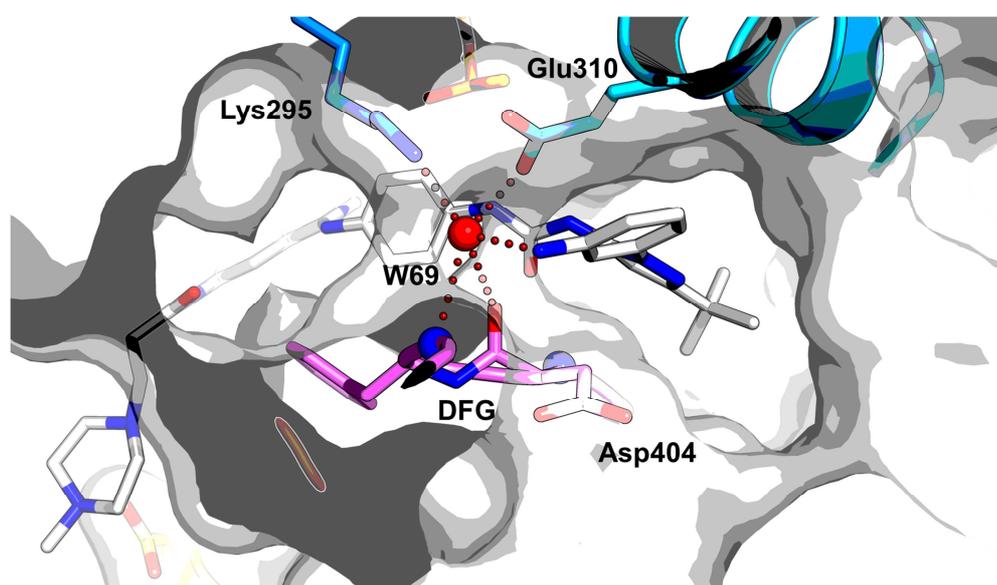


Abbildung 3.12: Identifizierung einer geeigneten Position als Knüpfungspunkt für die Einführung eines Linkers anhand der Komplexkristallstruktur von **2h** in cSrc wt. Das *meta*-positionierte aromatische Amin, welches in Richtung einer polaren Subtasche orientiert ist, stellt einen geeigneten Punkt zur Funktionalisierung dar.

Die Einführung eines primären, aromatischenamins in *meta*-Position des Pyrazol-verknüpften Aromaten erwies sich schon im rationalen Design als vorteilhaft für den inhibitorischen Effekt (Kapitel 3.2.4) und konnte nun als Knüpfungspunkt für die Immobilisation der Verbindungen herangezogen werden. In die Auswahl der zu untersuchenden Verbindungen wurden Teile der bestehenden, fokussierten Bibliothek (**2d**, **3b**, **4b**) aus repräsentativen, Amino-funktionalisierten Vertretern durch bereits in Bibliotheken der AG Rauh vorhandene Fragmente (**15**, **16**, **17**, **18**) und zudem ein BIRB-796 analoges Referenzmolekül (**19**) erweitert (Abbildung 3.13).

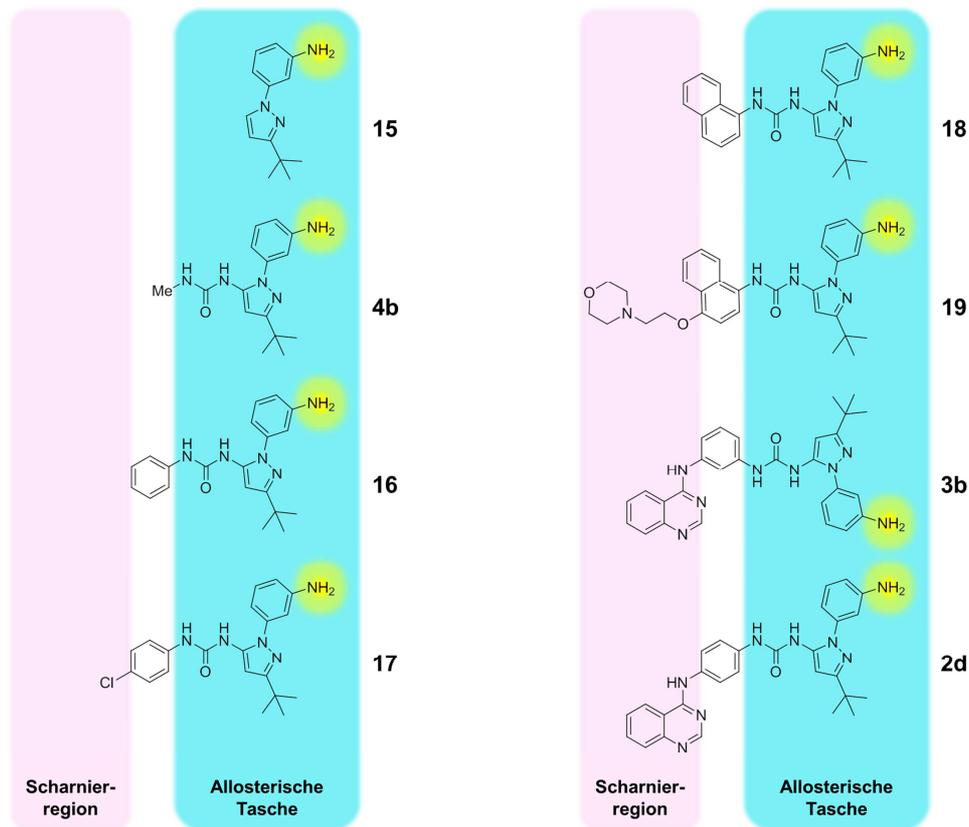
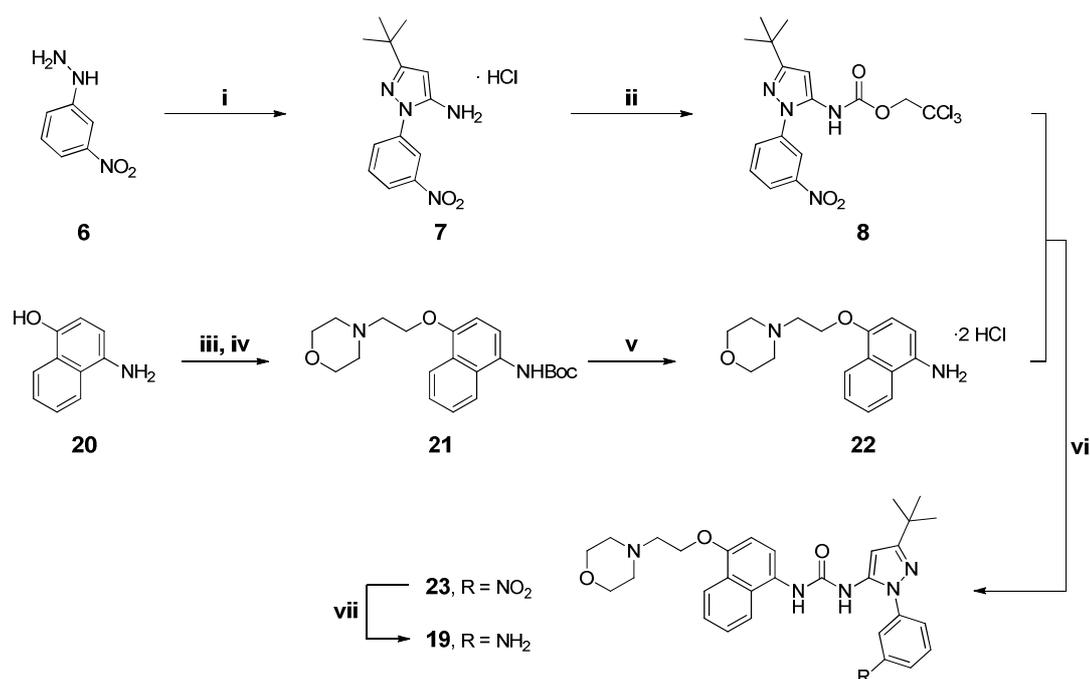


Abbildung 3.13: Schematische Übersicht der Zielverbindungen unter Berücksichtigung der relativen Belegung spezifischer Areale in Kinasen. Die funktionelle Aminogruppe, welche zur Derivatisierung bzw. Knüpfung an die feste Phase dient, ist mit gelben Kreisen markiert.^{vii}

Die eingeführte Amino-Funktionalität ist prinzipiell dazu geeignet, um eine ausreichend aktivierbare und weiter funktionalisierbare Position zu schaffen, die für die Immobilisierung der Moleküle an die feste Phase unumgänglich ist. Ein Großteil der benötigten Strukturen war durch die vorhergehende Erstellung der fokussierten Substanzbibliothek an Hybridinhibitoren und Fragmenten sowie Vorarbeiten (vgl. Kapitel 3.2.3) bereits verfügbar. Zur Vervollständigung der Serie zur zellulären Profilierung konnte die zu BIRB-796 korrelierende Verbindung **19** erfolgreich synthetisch dargestellt werden. Hierzu wurde erneut eine konvergente Syntheseroute (Schema 3.4.1) gewählt.

^{vii} Moleküle **15-18** stammen aus Vorarbeiten, die von Dr. Matthäus Getlik in der AG Rauh durchgeführt wurden.

Schema 3.4.1: Synthese von BIRB-796-Analoga.

^aReagenzien und Reaktionsbedingungen: i) Pivaloylacetone nitril, HCl (konz.), EtOH, 90 °C, 12 h, 94%; ii) 2,2,2-Trichloroethylchloroformiat, EtOAc/H₂O (3:1), 0 °C-RT, 4 h, 97%; iii) Boc₂O, TEA, MeOH, RT, 16 h, 46%; iv) 4-(2-Chlorethyl)morpholin Hydrochlorid, K₂CO₃, MeCN, 80 °C, 3 h, 66%; v) 4 M HCl in Dioxan, RT, 1 h, quant.; vi) DIPEA, DMSO, 60 °C, 9 h, 91%; vii) NH₄HCOO, Pd/C, EtOH, 90 °C, 90 min, 66%.

Ausgehend von *meta*-Nitrophenylhydrazin (**6**) wurde Carbamat **8** wie bereits beschrieben (Kapitel 3.2.3) in zwei Schritten als erster Baustein einer konvergenten Syntheseroute dargestellt. Parallel konnte 4-Aminonaphthalen-1-ol (**20**) zunächst durch Dekoration mit der Boc-Schutzgruppe in ein intermediäres Hydroxy-Carbamat umgesetzt werden, welches anschließend durch S_N2-Reaktion mit 4-(2-Chlor)-ethylmorpholin in einer Ausbeute von 30% (zwei Stufen) zu Verbindung **21** umgesetzt wurde. Die sukzessive quantitative Entfernung der Schutzgruppe mit 4 M HCl lieferte das korrespondierende Amin **22** als Dihydrochlorid. Aus der Zusammenführung der Bausteine **8** und **22** unter basischen Bedingungen ging das BIRB-796 Analogon **23** mit *m*-Nitro-Substitution hervor (Ausbeute: 91%), welches unter Verwendung von Pd/C katalytisch zur gewünschten Aminoverbindung **19** reduziert wurde (Ausbeute: 66%).

Zur vollständigen Kollektion an Inhibitoren gehörten neben den 1,4- und 1,3-verknüpften Hybridinhibitoren sowie des BIRB-796 Analogons auch Fragmente, welche ausgehend vom ATP-kompetitiv bindenden Teil sukzessive gekürzt wurden, um den unterschiedlichen Einfluss der Teilsegmente auf die Selektivität in Bezug auf die Zielproteine zu untersuchen (vgl. Abbildung 3.13). Bei der Wahl der zu profilierenden Verbindungen wurde zudem besonderes Augenmerk auf die schrittweise Reduktion des Grundgerüsts gelegt, um die

Unterschiede im Hinblick auf die Belegung verschiedener Bindungstaschen korrelierend zur Größe des untersuchten Moleküls sowie der adressierten zellulären Targets herauszustellen.

3.4.2 Profilierung

Die Profilierungsstudie wurde mit „KINAXO's Cellular Target Profilig[®]“ unter Verwendung der SILAC-Methode⁹⁴ in K562-Zelllysats durchgeföhrt (vgl. Kapitel 3.3). In der Gesamtheit an Zielproteinen, welche innerhalb der Studie von den untersuchten Verbindungen mit signifikanter Affinität gebunden wurden, konnten 35 Proteinkinasen, zwei Glukokinasen, ein Cyclin, ein Plectin sowie zwei Isoformen eines Lamina-assoziierten Polypeptids und eine Dehydrogenase identifiziert werden (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15). Es wurden jedoch nicht nur Vertreter der Tyr-Kinasen (z.B. Abl, Lyn, Fer, usw.), sondern auch der Ser/Thr-Kinasen (p38 α / β / γ , JNK1/2, CDKs, etc.) detektiert, wobei die Homologie bzw. der Verwandtschaftsgrad unter den Zielenzymen je nach eingesetztem Molekül partiell stark variierte.

Anhand der Profilierungsdaten wird ersichtlich, dass die maximal verkürzten Fragmente **15** und **4b**, welche lediglich Pyrazol- oder Pyrazolharnstoff-Teil tragen, in dem angewendeten Assay keinerlei Affinität zu zellulären Proteinen aufweisen. Dieses Resultat mag darin begründet sein, dass sowohl der Pyrazol- als auch der Harnstoff-Teil von Hybridinhibitoren vollständig innerhalb der allosterischen Tasche lokalisiert sind und somit die DFG-out Konformation einer Phosphotransferase als Voraussetzung für die Herbeiföhung einer grundsätzlichen Protein-Ligand-Wechselwirkung dieser Fragmente benötigt wird.^{14, 15} Diese räumliche Anordnung ist jedoch nicht die vorherrschende in aktivierten Kinasen und wird erst durch vollständige oder teilweise Belegung angrenzender Areale der ATP-Tasche induziert. Einen weiteren Grund für dieses Ergebnis stellt die in der Literatur bekannte vergleichsweise schwache absolute Affinität von Fragmenten dar, da diese im Allgemeinen zu wenige strukturelle Merkmale besitzen, wie z.B. H-Brücken-Donoren und -Akzeptoren und Motive für hydrophobe Interaktionen, die eine signifikante Affinität hervorrufen können. In der Theorie besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Fragmente als isolierte Motive unabhängig des Bindungsmodus als Bestandteil in komplexen Molekülen auch andere Bindungsmodi (z.B. Scharnierkontakte) aufweisen können.⁹⁶ Diese denkbaren Interaktionen scheinen allerdings derart gering ausgeprägt zu sein, dass durch diese keine zellulären Adressaten identifiziert werden konnten. Diese Beobachtung stimmt ebenfalls mit den zuvor gegenüber cSrc, Abl und KIT eruierten biochemischen Daten überein, die keine Inhibition

dieser drei Tyrosinkinasen zeigten und schon vermuten ließen, dass eine Erweiterung des Harnstoffmotivs in Richtung des katalytischen Zentrums nötig ist, um Affinität zu erzeugen.

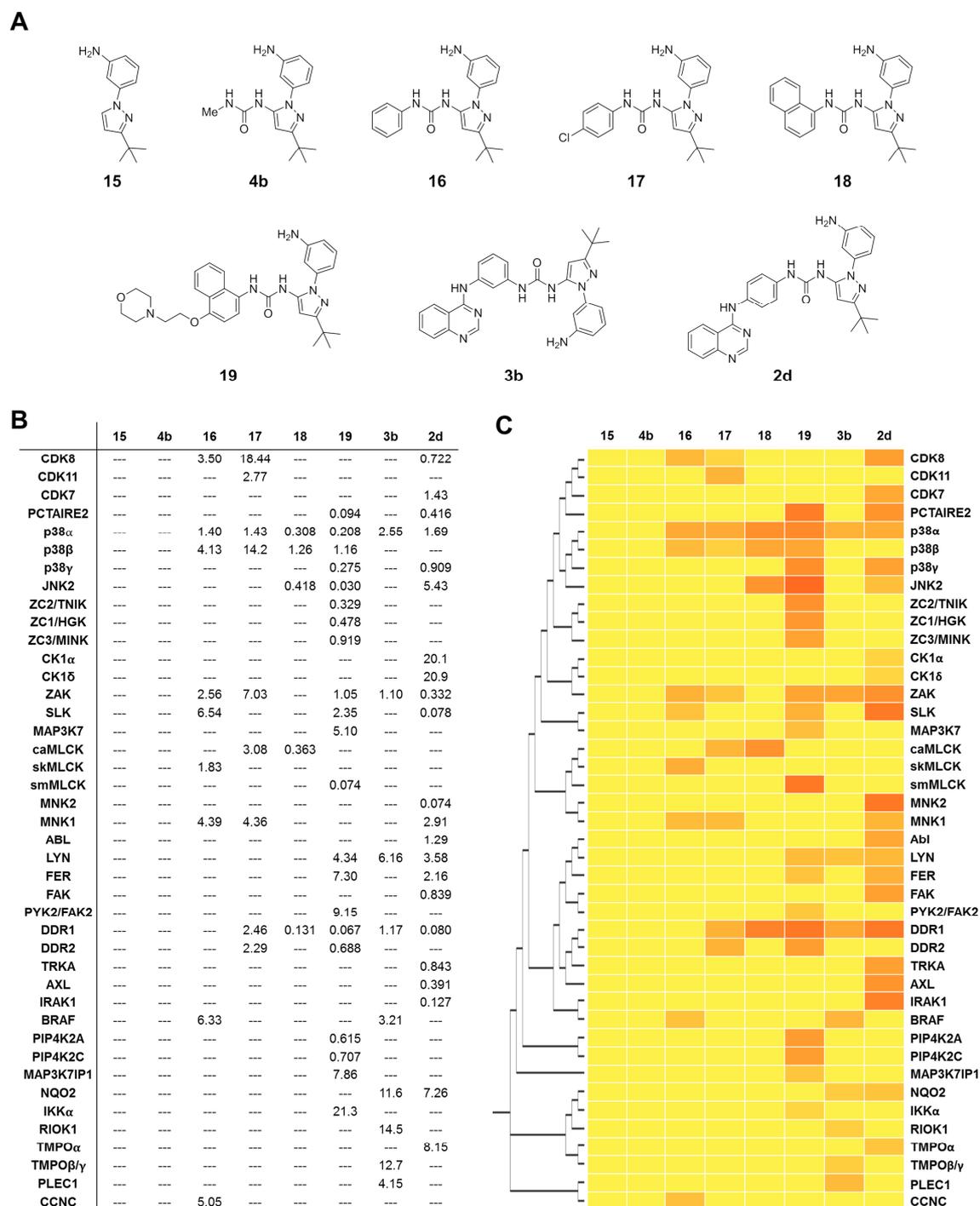


Abbildung 3.14: A) Übersicht der zur Profilierung verwendeten niedermolekularen Verbindungen; B) Zusammenstellung aller durch die zelluläre Profilierung erhaltenen K_D -Werte (μM); C) Verwandtschaftsgrade der ermittelten Zielproteine als Clusteranalyse sowie *heatmap*-Darstellung der korrespondierenden K_D -Werte in Relation zu den jeweiligen Zielproteinen.

Mit Erweiterung der Moleküle in Richtung der Scharnierregion waren unterschiedliche Selektivitäts- sowie Affinitätsprofile herausstellbar. Im Falle der Einführung eines Phenylrings an den Harnstoffteil (**16**) konnte die Affinität so weit erhöht werden, dass acht Proteinkinasen mit K_D -Werten von 1-6 μM adressiert wurden. Darunter waren sowohl Vertreter der Calmodulin-abhängigen (CAMK) und Tyrosinkinase-artigen (TKL) Proteinkinasen als auch solche, die zu der Superfamilie der MAPK, CDK, GSK3 und CLK Kinasen (CMGC) gehören (Abbildung 3.15). Darüber hinaus fand sich ebenfalls ein Mitglied der Familie von Homologen der *Yeast Sterile* Kinasen (STE) sowie Cyclin-C, das zusammen mit CDK8 (ebenfalls unter den Treffern) und anderen Komponenten das sogenannte CDK8 Modul als Teil eines Multienzymkomplexes bildet.⁹⁷ Dabei liegt jedoch die Vermutung nahe, dass Cyclin-C kein unmittelbares Target von **16**, sondern ein assoziiertes Protein darstellt, das durch Komplexbildung mit dem direkten Interaktionspartner CDK8 kooperativ identifiziert wurde.

Die zusätzliche Erweiterung des eingeführten Phenylrings mit *p*-Chlor-Substituenten (**17**) führte nicht zu einer Erhöhung der Affinität. Die K_D -Werte für die ermittelten Targets lagen im Bereich von 1-18 μM , jedoch war eine geringfügige Veränderung des Selektivitätsprofils zu beobachten. Zwar wurden die gleichen Subfamilien (CAMK, TKL, CMGC, STE) und innerhalb dieser nahezu die gleichen Proteine respektive deren Isoformen adressiert, aber darüber hinaus konnten auch die Tyrosinkinasen DDR1 und DDR2 als Zielproteine festgestellt werden. Erfolgt die Erweiterung des Phenylrings nicht in *para*-Position und damit in Richtung der ATP-Tasche, sondern in *ortho/meta*-Position wie im Naphthyl-Derivat **18** und damit in Richtung der allosterischen Subtasche im Bereich des Türstehers, so konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der Zielproteine im Vergleich zu **17** deutlich reduziert (fünf vs. neun), im Gegenzug aber die Affinität zu diesen signifikant gesteigert wurde (vgl. Abbildung 3.14B). So war zu beobachten, dass die mit **18** interagierenden Kinasen DDR1, p38 α , caMLCK, JNK2, p38 β ausnahmslos K_D -Werte im Bereich von 0.1-1.1 μM aufwiesen. Auffällig war darüber hinaus, dass es eine deutliche Präferenz gegenüber DDR1 im Vergleich zu DDR2, welches nicht unter den Zielproteinen festzustellen war, vorlag. Bei der sukzessiven Erweiterung der Fragmente über den Harnstoffteil hinaus konnten also Unterschiede in den Selektivitäts- als auch Affinitätsprofilen festgestellt werden, abhängig davon, in welche Richtung und in welchem Umfang die Erweiterung vollzogen wurde. So konnten für die einfache Phenyl- bzw. *para*-Chlorphenyl-Erweiterung (**16** bzw. **17**) lediglich einige wenige schwach affin bindende Zielproteine der größtenteils gleichen übergeordneten Familien festgestellt werden.

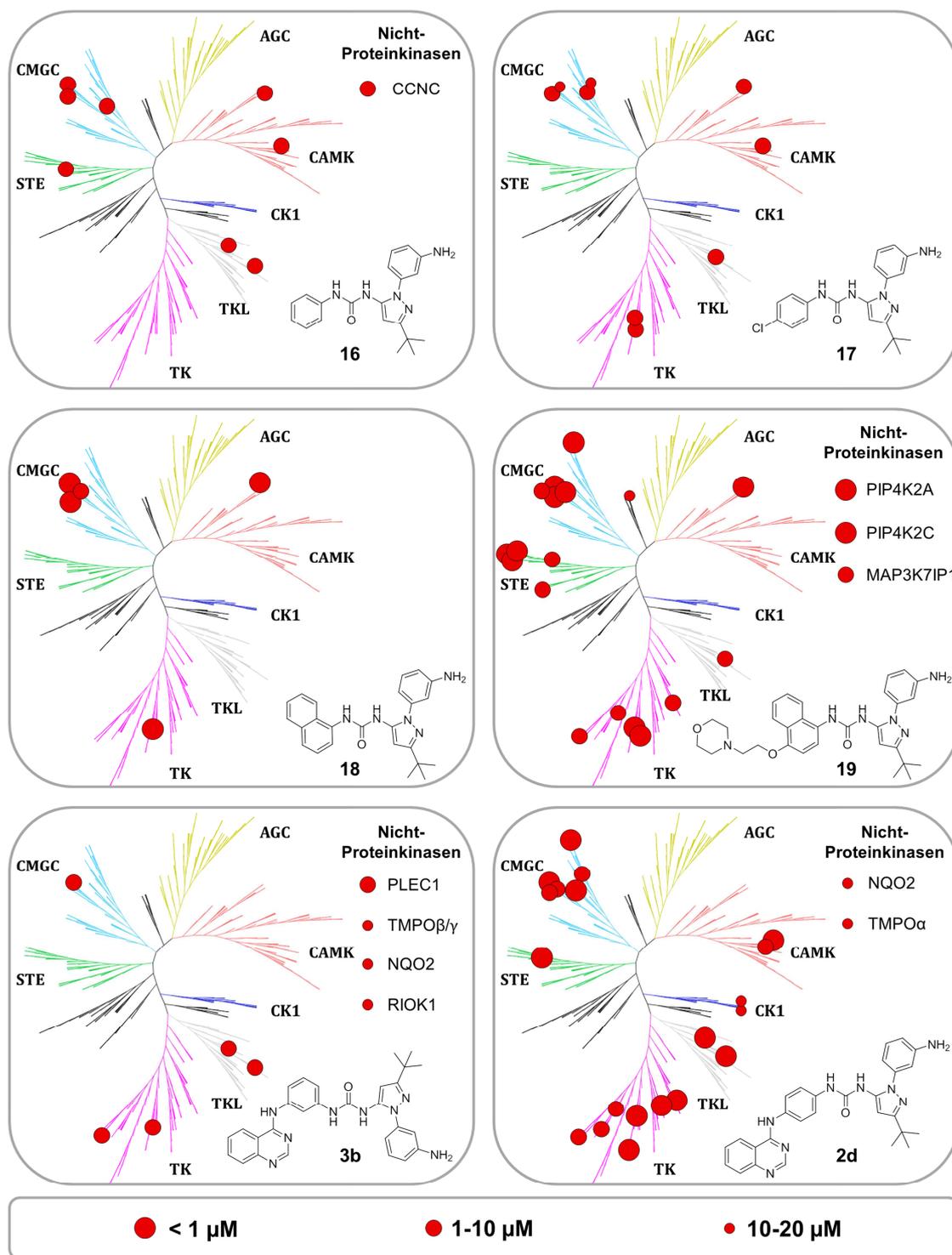


Abbildung 3.15: Zusammenstellung aller Profilierungsdaten (K_D -Werte) und Visualisierung der Selektivitätsprofile innerhalb des humanen Kinoms. Zusätzlich adressierte Nicht-Kinasen sind separat angeführt. Die hierarchische Darstellung als Dendrogramm wurde mit Hilfe des Programms FigTree v1.3.1 und basierend auf dem Sequenzalignment aller humanen Kinasen (adaptiert von www.kinase.com) erstellt.

Für **17** konnten mit DDR1 und DDR2 durchaus interessante Targets für Pyrazolharnstoffe identifiziert werden. Die Regulation der zugehörigen Signalwege ist essentiell für die embryonale Entwicklung aber auch die Entwicklung des Knochenskeletts und im Besonderen der Epiphyse.⁹⁸ Schon eine Naphthyl-Substitution (**18**), wie sie auch im kommerziell erhältlichen Kinaseinhibitor BIRB-796 zu finden ist, ging aber mit einer signifikanten Steigerung der Affinität ($K_D < 1 \mu\text{M}$) als auch der Adressierung einer alternativen Kinase (JNK2) einher und zeigt weiterhin eine Selektivität zu DDR1 gegenüber DDR2. Grundlegend für diese Beobachtung ist die Anwesenheit des polyzyklischen, aromatischen Systems, welches zum einen die generellen hydrophoben Interaktionen innerhalb der Bindungstasche verstärkt und im Speziellen zur Belegung der hydrophoben Subtasche im Bereich des Türstehers führt. Dabei ist das Auftauchen von p38 und seiner verschiedenen Isoformen als Targets nicht sonderlich unerwartet für diese Klasse der Inhibitoren, da Pyrazolharnstoffe ursprünglich für die Inhibierung von p38 α und zur Behandlung entzündlicher Prozesse, deren Auftreten mit einer Fehlregulation dieser Kinase assoziiert ist, entwickelt wurden.^{2, 99} Im Vergleich der Derivate (**16-18**) stellt die Naphthyl-substituierte Verbindung **18** den besten Kompromiss in Bezug auf Selektivität bzw. Affinität und Inhibitorgröße dar.

Der Trend zur Steigerung der Affinität und Selektivität durch Erweiterung des Grundgerüsts konnte durch erneute Derivatisierung zum BIRB-796 Analogon **19** fortgesetzt werden. Genannte Struktur trägt neben der Naphthyl-Gruppe als weiteres Strukturelement zur Orientierung in Richtung der allosterischen Subtasche eine Ethylmorpholin-Substitution, um die Ausbildung vorteilhafter Interaktionen zur Scharnierregion in Form polarer Wechselwirkungen zu induzieren. Durch diese Expansion wurde die Selektivität des Moleküls im Hinblick auf die Adressierung von Proteinkinasen signifikant herabgesetzt. Anstelle von zuvor fünf wurden nun 21 Zielproteine aus den Klassen STE, CMDG, TK, TKL und CAMK identifiziert. Mit dieser Multitarget-Adressierung geht außerdem eine große Affinität zu den Interaktionspartnern einher, denn $\approx 50\%$ der Kinasen, darunter DDR1/2, p38 α/γ , JNK2, ZC1/2/3, PCTAIRE2 und smMLCK, wurden mit K_D -Werten im Bereich von $< 1 \mu\text{M}$ gebunden. Zudem konnten für die Proteine ZAK, p38 β , SLK, Lyn, Fer, PYK2 und MAP3K7/MAP3K7IP1 Dissoziationskonstanten in der Größenordnung von 1-10 μM festgestellt werden, wobei im Falle des Vermittlerproteins MAP3K7IP1 davon auszugehen ist, dass dieses wiederum als direkter Interaktionspartner im Komplex mit MAP3K7 assoziativ isoliert wurde und kein direktes Target von **19** darstellt. Eine weitere, jedoch mäßige Interaktion ($K_D = 21.3 \mu\text{M}$) wurde für IKK α nachgewiesen. Karaman *et al.* stellten 2008 eine *in vitro* Profilierungsstudie vor, die auf Kompetition des freien Inhibitors und Präsentation der isolierten, zu testenden Kinase an einer Bakterienoberfläche, dem sogenannten Phagen-Display, beruht und BIRB-796 als eine der Testsubstanzen enthielt.⁵⁵ Eine gegenüberstellende Betrachtung

beider Vorgehensweisen macht deutlich, dass im Kontext der biochemischen Charakterisierung an isolierten Kinasedomänen eine große Diversität unter den Zielkinasen vorherrschte. In der 2008 durchgeführten Studie wurden jedoch lediglich 317 Kinasen untersucht, so dass die Gesamtheit der relevanten Phosphotransferasen nicht im getesteten Panel repräsentiert war. Trotzdem wurden in dieser Studie 75 Zielkinasen identifiziert ($K_D = 0.4\text{-}9800\text{ nM}$), wohingegen **19** unter zellulären Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit lediglich 21 Interaktionspartner zugeordnet werden konnten. Dieses Resultat spiegelt wider, dass die unterschiedliche Herangehensweise auch in signifikant variierenden Resultaten endet und biochemische Evaluierungsstudien daher kritisch in Bezug auf die Interpretation der Daten betrachtet werden müssen. Die Unterschiede sind einerseits darauf zurückzuführen, dass in 84.5% der Fälle der Karaman-Studie nicht die Vollängenkonstrukte der Transferasen, sondern deren katalytischen Domänen verwendet wurden und zum anderen optimale *in vitro* Rahmenbedingungen gewählt wurden, welche die vorherrschende physiologische Situation bezüglich ATP-Gehalt oder Gegenwart von Nicht-Kinasen/Targets etc. innerhalb einer Zelle keineswegs nachstellen.

Unter Betrachtung der rational generierten Hybridinhibitoren, **3b** als rigider und **2d** als flexibler Vertreter, waren ebenfalls eindeutige Unterschiede festzustellen. Im Falle des 1,3-verknüpften Derivats wurden lediglich neun potentielle Zielproteine gefunden, darunter jedoch drei nicht zur Familie der Kinasen gehörende Proteine (PLEC1, NQO2, TMPO β/γ) und mit R1OK1 eine atypische Kinase. Neben diesen konnten die Tyr-Kinasen ZAK, DDR1, BRAF und Lyn ($K_D = 1\text{-}6\text{ }\mu\text{M}$), sowie die Ser/Thr-Kinase p38 α ($K_D = 2.5\text{ }\mu\text{M}$) identifiziert werden. Im Vergleich dazu konnten 22 Zielproteine für **2d** identifiziert werden, wobei mit Ausnahme der AGC-Familie nahezu die gesamte Bandbreite der humanen Kinaseklassen tangiert und in 50% (11 aus 22) der Fälle Bindungsaffinitäten von $<1\text{ }\mu\text{M}$ nachgewiesen wurden. Im Detail finden sich unter den Treffern mit der stärksten nachgewiesenen Interaktion zu **2d** die Kinasen DDR1, SLK und MNK2 sowie IRAK1 (K_D -Werte: $0.07\text{-}0.13\text{ }\mu\text{M}$), welche somit zugleich vier übergeordnete Familien (TK, TKL, STE, CAMK) repräsentieren. Weitere proteinogene Targets mit Dissoziationskonstanten von $0.33\text{-}1\text{ }\mu\text{M}$ stellen ZAK, Axl, PCTAIRE2, PIP4K2 α/γ , CDK8, FAK, TRKA und p38 γ dar. **2d** vertritt darüber hinaus im Rahmen dieser Profilierungsstudie das einzige unter den charakterisierten Derivaten, durch welches Abl als Interaktionspartner herausgestellt werden konnte ($K_D = 1.3\text{ }\mu\text{M}$). Zusätzliche Wechselwirkungen zeigten sich zu den Phosphotransferasen CDK7, p38 α , Fer, MNK1, Lyn, JNK2 sowie der Dehydrogenase NQO2 und dem Lamina-assoziierten Polypeptid TMPO α . Weitere Vertreter, die ausschließlich, aber mit geringer Bindungseffizienz, durch den flexiblen 1,4-Hybridinhibitor aufgefunden werden konnten, repräsentieren die Isoformen *alpha* und *gamma* der Casein Kinase I ($K_D \approx 20\text{ }\mu\text{M}$).

Im Falle der Hybridinhibitoren (**2d**, **3b**) konnten demnach, trotz gleichen Molekulargewichts und identischer struktureller Motive aber geringfügig differenter Verknüpfung, aufgrund der unterschiedlichen Flexibilität signifikante Unterschiede sowohl in der Art und Identität der adressierten Proteine als auch der Stärke der Bindung festgestellt werden. Während das rigide Hybridderivat (**3b**) lediglich einige wenige Proteinkinasen (ZAK, DDR1, BRAF und Lyn) sowie eine atypische Kinase (RIOK1) als auch drei Nicht-Kinasen (PLEC1, NQO2, TMPO β/γ) adressiert, können für den flexiblen Vertreter (**2d**) 22 Targets mit unterschiedlichen Dissoziationskonstanten aufgezeigt werden. Die Selektivität der konformationell eingeschränkten Verbindung **3b** zeigt, dass durch Restriktion der Rotation der terminalen Struktur motive ebenfalls die Anzahl an Interaktionspartnern eingegrenzt wird. Hier wird eine definierte Topographie im Bereich der katalytischen Tasche des Zielproteins benötigt, um eine Interaktion zu ermöglichen. Wird allerdings Flexibilität des Inhibitors erhöht, so können Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit von Proteinen durch Rotation und Annahme einer adäquaten, alternativen „Passform“ ausgeglichen werden und führen, wie **2d** deutlich zeigt, zu einer Vielzahl von Wechselwirkungspartnern. Die Reduzierung der Anzahl an Freiheitsgraden durch Rigidisierung ist generell entropisch bevorzugt, da eine geringere Anzahl an möglichen Konformeren adaptiert werden kann und somit durch Präorganisation in Relation zu flexibleren Grundgerüsten ein geringerer Entropieverlust zur Einnahme des finalen Bindungsmodus hervorgerufen wird. Prinzipiell gilt also für die Chinazolin-Pyrazolharnstoffe, dass die Rigidisierung Selektivität erzielt, während die Erhöhung der Flexibilität für eine Multitarget-Adressierbarkeit sorgt. Interessanterweise kann Abl lediglich durch **2d** gebunden werden, während KIT, obwohl in K562 exprimiert,¹⁰⁰ nicht unter den validierten Kinasen auftaucht. Diese Feststellung steht in ausgeprägtem Kontrast zu den durchgeführten biochemischen Profilierungen (Ambit, KinEASE™), die KIT als stärksten Interaktionspartner postulierten. Doch wie eingangs schon festgestellt liegen die Gründe dafür im verwendeten zellulären Setup, welches näher an der Realität der physiologischen Bedingungen orientiert ist und daher wissenschaftlich überzeugende Ergebnisse liefert. Durch das Auffinden der zytosolischen Dehydrogenase NQO2 sowohl durch den rigiden als auch flexiblen Hybridinhibitor (**3b**, **2d**) lässt sich ein zuvor nicht bekannter Anwendungsbereich in der Chemoprävention von Krebserkrankungen deklarieren, denn besagte Oxidoreduktase wurde als direktes Target der Resveratrol-induzierten Inhibition der Proliferation von Krebszellen identifiziert.¹⁰¹⁻¹⁰³

Im Allgemeinen bleibt festzuhalten, dass die Ausbildung diverser Interaktionen eines Liganden mit Kinasen bzw. die Belegung mehrerer Bindungstaschen in diesem Fall in der promiskuitiven Adressierung von Proteinen und damit geringerer Selektivität mündet, wie am Beispiel der Typ-II Inhibitoren **2d** und **19** im Vergleich zu den verkürzten Molekülen **16**, **17**

und **18** (Typ-III) herausgestellt werden konnte (Abbildung 3.16). Zur Generierung signifikanter Affinität ist aber vor allem die Erweiterung in den ATP-bindenden Teil einer Kinase wichtig. Auch in der Literatur finden sich Arbeiten, die diese Beobachtung beschreiben, aber nicht als generelles Dogma propagieren.⁵³ Einzig die Einführung von Rigidität unter Konser- vierung aller potentiell vorteilhaften Motive zur Ausbildung von Interaktionen am Target führte zur Selektivität in Relation zu vergleichbaren Verbindungen (vgl. **2d**, **3b**, Abbildung 3.16).

Als Quintessenz der Untersuchungen lässt sich zusammenfassen, dass die Selektivität von Hybridinhibitoren und verwandten Fragmenten zu zellulären Zielenzymen nicht generell vorhersagbar, aber experimentell eruierbar und quantifizierbar ist. Daher ist es absolut zweckmäßig, in der Auffindung und Optimierung von niedermolekularen Verbindungen auf die Kombination rationalen Designs und zellulärer Profilierungssysteme zu setzen.

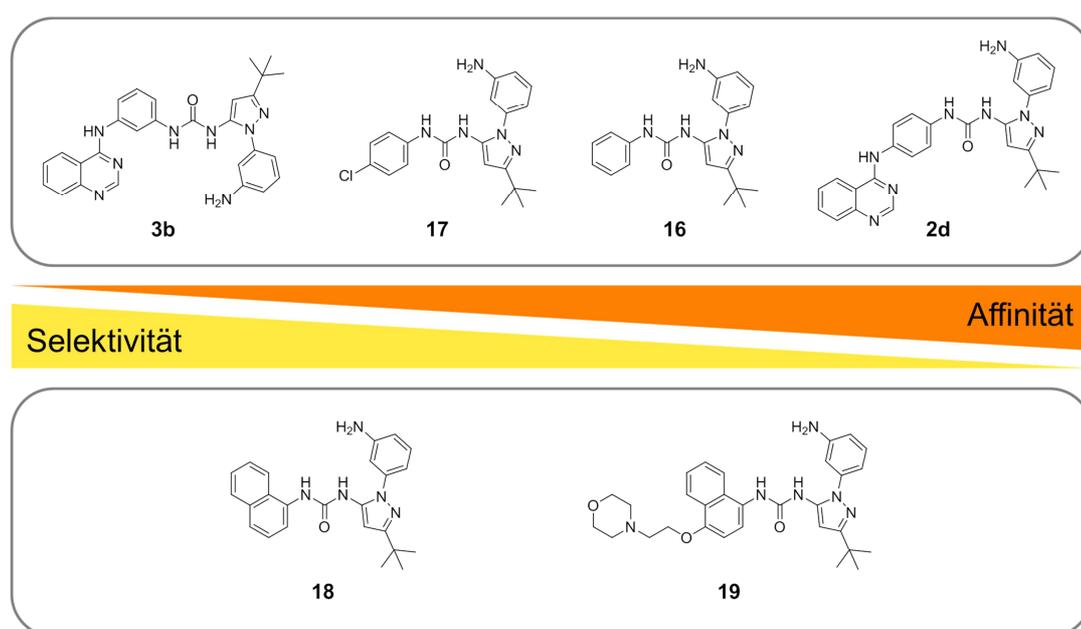


Abbildung 3.16: Korrelation der Inhibitorgröße mit ihrer generellen Affinität und Selektivität gegenüber Zielproteinen im zellulären System separiert nach Hybridverbindungen (oben) sowie BIRB-796-verwandten Analoga (unten).

Zwei Aspekte werden jedoch auch bei der Charakterisierung von immobilisierten Inhibitoren in Zelllysaten vernachlässigt: Auf diese Weise kann die generelle Fähigkeit der untersuchten Verbindungen zur Penetration von Zellen bzw. Überwindung der Zellmembran nicht evaluiert werden, da die Proteinbindung aus Zelllysate erfolgt. Um die Zellpermeabilität untersuchen und berücksichtigen zu können, sind jedoch orthogonale Untersuchungsmethoden wie beispielsweise der parallel artifizielle Membranpermeations-Assay (PAMPA)

verfügbar. Weiterhin kann das Argument der Modifikation eines Inhibitors durch Immobilisierung und eine potentiell damit einhergehende Änderung der physikochemischen Eigenschaften mit Effekt auf Selektivitäten und Affinitäten nicht von der Hand gewiesen werden. Dennoch bildet diese Profilierungsmethode die physiologische Umgebung zufriedenstellend nach im Gegensatz zu Ansätzen unter Verwendung isolierter Kinasedomänen. Darüber hinaus verspricht diese Art der Untersuchungen ein enormes Potential, um die generelle Toxizität von Inhibitoren durch Adressierung von *off-targets* im Vorfeld weiterer Optimierungsansätze zu klären. Letztlich können jedoch keine Kreuzreaktivitäten zu Proteinen herausgestellt werden, die nicht in der untersuchten Zelllinie exprimiert sind oder eine intakte Zelle/Membran für die Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion benötigen wie z.B. Ionenkanäle (hERG).

4 Chemische Genetik

Methoden zum Studium der Biologie eines Proteins innerhalb einer Signalkaskade in komplexen biologischen Systemen erfordern selektive niedermolekulare Verbindungen, die spezifisch die Funktion der Zielproteine perturbieren. Dabei gibt der Vergleich von beeinflussten zu nicht beeinflussten Zuständen Aufschluss über die Funktion einzelner Komponenten im übergeordneten Komplex. Aufgrund der herausragenden strukturellen Konserviertheit der katalytischen Domäne von Kinasen und der daraus resultierenden fehlenden Selektivität von entsprechenden Inhibitoren ergibt sich jedoch die Schwierigkeit der zielgerichteten Adressierung einer einzelnen Transferase. Um dieses Problem zu umgehen, bedient man sich der Methoden der chemischen Genetik, welche es ermöglichen, ein Zielprotein auf genetischer Ebene (DNA) abzuändern, und das Genprodukt (Protein) im Hinblick auf die dreidimensionale Struktur individuell zu gestalten. Ein zur abgeänderten Struktur komplementärer Inhibitor erzeugt entsprechende Selektivität zum artifiziellen Zielprotein. Im Fall der sogenannten *bump and hole* Methode, die in der Gruppe um Kevan Shokat entwickelt und verfeinert wurde,¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ kann dabei der chemische *knock down*, also das zielgerichtete Ausschalten einer einzigen Kinase, artifiziell herbeigeführt werden. Der Vorteil gegenüber einem genetischen *knock out* des Zielenzym liegt in der Tatsache, dass Proteinkinasen in vielen Fällen auch gerüstgebende Aufgaben wahrnehmen, z.B. zur Aufrechterhaltung der Funktion von Multienzymkomplexen,³⁹ die nicht durch die chemisch-genetische *knock down* wohl aber durch die genetische *knock out* Methode eliminiert werden (vgl. Abbildung 4.1). So ist es möglich, die katalytische Funktion eines Proteins innerhalb eines komplexen Netzwerks durch Zugabe eines maßgeschneiderten Inhibitors zu steuern, ohne dieses aus dem Netzwerk zu entfernen und auf diese Weise das Verständnis über die Relevanz des Zielproteins zu fördern.

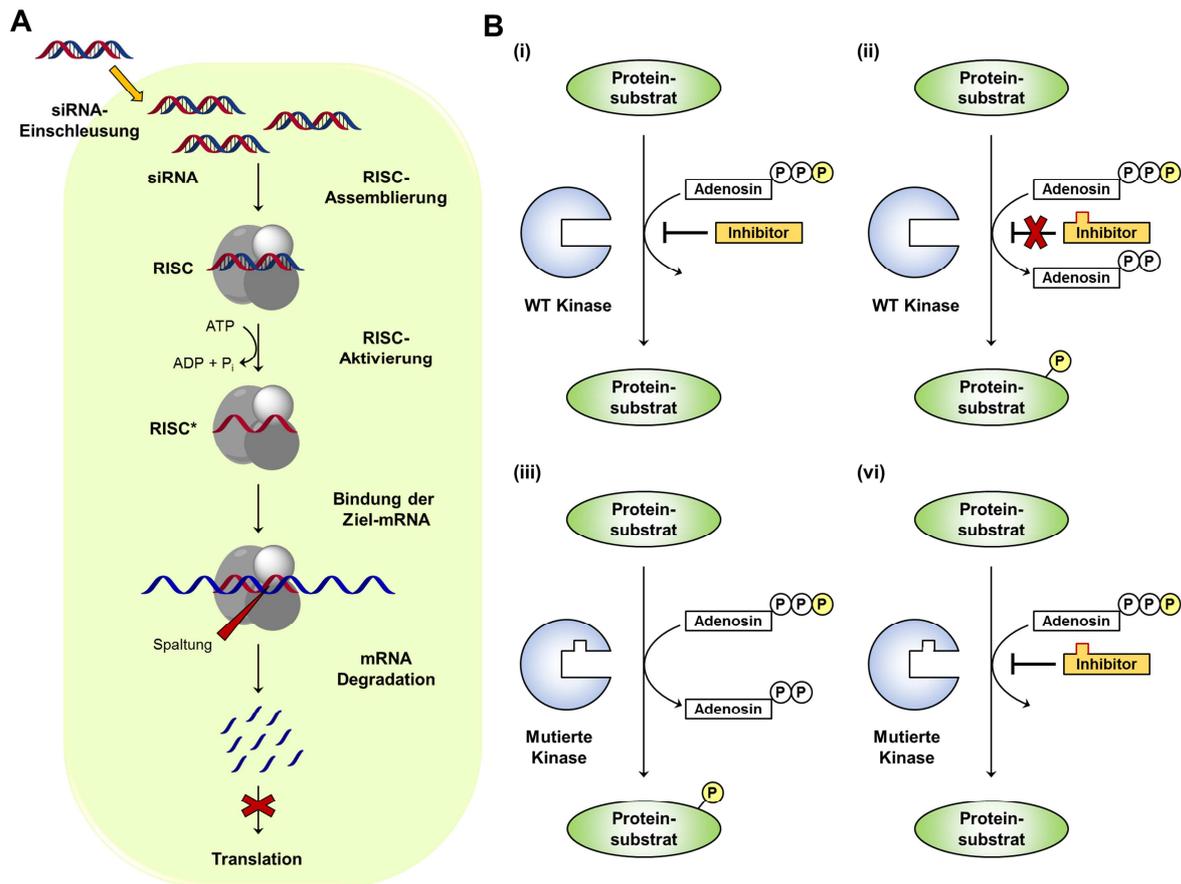


Abbildung 4.1: Gegenüberstellung der Methoden des genetischen *knock out* und des chemisch-genetischen *bump and hole*. **A)** Um ein Protein auf genetischer Ebene auszuschalten wird dem System siRNA zugeführt. Dieser kurze RNA-Doppelstrang ist zu einem Bereich des auszuschaltenden mRNA-Transkripts, kodierend für das Zielprotein, komplementär und wird von internen Kontrollmechanismen erkannt. Nach Einbettung in den sog. RISC-Komplex wird komplementäre mRNA erkannt und hydrolytisch gespalten, so dass keine Translation des Proteins mehr erfolgt. **B)** Im chemisch-genetischen *bump and hole* Ansatz hingegen bleibt das Protein strukturell vollständig intakt. Durch Veränderung des Aktiven Zentrums kann ein rational entwickelter, sterisch anspruchsvoller Inhibitor (*bump*) zu einer ebenfalls rational generierten Mutante (*hole*) des Zielproteins binden, während der Wildtyp aufgrund sterischer Abstoßung des Inhibitors nicht adressiert wird [(i) wt Kinase mit generellem Inhibitor; (ii) wt Kinase mit modifizierten Inhibitor; (iii) Mutierte Kinase ohne modifizierten Inhibitor; (iv) Mutierte Kinase mit modifiziertem Inhibitor].

Irreversibel bindende Inhibitoren, die ein Elektrophil tragen, sind bei dieser Art der Untersuchungen von entscheidendem Nutzen, da sie einerseits permanent am untersuchten Protein verbleiben und dadurch die Effektivität der Inhibition steigern als auch andererseits einen hohen Grad an Selektivität garantieren, da das Vorkommen reaktiver Nucleophile (Cysteine) an spezifisch adressierbaren Positionen innerhalb der ATP-Bindetasche von Kinasen auf einige wenige beschränkt ist.^{31, 32} Ein idealer kovalenter Binder ist dabei im umgebenden System unter physiologischen Bedingungen inert und nimmt so auch keinen Einfluss auf ubiquitär vorhandene Cys-Nucleophile wie Glutathion oder Oberflächen-exponierte Thiole anderer Proteine. Die Reaktivität wird erst durch die perfekte Positionierung des Michael-Akzeptorsystems zum gewünschten Cystein, welche durch

Bindung des Inhibitors im katalytischen Zentrum der Transferase hervorgerufen wird, induziert. Die Ausstattung der Inhibitoren mit reaktiven Elektrophilen sowie die Einführung von Cystein-Nukleophilen am Zielprotein stellt dabei eine Erweiterung der klassischen *bump and hole*-Strategie dar, die ursprünglich lediglich auf dem Einsatz reversibler Inhibitoren beruhte.

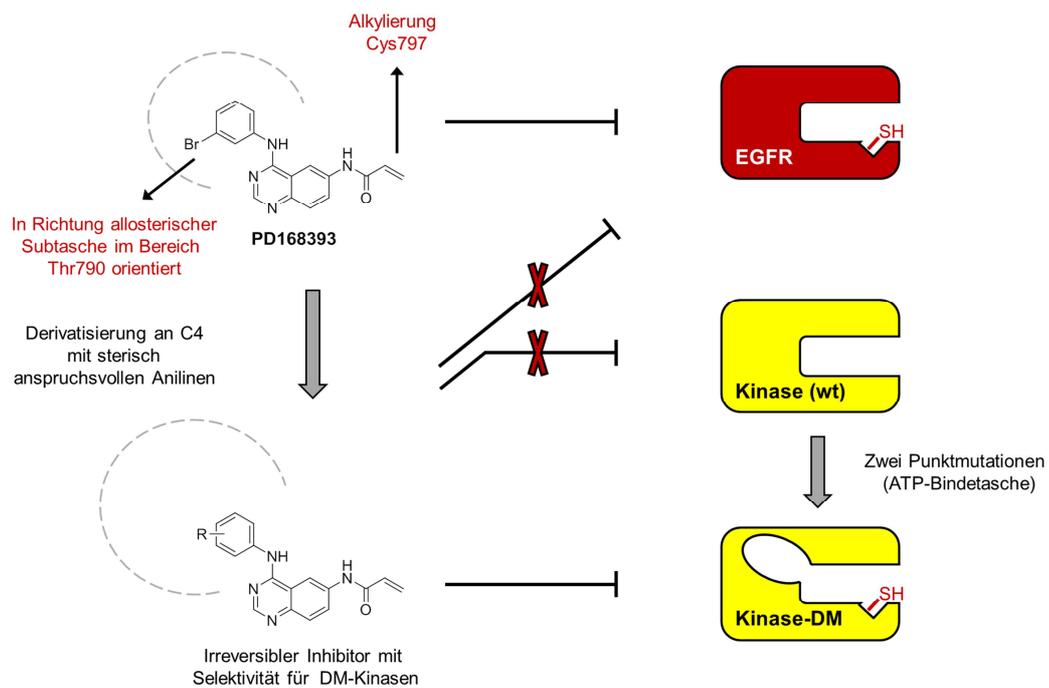


Abbildung 4.2: Allgemeines Prinzip zur Einführung eines Affinitäts- (Thiol) sowie Selektivitätsfilters (*bump and hole*) in EGFR.¹⁰⁷ Der ursprüngliche Inhibitor PD168393 alkyliert Cys797 in EGFR und durch weitere Derivatisierung des 4-Anilinosubstituenten mit sterisch anspruchsvollen Gruppen, kann die inhibitorische Potenz gegenüber EGFR wt aufgehoben werden. Des Weiteren kann durch genetische Modifikation einer geeigneten Zielkinase ein artifizielles Protein-Ligand-Paar geschaffen werden, wobei der Wildtyp des Zielenzym von einer Adressierung durch das modifizierte Inhibitorgerüst unberührt bleibt.

Zur Anwendung der *bump and hole*-Strategie in Kombination mit der Verwendung kovalent modulierender Inhibitoren in einem biologischen System, ist die Einführung sogenannter Selektivitäts- sowie Affinitätsfilter im zu untersuchenden Protein essentiell. Aber auch die zu verwendenden Inhibitoren müssen rational designt sowie exakt auf das Zielenzym abgestimmt werden, um eine 100%ige Komplementarität zwischen niedermolekularer Sonde und makromolarem Protein zu erzeugen und möglichst wenige *off-target*-Effekte zu erzielen. Dazu wird im Allgemeinen im Zuge der Einführung eines Affinitätsfilters im Protein ein reaktives Cystein eingeführt und auf Seite der chemischen Sonde ein komplementäres Elektrophil. Im Gegensatz dazu wird ein Selektivitätsfilter, zumindest im Bereich der Kinasen, üblicherweise durch den Austausch eines sterisch anspruchsvollen Türsteherrests

durch einen weniger anspruchsvollen Rest (Alanin) implementiert. So wird die räumliche Ausdehnung (*hole*) der Bindetasche vergrößert, so dass der strukturell angepasste Inhibitor anschließend die erweiterte Tasche belegen kann. Dieser trägt seinerseits im Regelfall einen substituierten Aromaten mit hohem sterischen Anspruch (*bump*) und da viele Kinasen in der Regel keinen „kleinen“ Türsteherrest besitzen, ist die Selektivität gegenüber diesen Transferasen sichergestellt. Analog zum bereits 1894 durch Emil Fischer postulierten Schlüssel-Schloss-Prinzip^{36, 37} erzeugt die Kombination beider Filtersysteme ein hohes Maß an Selektivität und Affinität sowie Komplementarität zwischen den modifizierten Interaktionspartnern.

4.1 Ark1 – chemisch-genetische Ansätze zur kovalenten Adressierung

Der fehlerfreie Ablauf der Mitose (vgl. Abbildung 4.3) und ihrer zugehörigen Prozesse sowie die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität werden in Eukaryoten durch die Ser/Thr-Kinasen der im Zellkern anzutreffenden Aurora-Familie gesteuert und reguliert.^{108, 109}

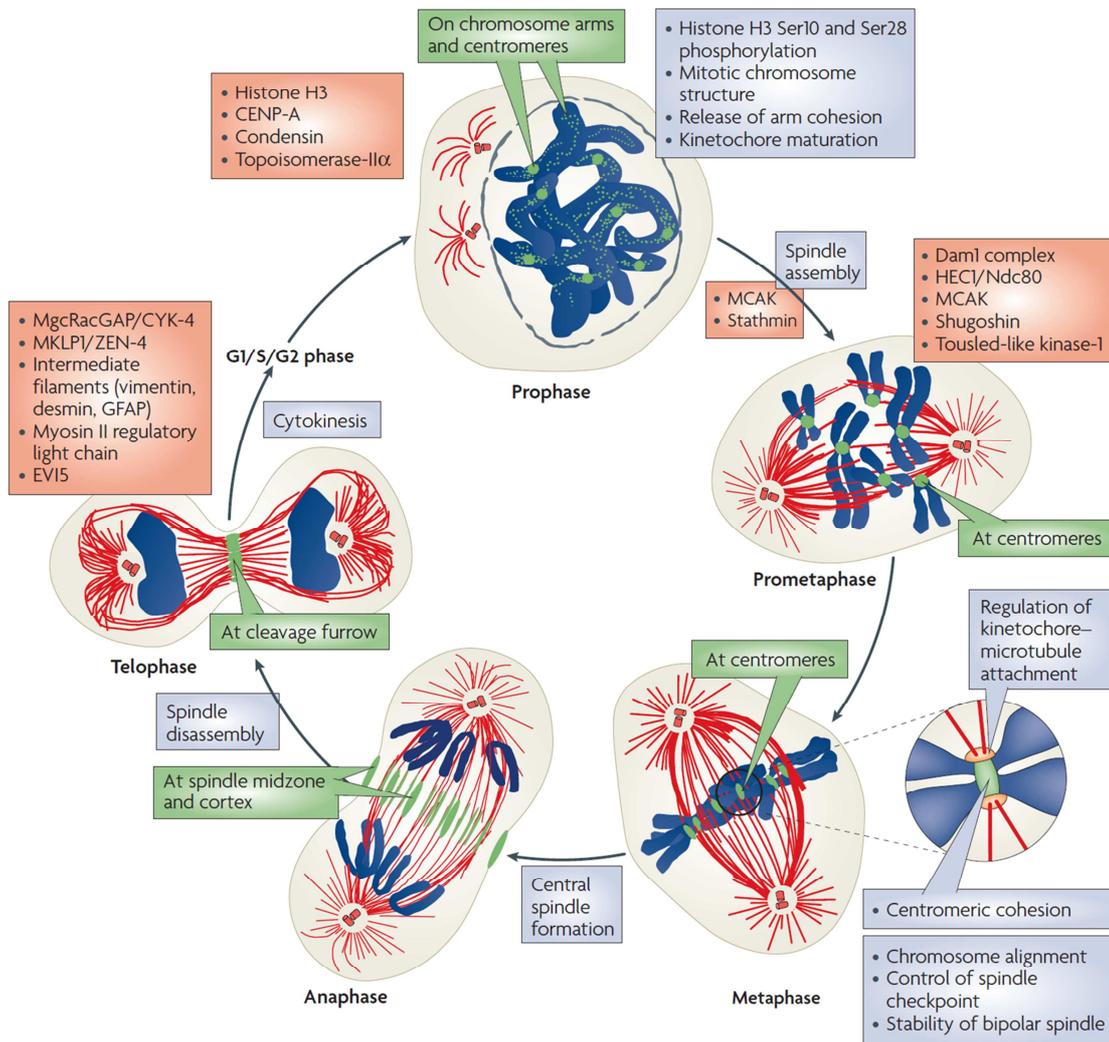


Abbildung 4.3: Schematische Repräsentation des *chromosomal passenger complex* (CPC) und dessen korrelierenden Funktionen (graue Boxen) sowie generellen Interaktionspartnern (rote Boxen) während der Mitose. In der Prophase ist der CPC an den Chromosomenenden sowie Centromeren lokalisiert und sorgt für die Phosphorylierung von Histon 3 an Ser10 und Ser28. Während dieser Phase akkumuliert der CPC an den Centromeren, an welchen die Reifung der Kinetochore beginnt und während der Prometaphase andauert. Weiterhin wird der Komplex für die Bildung einer bipolaren Spindel benötigt und garantiert deren Stabilität im Übergang der Pro-/Prometaphase zur Anaphase. Während der Metaphase lokalisiert der CPC an den Centromeren und nimmt eine entscheidende Rolle in der centromeren Kohäsion sowie der Regulation von Kinetochor-Mikrotubuli Anknüpfungen ein. Weiterhin wird die korrekte Ausrichtung der Chromosomen am Spindeläquator sichergestellt. In der Anaphase erfolgt die Translokation des CPC zur Äquatorialebene einhergehend mit einer Funktion zur Bildung der zentralen Spindel. Während der Telophase tritt der CPC konzentriert an der Trennungsgrenzfläche auf und trägt essentiell zur Komplettierung der Zytokinese bei. (Chromosomen: blau, Tubulin: rot, Kernhülle: grau).¹¹⁰

In Säugerzellen koexistieren drei Isoformen (Aurora A, B und C), die trotz ihrer signifikanten Homologie aufgrund unterschiedlicher Lokalisierung, Assoziation mit Wechselwirkungspartnern, Aktivierung sowie Substratspezifität diverse Funktionen besitzen. So nimmt die an die Centromere gebundene und vom Mikrotubuli-assoziierten Protein TPX2 aktivierte Aurora A eine regulatorische Rolle in der Chromosomenreifung sowie Assemblierung der mitotischen Spindel ein.¹¹¹⁻¹¹³ Aurora B als Isoform mit einer Sequenzhomologie von 71% hingegen ist in der Chromosomenkondensation sowie Zytokinese involviert und durch die Assemblierung im *chromosomal messenger complex* (CMC) reguliert. Dieser besteht aus der Agglomeration der drei nicht-enzymalen Proteine INCENP, Survivin und Borealin, die im Komplex mit Aurora B als enzymatisch aktiven Kern, dessen Substratspezifität, Aktivität und Stabilität kontrollieren.^{108, 113-115} Aurora C nimmt eine wichtige Rolle in der Spermatogenese ein und ist daher auch vermehrt in Keimzellen exprimiert. Die vollständige Funktion dieser Isoform ist jedoch noch nicht zur Genüge geklärt.¹⁰⁸

Im Gegensatz zu diesen unterschiedlichen Isoformen in Eukaryoten ist in Hefen lediglich eine einzige Aurora Kinase bekannt, die durch die Kontrolle der Chromosomen in Bezug auf Kondensation und Anheftung an die mitotische Spindel dafür sorgt, dass diese während des Zellzyklus korrekt separiert werden. Spaltheefe (*Schizosaccharomyces pombe*) beispielsweise besitzt Ark1 als Mediator der Segregation und Zytokinese, der analog zur humanen Aurora B durch die Bindung an die nicht-enzymatischen Proteine Pic1 (entspricht INCENP) und Bir1/Cut17 (entspricht Survivin) in Funktion, Stabilität und Substratspezifität kontrolliert wird.^{110, 116, 117} Da Spaltheefe unkompliziert kultivierbar und Ark1 in diesem Organismus genetisch problemlos modulierbar ist, kann dieses System im Zuge einer chemisch-genetischen Studie zur Untersuchung der Aurora Kinase innerhalb des natürlichen, funktionalen Netzwerks herangezogen werden.¹¹⁸

Vorarbeiten:^{viii}

Zur Untersuchung der spezifischen Funktion von Ark1 innerhalb seiner Signalkaskade und um die strukturellen und chemischen Voraussetzungen für die Inhibition mutierter Zielenzyme in chemisch-genetischen Ansätzen tiefergehend zu eruieren, wurden auf genetischer Ebene Selektivitäts- und Affinitätsfilter in Ark1 inkorporiert. Diese erzeugen die Empfänglichkeit des Genprodukts im Zuge einer *bump and hole* Studie für die Inhibition mit 4-Anilino-substituierten Chinazolinen. Als Selektivitätsfilter wurde der Leucin-Türsteherrest zu Alanin mutiert (L166A), um die räumliche Ausdehnung der ATP-Bindetasche zu erweitern und so die Akzeptanz eines sterisch anspruchsvollen 4-Anilinochinazolins als Ligand zu gewährleisten. Weiterhin wurde an einer zu EGFR äquivalenten Position am Ende der Scharnierregion ein artifizielles Cystein (E173C) zur kovalenten Modifikation mit Elektrophil-tragenden Liganden eingeführt (Affinitätsfilter, vgl. Abbildung 4.4).

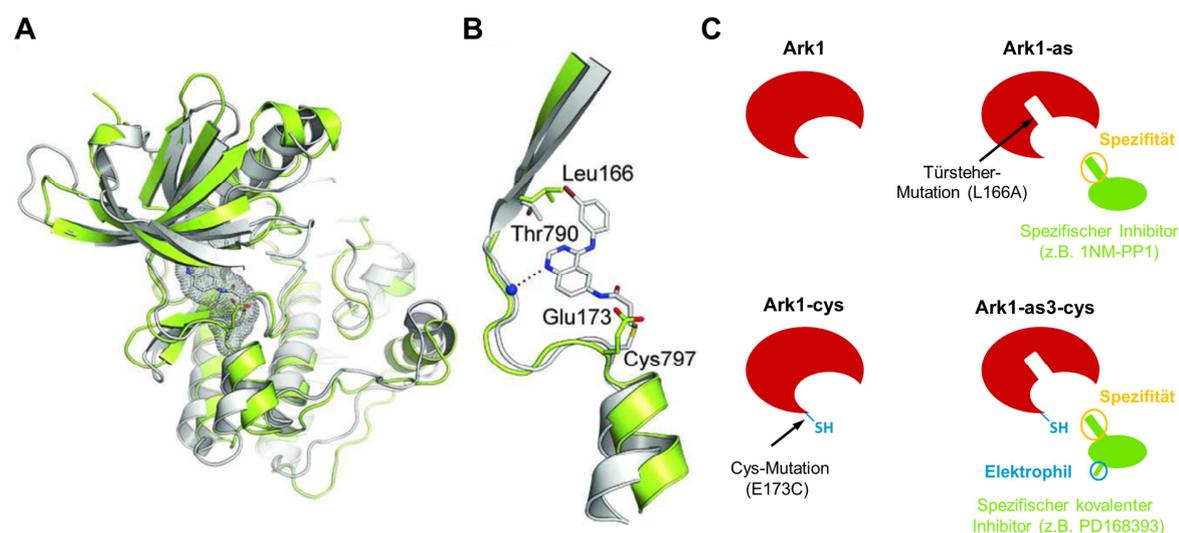


Abbildung 4.4: **A**) Superposition der katalytischen Domäne von EGFR (hellgrün, PDB-Eintrag: 2J5F) mit dem Homologiemodell von Ark1 basierend auf der Kristallstruktur der verwandten *Xenopus* Aurora B (grau, PDB-Eintrag: 2BFY); **B**) Detaildarstellung der Interaktion des kovalent bindenden Inhibitors PD168393 in der ATP-Bindetasche von EGFR und seine Interaktionen zur Scharnierregion; **C**) Rational designte Konstrukte auf der Grundlage von Ark1 wt. Zunächst wird ein Selektivitätsfilter in Form der Mutation L166A eingeführt, um die Sensitivität gegenüber PD168393 zu erhöhen. Der zweite Filter zur Erhöhung der Affinität wird durch die Einführung eines Cysteins (E173C) realisiert. Im finalen Konstrukt werden beide Mutationsvarianten vereint.

^{viii} Die Vorarbeiten zum *bump and hole* Ark1-Konstruktdesign, sowie der Generierung und Synthese geeigneter Sonden wurden von André Koch (Friedrich Miescher Laboratorium der MPG, AG Dr. Silke Hauf, Tübingen) sowie Dr. Haridas Rode (Chemical Genomics Centre der MPG, AG Prof. Dr. Daniel Rauh, Dortmund) durchgeführt.

Dazu wurden drei verschiedene Mutanten erzeugt, von denen je eine a) den Türsteher-Selektivitätsfilter, b) den Cystein-Affinitätsfilter oder c) den Affinitäts- sowie Selektivitätsfilter besaßen. Die Grundlage für die Erzeugung der Konstrukte war ein rationales Design anhand einer Superposition der Kristallstrukturen von EGFR im Komplex mit PD168393 und aus Ermangelung einer verfügbaren Ark1-Kristallstruktur wurde die Kristallstruktur einer homologen Aurora B Kinase aus *Xenopus laevis* herangezogen.

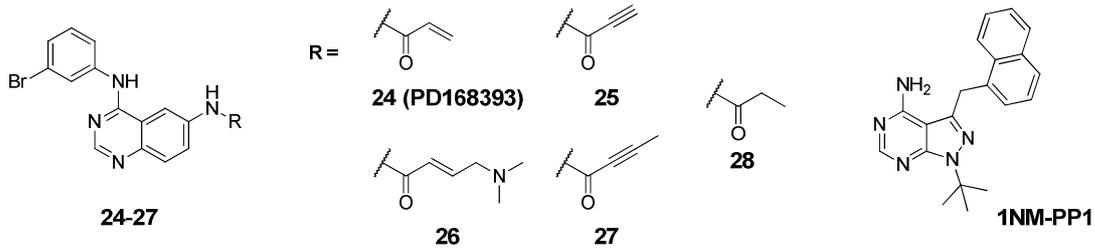


Abbildung 4.5: Übersicht der potentiell kovalent (**24-27**) und reversibel (**28**, 1NM-PP1) interagierenden Verbindungen.

Neben der Ursprungsverbindung **24** waren auch Analoga mit unterschiedlichen Elektrophilen generiert worden (**25**, **26**, **27**, Abbildung 4.5), die sowohl in der Geometrie der terminalen, ungesättigten Mehrfachbindung als auch der Polarität Unterschiede aufwiesen und so möglicherweise zu unterschiedlicher Effektivität führen. Zudem vervollständigten das gesättigte Analogon **28** und 1NM-PP1, ein bekannter Inhibitor für den Einsatz in *bump and hole* Systemen,¹⁰⁶ das Panel der berücksichtigten Inhibitoren.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Biochemische Charakterisierung der *bump and hole*

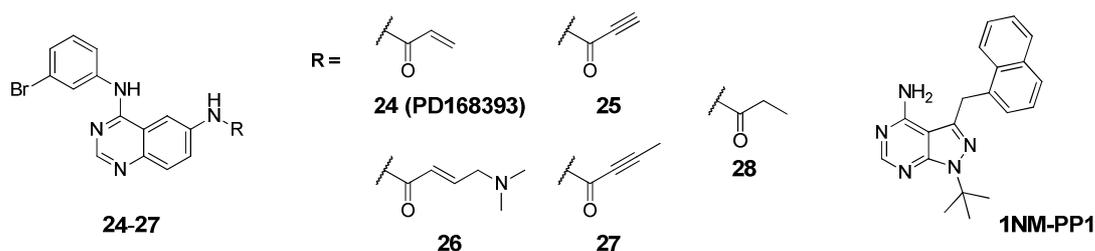
Inhibitoren

Zur Untersuchung der inhibitorischen Leistungsfähigkeit ausgewählter niedermolekularer Verbindungen wurde wie schon zuvor (vgl. Kapitel 3.2.4) der aktivitätsbasierte Assay KinEASE™ verwendet. Der Nachweis einer direkten Bindung der Elektrophil-tragenden Liganden an die systematisch modifizierten Ark1 Homologe erfolgte durch den in der AG Rauh entwickelten Bindungsassay zur Detektion direkter, kovalenter Bindungsbildung für Aminochinazoline.²⁹

4.2.1.1 Aktivitätsbasierte Assaysysteme

Um das initiale Design der Inhibitoren und Ark1-Konstrukte zur Verwendung eines *bump and hole* Ansatzes zu stützen und die Hypothese zur selektiven Adressierung der mutierten Variante zu belegen, wurden sowohl Ark1 wt, als auch die korrespondierende L166A- sowie E173C-mutierte Variante (Ark1-as3-cys) untersucht, und die Selektivität der Inhibitoren gegenüber der genetisch variierten Kinase herausgestellt. Außerdem wurde der Einfluss des Aktivators Pic1 auf die inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen analysiert.

Die Resultate zeigten, dass die eingesetzten 4-Anilinochinazoline **24-28** sowie der Referenzinhibitor 1NM-PP1^{119, 120} ausnahmslos einen vergleichsweise geringen bzw. keinen inhibitorischen Effekt gegenüber Ark1 (+Pic1) aufwiesen. Während für **27** und 1NM-PP1 keine IC₅₀-Werte bestimmt werden konnten, da selbst bei einer Konzentration von 50 µM keine Reduktion der Transferaseaktivität von Ark1 festgestellt werden konnte, ließen sich für **24**, **25** und **28** Werte im Bereich >20 µM und für **26** ca. 15 µM determinieren (vgl. Tabelle 4.2.1). Gleiches Szenario konnte bei der Charakterisierung der Verbindungen gegenüber Ark1 + Pic1 nachgestellt werden, wobei hier **27**, **28** und 1NM-PP1 keine Inhibition zeigten und **24-26** erneut annähernd im Bereich von 20 µM halbmaximaler Inhibition anzusiedeln waren. Somit wurde bestätigt, dass die rational ausgewählten Verbindungen keinen signifikanten Einfluss auf die wt Form von Ark1 ausüben und damit die Grundvoraussetzung zur spezifischen Adressierung der *bump and hole* modifizierten Kinase gegeben war. Gleichzeitig unterstützen diese Beobachtungen die postulierte These, nach der das Fehlen eines Affinitäts- und Selektivitätsfilters, in Form der Einführung eines artifiziellen Cysteins sowie die Mutation einer sterisch anspruchsvollen zu einer räumlich weniger ausgedehnten Türsteheramino-säure, die Bindung der vorliegenden Moleküle unterbindet.

Tabelle 4.2.1: IC₅₀-Werte der untersuchten Verbindungen.

	IC ₅₀ (μM)			
	Ark1	Ark1 + Pic1	Ark1-as3-cys	Ark1-as3-cys + Pic1
24	≥20.0 ^a	≥20.0 ^a	0.004 ± 0.003	0.002 ± 0.001
25	>20.0	>20.0	0.010 ± 0.008	0.001 ± 0.001
26	15.3 ± 1.15	>20.0	0.012 ± 0.008	0.009 ± 0.007
27	ni ^b	ni ^b	0.004 ± 0.003	0.006 ± 0.002
28	>20.0	ni ^b	0.272 ± 0.171	0.349 ± 0.147
1NM-PP1	ni ^b	ni ^b	0.006 ± 0.004	0.001 ± 0.001

^a Präzipitation der Verbindung bei Konzentrationen > 20 μM

^b ni = nicht inhibierend: kein inhibitorischer Effekt bei 50 μM Verbindungskonzentration

Die genetisch veränderte Variante Ark1-as3-cys allein, sowie in Kombination mit Pic1 konnte im Rahmen dieser *in vitro* Charakterisierung wirksam adressiert werden. Hinsichtlich der Gesamtheit der irreversibel modulierenden Spezies **24-27** sowie dem reversibel bindenden Referenzmolekül 1NM-PP1 wurden, unabhängig von der Anwesenheit des Aktivatoren Pic1, IC₅₀-Werte von 1-12 nM eruiert. Im Gegensatz dazu zeigte der reversible Vertreter **28** mit gesättigter terminaler Bindung in beiden Ansätzen eine deutlich geringere Potenz (IC₅₀ = 272-349 nM), ein Indiz dafür, dass die effiziente Inhibition nicht nur durch artifizielle Erweiterung der ATP-Bindetasche, sondern vielmehr durch eine kovalente Bindung zum Protein erfolgen kann. Darüber hinaus konnte die Implementierung eines Selektivitäts- und Affinitätsfilters im Zielprotein als essentielle Voraussetzung für die Protein-Ligand-Wechselwirkung mit vorliegenden Molekülen (**24-27**) bestätigt werden.

4.2.1.2 Bindungsassay zur Detektion kovalenter Ligandenbindung

Zur Validierung der Ausbildung kovalenter Bindung der unterschiedlich substituierten Liganden zu Ark1-as3-cys wurde ein orthogonaler, Fluoreszenz-basierter Bindungsassay eingesetzt. In diesem werden die intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften der Elektrophil-dekorierten 4-Aminochinazoline **24** und **26** ausgenutzt. Diese verändern sich im Fall direkter Interaktion unter Ausbildung einer σ -Bindung an das Zielprotein im Hinblick auf die Intensität der Emission.²⁹ Im Falle eines angeknüpften Michael-Systems findet ein photo-induzierter Elektronentransfer (PET) vom Fluorophorkern auf das elektronenarme, terminale System statt, sodass bei Exzitation eine geringe messbare Fluoreszenzintensität resultiert. Erfährt der Michael-Akzeptor terminal eine nukleophile Addition von Cys173 in Ark1-as3-cys, so resultiert die Konvertierung der entsprechenden Doppel- in eine Einfachbindung, wodurch ein PET aufgrund des gesättigten Systems nicht mehr erfolgen kann. Dadurch steigt die Quantenausbeute der intrinsischen Fluoreszenz des Chinazolinsystems signifikant an. In diesem Fall kann die damit einhergehende Erhöhung der Fluoreszenzintensität in einem Spektralbereich von 380-540 nm bei konstanter Exzitationswellenlänge (368 nm) detektiert und eine Bindungsbildung qualitativ nachgewiesen werden.

Im Rahmen von Bindungsstudien, durchgeführt in Küvetten (siehe Kapitel 9.2.3.2), wurden kovalente Modifikationen von Ark1-as3-cys, hervorgerufen durch Elektrophil-präsentierende Aminochinazoline, untersucht. Dabei konnte die resultierende σ -Bindung zum eingeführten Cys173 im Fall von **24** und **26** direkt nachgewiesen werden, da eine charakteristische Erhöhung der Intensität im zugehörigen Emissionsspektrum im Vergleich zur Kontrollmessung (**24** bzw. **26** in Puffer) festgestellt wurde (vgl. Abbildung 4.6A). Die final erreichten Niveaus der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) waren unterschiedlich, begründet durch den unterschiedlichen Charakter der verwendeten Elektrophile. Das reversible Gegenstück **28** zeigte eine marginale Zunahme der Fluoreszenzintensität, welche jedoch als bedeutungslos eingestuft werden konnte, da diese Änderung auf eine erhöhte Hintergrundemission zurückzuführen war, wie sie auch in nachfolgenden Experimenten in Mikrotiterplatten beobachtet wurde (vgl. Abbildung 4.8B). Eine Inkubation der Inhibitoren **24**, **26** und **28** mit Ark1 wt führte nicht zu einer Änderung des erhaltenen Spektrums und damit keiner kovalenten Modifikation des Proteins (Daten nicht gezeigt, vgl. analoge Experimente in Mikrotiterplatten, s.u.), sodass eine spezifische kovalente Interaktion von **24** und **26** mit der artifiziell entwickelten Mutante Ark1-as3-cys belegt werden konnte.

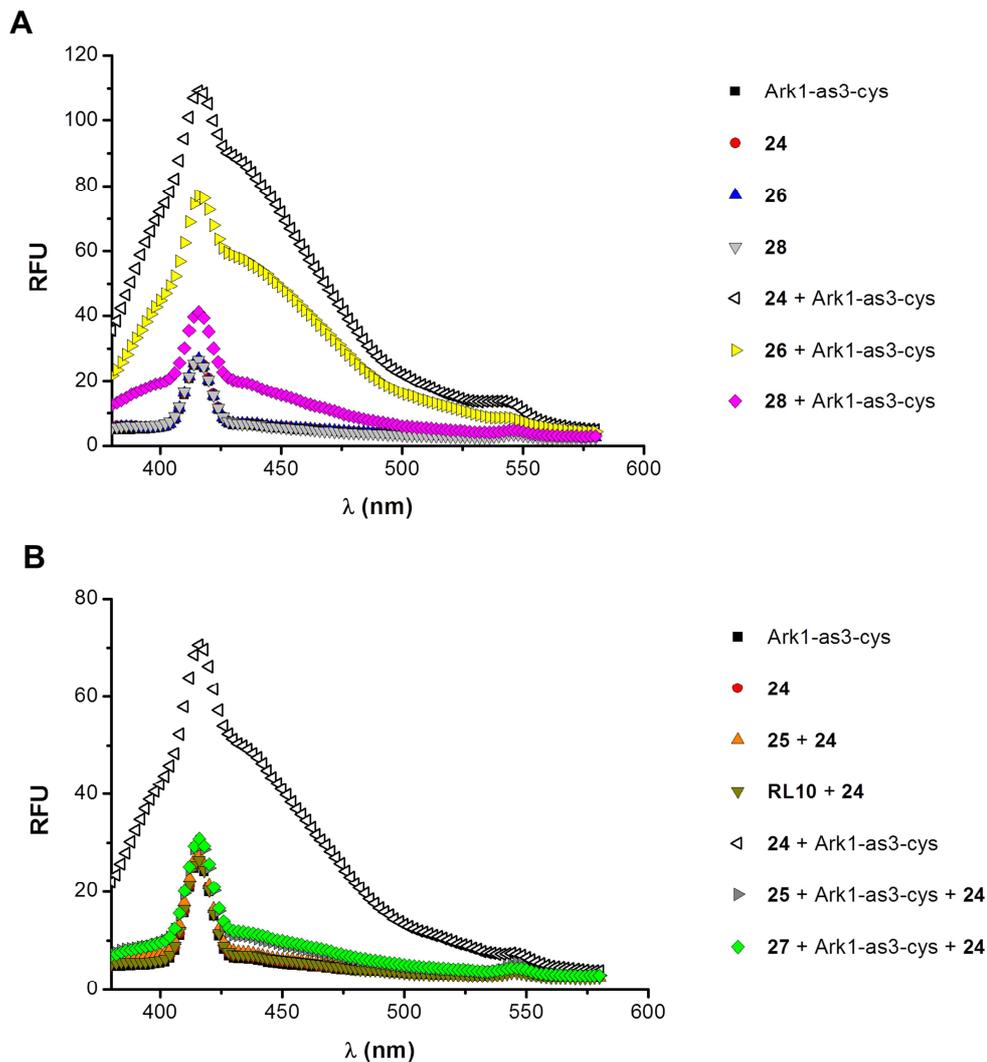


Abbildung 4.6: Analyse der Bindung von **24-27** sowie **28** an Ark1-as3-cys durch Messung der Fluoreszenzemission. **(A)** Emissionsspektren der Chinazolin-Grundgerüste **24** und **26**, gemessen bei 380-580 nm nach einer Inkubationszeit von 60 min. Die Intensität der Emission wurde lediglich im Falle der Ausbildung einer kovalenten Bindung des irreversiblen Inhibitors mit dem Cys-Ankerpunkt am Rande der ATP-Bindetasche signifikant erhöht. Für Verbindung **28** als reversibles Analogon zu **24** war die minimale Intensitätserhöhung im Emissionsspektrum nicht auf eine kovalente Bindungsbildung zurückzuführen, da diese Amplifikation ebenfalls für die Behandlung von Ark1 wt mit **28** beobachtet wurde (vgl. Abbildung 4.8). **(B)** Kovalente Bindungsknüpfungen konnten für **25** und **27** nicht direkt beobachtet werden, da diese Art der Verbindungen ihre Fluoreszenzeigenschaften bei Bindung zum Protein nicht ändern. Um zu überprüfen, ob diese Inhibitoren wie postuliert an Ark1-as3-cys binden, wurde die Kinase zunächst für 30 min mit **25** oder **27** präinkubiert und im Anschluss **24** zugegeben. Nach weiteren 60 min wurde die Änderung des Emissionsspektrums untersucht, mit dem Ergebnis, dass **24** allein zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt, während in Kombination mit **25** oder **27** keine signifikante Steigerung zu beobachten war. Diese Resultate bestätigen die Hypothese der kovalenten Bindung von **25** und **27** zu Ark1-as3-cys.

Tragen die irreversiblen Inhibitoren ein Elektrophil mit konjugierter Dreifachbindung (**25**, **27**), so kann die kovalente Knüpfung zum Zielprotein nicht direkt durch Änderung des Emissionsspektrums detektiert werden. Im Zuge einer nukleophilen Addition folgt im zugehörigen Produkt nicht die Entstehung eines α,β -gesättigten Systems, sondern der Verbleib einer Doppelbindung. Infolgedessen werden die Fluoreszenzeigenschaften der Verbindung

nicht verändert, da weiterhin ein photo-induzierter Elektronentransfer (PET) vom Fluorophor auf das elektronenarme Michael-Akzeptorsystem erfolgen kann (vgl. Abbildung 4.7). Demzufolge ließen sich zu den Negativ-Kontrollmessungen (Ark1) bzw. Ansätzen mit reversiblen Bindern identische Emissionsspektren ermitteln.

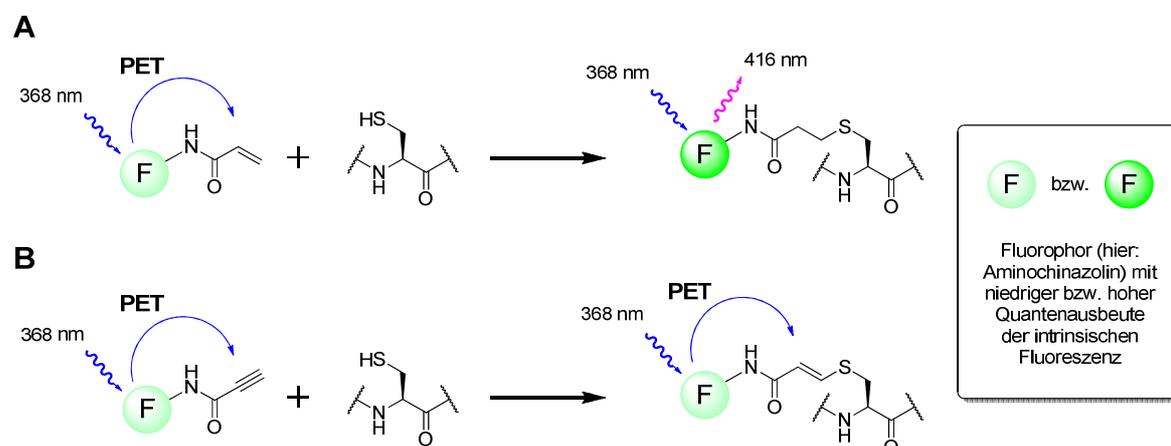


Abbildung 4.7: **A)** Aufgrund des für einen PET-Vorgang fehlenden elektronenarmen Systems wird die Fluoreszenzintensität im Zuge einer Michael-Addition durch Aufhebung des konjugierten Systems erhöht; **B)** Im Falle der Addition an Dreifachbindungen verbleibt eine konjugierte Doppelbindung am Protein-Ligand-Komplex und ermöglicht so weiterhin einen Elektronentransfer vom Fluorophor auf das elektronenarme System. Die Fluoreszenzeigenschaften des Liganden bleiben somit unverändert.

Zur Umgehung dieses Problems und zum Nachweis kovalenter Bindung von **25** bzw. **27** an Ark1-as3-cys wurde daher die Interaktion indirekt mittels eines Verdrängungsassays nachgewiesen. Folglich wurden die zu untersuchenden Proteine zunächst mit **25** oder **27** für 30 min präinkubiert und dem Ansatz im Anschluss daran Verbindung **24** hinzugegeben, die bei individueller Applikation eine signifikante Intensitätserhöhung des Emissionsspektrums auslöst. Jedoch war auch nach weiterer Inkubation mit **24** (bis zu 60 min) keine Änderung zu beobachten und somit bestätigt, dass **25** und **27** nicht verdrängt werden konnten, da die ATP-Tasche durch diese bereits irreversibel belegt war (vgl. Abbildung 4.6B).

In einer weiteren Betrachtung wurde die Kinetik der kovalenten Bindung an Ark1-as3-cys in Mikrotiterplatten, durch zeitabhängige Determinierung der Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 420 nm, evaluiert (vgl. Abbildung 4.8A). Diese Echtzeit-Kinetikexperimente konnten in Ermangelung der Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von **25** und **27**, wie oben beschrieben, lediglich mit den α,β -ungesättigten Strukturen **24** und **26** realisiert werden, und zeigten eine rasche Addition des Cysteins an die Doppelbindung. Ein nahezu vollständiger Umsatz ($\geq 95\%$) zum Protein-Ligand-Addukt war bereits nach 120 sec

(**24**) bzw. 360 sec (**26**) erreicht, sodass der Startpunkt der Reaktion aufgrund des apparativen Messaufbaus nicht erfasst und folglich auch die Berechnung von $t_{1/2}$ nicht quantitativ vorgenommen werden konnte.

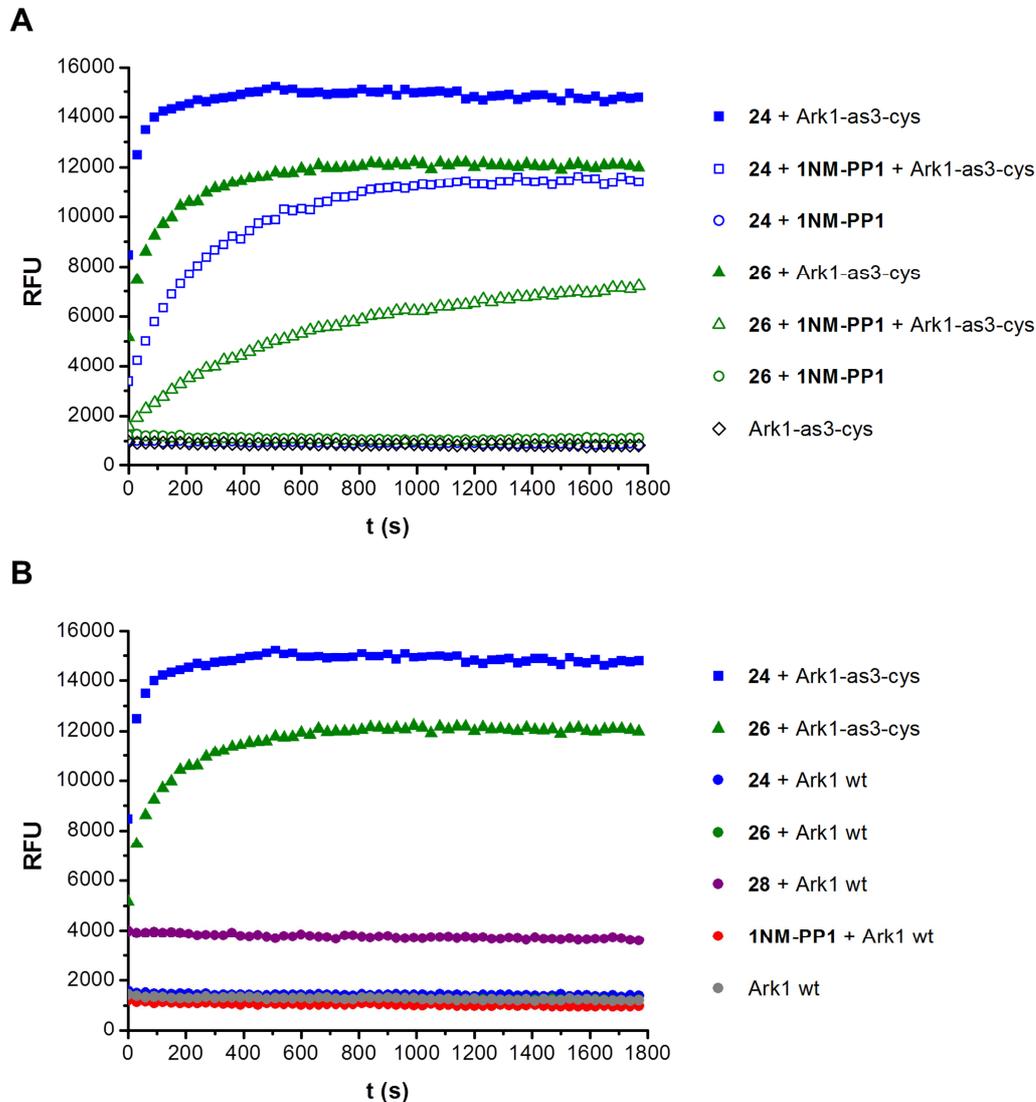


Abbildung 4.8: A) Zeitabhängige Beobachtung der Fluoreszenzemission bei 420 nm zur Echtzeit-Kinetikanalyse der irreversiblen Inhibition von Ark1-as3-cys durch **24** und **26**. Aufgrund der Tatsache, dass die Bindungsbildung zu rasch verlief, wurden Konkurrenzexperimente mit 1NM-PP1 durchgeführt, um die initiale Reaktionsrate zu verlangsamen. B) Unspezifische Markierung von Ark1 durch **24** und **26** wurde mithilfe der Observation direkter Bindungsbildung in Echtzeit über einen Zeitraum von 30 min eruiert. Die Detektion der Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Cys-Sulphydryl von Ark1-as3-cys als Referenz erfolgte über die Observierung des Anstiegs der Fluoreszenzemission bei 420 nm. Eine Zugabe von **24**, **26**, **28** oder 1NM-PP1 zu Ark1 wt resultierte nicht in einer zeitabhängigen Fluoreszenzänderung, was die Schlussfolgerung bekräftigt, dass diese Verbindungen nicht unspezifisch mit Lösungsmittel exponierten Cysteinresten reagieren.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse war die Präinkubation mit dem reversiblen Inhibitor 1NM-PP1 (0.5 μ M, 30 min) in einer Verdrängungsstudie ein probates Mittel, um die initiale Reaktionsgeschwindigkeit in ausreichendem Umfang zu verlangsamen und die Bindungskinetik adäquat nachzuverfolgen. In Korrelation zur Inkubation von Ark1-as3-cys mit **24** bzw. **26** wurde die Geschwindigkeit der Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Protein im kombinierten Ansatz deutlich reduziert. Daraus können ebenfalls fundierte Erkenntnisse zur Kompetition des irreversibel modulierenden Moleküls im Vergleich zum reversiblen Binder abgeleitet werden. Nach initialer Konkurrenzreaktion der beiden Moleküle um die Belegung der Bindungstasche kann zunächst ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Interaktionspartnern und untersuchtem Protein eingestellt werden. Anschließend wird sukzessive ein Addukt aus irreversibel gebundenem Liganden und Protein gebildet und auf diese Art und Weise das untersuchte Ark1-as3-cys unwiederbringlich aus dem Gleichgewicht entfernt, einhergehend mit einem nicht umkehrbarem Anstieg der Fluoreszenzintensität.

Zusätzlich zu diesen Befunden wiesen Emissionsspektren bei Inkubation von Ark1 wt mit den irreversiblen Inhibitoren **24** und **26** analog der Kontrollexperimente mit dem reversiblen Gegenstück **28** respektive 1NM-PP1 keine Fluoreszenzänderung auf, womit der Beweis erbracht war, dass die verwendeten Moleküle keine unspezifische Markierung von nativen Cysteinen des Wildtyps hervorrufen. Die geringfügig gesteigerte Intensität für **28** ist wie eingangs schon erwähnt nicht auf eine kovalente Bindung zurückzuführen, sondern vielmehr auf intrinsische Fluoreszenz des Liganden.

4.2.2 Weiterführende Studien an Ark1^{ix}

Aufbauende Analysen des Einflusses auf zelluläre Systeme konnten bestätigen, dass die vorliegenden Inhibitoren in der Tat dazu verwendbar waren, in einem *in vivo* Ansatz mit nativem Ark1 aber auch unter funktionalem Austausch durch die Mutanten Ark1-as3 (nur Türstehermutation L166A), Ark1-cys (nur Cys-Mutation E173C) und Ark1-as3-cys (L166A und E173C), selektiv die gewünschte Doppelmutante ohne toxische Nebeneffekte zu adressieren und so das Verständnis der biologischen Funktion zu fördern. Die designten Inhibitoren zeigten keine signifikanten antiproliferativen Effekte auf Ark1 wt exprimierende Hefen, als auch auf die korrelierenden Mutanten Ark1-cys und Ark1-as3 mit lediglich einer abgeänderten Eigenschaft (Affinitäts- bzw. Selektivitätsdeterminante). Dieses Verhalten

^{ix} Weiterführende Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe um Dr. Silke Hauf im Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen durchgeführt.

bestätigte wiederum die essentielle Notwendigkeit beider Filter (Selektivität, Affinität) für die effiziente Adressierung der artifiziellen Kinase. Dieses Verhalten wurde sowohl in biochemischen, aktivitätsbasierten Studien isolierter rekombinanter Proteine, als auch in zellulären Ansätzen mittels Flusszytometrie beobachtet. Beispielsweise konnte bei Applikation der Inhibitoren (24-27) ein signifikanter Rückgang an vitalen Hefezellen, die Ark1-as3-cys stabil exprimierten, verzeichnet werden.

Für weiterführende Informationen vergleiche Koch *et al.* 2012.¹¹⁸

4.2.3 Identifikation neuartiger Modulatoren für Aurora A

In Anlehnung an die Herangehensweise zur selektiven Adressierung bzw. Markierung einer Analog-sensitiven Ark1-Mutante aus *S. pombe* und Entwicklung funktionaler Sonden sollten nun die homologen humanen Kinasen in den Fokus weiterer Screeningprojekte rücken. Im Rahmen dieser Arbeit war Aurora A die Isoform der Wahl für weitere Untersuchungen, da Fehlregulationen dieses therapeutisch relevanten Zielenzym mit einer Indikation in Brust-, Pankreas-, Ovarial-, Magen-, Kolorektal- sowie Blasenkrebs einhergehen.¹²¹⁻¹²⁶ Einige der bisher identifizierten und rational entwickelten bzw. optimierten Pan-Aurora Inhibitoren, wie beispielsweise Tozasertib^{40, 127} konnten nicht bis zur klinischen Reife verfolgt werden, da schwerwiegende kardiale Nebeneffekte festgestellt wurden. Andere wie Danusertib^{128, 129} schließen einen potentiellen Nutzen als Therapeutikum nicht aus und befinden sich derzeit in Phase II klinischen Studien, um die Zulassung durch die FDA zu erreichen.^{41, 59} Aktuell werden ebenfalls innerhalb der Aurora-Familie selektivere Inhibitoren wie ENMD-2076^{130, 131} und MK-5108¹³² gegen Aurora A zur Etablierung in der klinischen Anwendung erprobt und erzielen vielversprechende Ergebnisse, unter anderem im Bereich der Behandlung von Ovarialkrebs und akuter myeloischer Leukämie bzw. solider Tumoren.

Die Identifikation neuer und selektiver Binder von Aurora A und weitere Optimierung zur Steigerung der inhibitorischen Potenz oder Entwicklung chemischer Sonden eröffnet die Möglichkeit tiefergehender Untersuchungen des im Falle von Krebserkrankungen fehlregulierten Aurora-Signalnetzwerks. Diese selektiven, pharmakologisch aktiven Verbindungen stellen wertvolle Werkzeuge im Bereich der aktivitätsbasierenden Proteinprofilierung dar. Ziel dieser Vorgehensweisen ist es, komplexe Signalkaskaden, besonders in Kombination mit fehlregulierter Überexpression distinkter Kinasen wie Aurora A, zu charakterisieren und einen Einblick in die vorherrschenden metabolischen und signalvermittelnden Prozesse zu erhalten.¹³³

Im ersten Schritt wurde die Durchmusterung einer Substanzbibliothek kommerziell erhältlicher Verbindungen beschränkt, um neuartige, d.h. patentrechtlich und in der wissenschaftlichen Literatur nicht in Bezug auf Aurora A beschriebene, Binder zu identifizieren. Mithilfe des in der AG Rauh entwickelten Bindungsassays FLiK¹³⁴ wurde eine Substanzbibliothek bekannter Grundgerüste zur Inhibition von Kinasen bestehend aus 968 Verbindungen („Vichem“-Bibliothek) in Bezug auf Aurora A wt durchgemustert.^x Das Grundprinzip dieser Untersuchung liegt in der Markierung der flexiblen Aktivierungsschleife von Aurora A mit dem umgebungssensitiven Fluorophor Acrylodan, welcher sein intrinsisches Fluoreszenzverhalten in Korrelation zur Lösungsumgebung ändert. Bei Bindung eines ATP-kompetitiven Inhibitors an die Kinase vollzieht die markierte Schleife eine signifikante Konformationsänderung, die durch Messung der Fluoreszenzänderung detektiert und so auf die Bindung der untersuchten Verbindung rückgeschlossen wird.

Im Verlauf der Studie konnten 103 Verbindungen identifiziert werden, deren relative Bindung zum Target im Bereich der Positivkontrolle ZM447439¹³⁵ ($100\% \pm 20\%$) lag. Die Trefferrate an potenten Molekülen lag damit bei ca. 11% der ursprünglich getesteten Verbindungen, jedoch wurden lediglich neun übergeordnete Gruppen unterschiedlicher Grundgerüste mehrfach repräsentiert (mindestens zwei Treffer pro Grundgerüst, Abbildung 4.9).

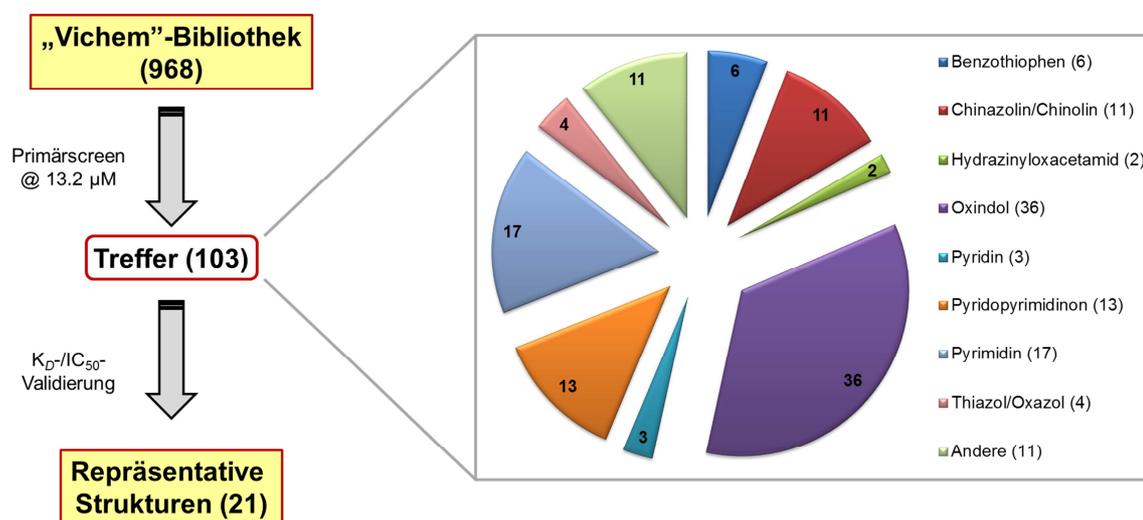


Abbildung 4.9: Allgemeine Übersicht über den Screening- und Validierungsprozess, sowie die generelle Zusammensetzung der Hitstrukturen hinsichtlich ihrer chemischen Identität und Similarität der Grundgerüste.

^x Das Assaysystem/-prinzip wurde von Dr. Jeffrey R. Simard entwickelt, welcher auch die initiale Durchmusterung der Substanzbibliothek gegen Acrylodan-markiertes Aurora wt durchführte.

Unter den Trefferverbindungen fanden sich viele bekannte, unterschiedlich substituierte Grundgerüste, die größtenteils für die Inhibition von Kinasen, in Teilen auch für die Adressierung von Aurora A bekannt waren (vgl. Abbildung 4.10).

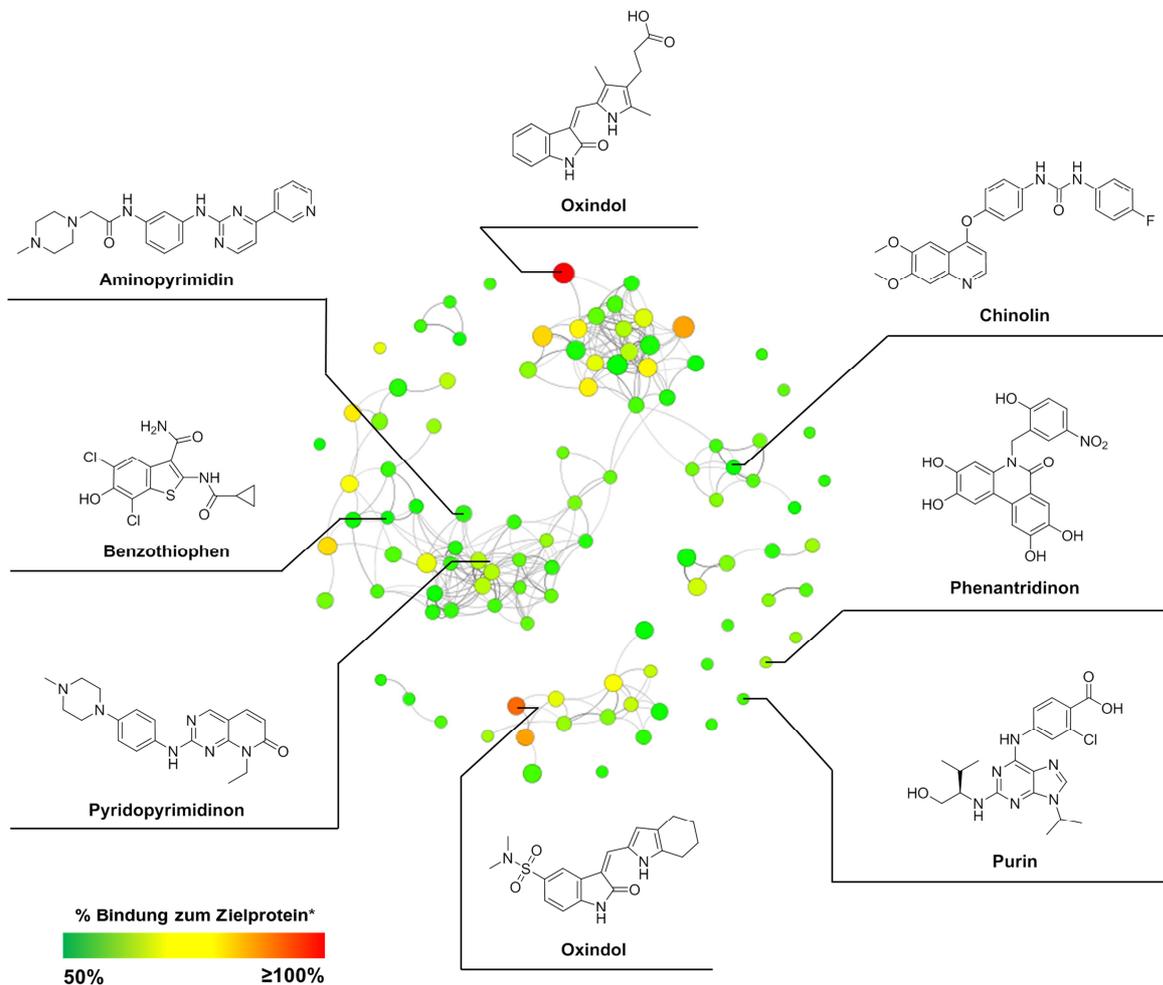
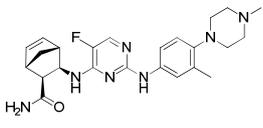
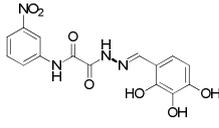
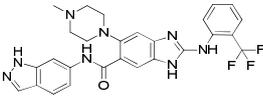
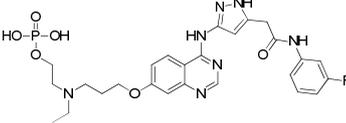
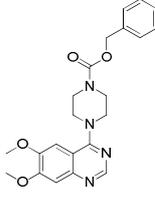
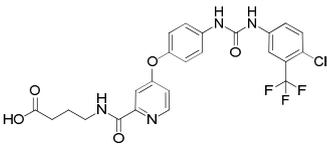
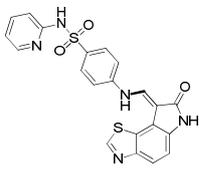
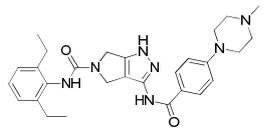
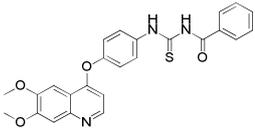
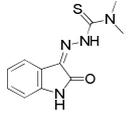
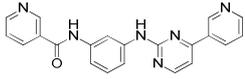
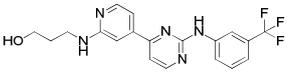
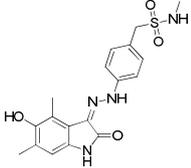
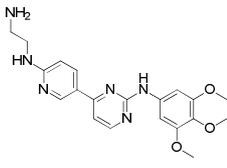
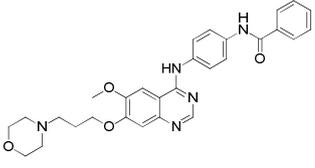
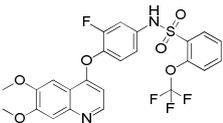


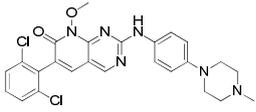
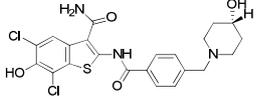
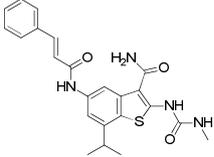
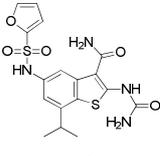
Abbildung 4.10: Clustering der Hitstrukturen nach chemischer Ähnlichkeit mit dem frei verfügbaren Programm SARANEA.¹³⁶ Die Farbe der Kreise illustriert die relative Bindung im Vergleich zur Referenzstruktur ZM447439 die Größe der Kreise determiniert für die Diskontinuität der SAR strukturell eng verwandter Verbindungen (marginale strukturelle Veränderungen bedingen signifikante Änderungen der Aktivität).
*bezogen auf die Referenzstruktur ZM447439 bei einer Konzentration von 13.2 μM (100%).

Aus dem Portfolio der identifizierten Binder wurde eine Auswahl von 21 strukturell attraktiven sowie repräsentativen Molekülen zur Validierung selektiert (vgl. Tabelle 4.2.2). Dabei wurden die übergeordneten Gerüststrukturen der Oxindole, Pyrimidine, Chinazoline, Benzothiophene und Hydrazinyloxacetamide abgedeckt, sowie ein Dihydropyrrolopyrazol, Triazol und Benzimidazol aus der Gruppe „Andere“ der vereinzelt auftretenden Trefferstrukturen in die Reihe der zu validierenden Strukturen aufgenommen und deren K_D - sowie IC_{50} -Werte determiniert (Bindungsassay: FLiK, aktivitätsbasierter Assay: KinEASE™).

Tabelle 4.2.2: Validierte Strukturen aus der initialen Durchmusterung einer Substanzbibliothek bekannter Kinaseinhibitoren. Die K_D -Werte wurden mit Hilfe der FLiK-Technologie¹³⁴ und Acrylodan-markierter Aurora A, die IC_{50} -Werte per KinEASE™ ermittelt.

Struktur	Gerüst	K_D (μM) ^a	IC_{50} (μM) ^b
 <p>29</p>	Pyrimidin	<0.01	0.002 ± 0.001
 <p>30</p>	Hydrazinyl-oxacetamid	1.0-2.0	0.863 ± 0.317
 <p>31</p>	Indazol/ Benzimidazol	0.2-0.3	0.002 ± 0.001
 <p>32</p>	Chinazolin	0.05-0.1	0.023 ± 0.010
 <p>33</p>	Chinazolin	>10	ni ^c
 <p>34</p>	Pyridin	5.0-10	1.03 ± 0.50
 <p>35</p>	Oxindol	5.0-10	0.076 ± 0.010
 <p>36</p>	Dihydro- pyrrolopyrazol	0.02-0.1	0.019 ± 0.014

 <p>37</p>	Chinolin	5.0-10	0.534 ± 0.350
 <p>38</p>	Oxindol	1.0-3.0	ni ^c
 <p>39</p>	Pyrimidin	5.0-20	4.12 ± 0.14
 <p>40</p>	Pyrimidin	5.0-20	0.028 ± 0.026
 <p>41</p>	Oxindol	5.0-20	≥ 20.0
 <p>42</p>	Pyrimidin	0.1-0.2	0.076 ± 0.013
 <p>43 (ZM447439)</p>	Chinazolin	0.2-1	0.302 ± 0.072
 <p>44</p>	Triazol	0.005-0.05	0.002 ± 0.001
 <p>45</p>	Chinolin	0.5-1	0.353 ± 0.114

 <p style="text-align: center;">46</p>	Pyridopyrimidinon	5.0-10	2.65 ± 0.47
 <p style="text-align: center;">47</p>	Benzothiophen	0.5-2	0.143 ± 0.078
 <p style="text-align: center;">48</p>	Benzothiophen	0.3-0.6	0.141 ± 0.116
 <p style="text-align: center;">49</p>	Benzothiophen	0.1-0.2	0.003 ± 0.001

^a Einfachbestimmung einer Substanzverdünnungsreihe in Triplikaten

^b Durchführung von drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten

^c ni = nicht inhibierend bei 20 µM Testsubstanzkonzentration

Durch die Initiative konnten mehrere Verbindungen mit IC₅₀-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich gefunden werden. Dazu gehörten hochpotente Verbindungen wie **29**, **31**, **44** (je 2 nM) und **49** (3 nM) und solche, die ebenfalls eine signifikante Aktivität aufwiesen, wie **32** (23 nM), **35** (76 nM), **36** (19 nM), **40** (28 nM) und **42** (76 nM). Mit diesen Vertretern konnten aus vier der übergeordneten Strukturfamilien, nämlich der Pyrimidine (**29**, **40**, **42**), Oxindole (**35**), Chinazoline (**32**) sowie Benzothiophene (**49**), repräsentative Substanzen identifiziert werden, die eine herausragende Potenz aufwiesen. Zudem waren durch das Triazol **44**, das Dihydropyrrolopyrazol **36** sowie das Indazol **31** auch drei im Primärscreen lediglich einzeln vertretene Verbindungen mit hervorragenden inhibitorischen Eigenschaften vorhanden. Letztere Verbindungen stellen dabei jedoch ausnahmslos Repräsentanten dar, die in der Literatur bereits näher für eine Verwendung im Zusammenhang mit Aurora A oder anderen Kinasen beschrieben sind. So zeigt sich in **36** ein bekannter Aurora Inhibitor (PHA-680632),¹³⁷ und auch für **44** (JNJ-7706621)^{138, 139} waren mit CDK und Aurora gleich zwei direkte Targets bekannt. Diese Tatsache disqualifizierte die betreffenden Inhibitoren von einer weiteren Verwendung für Optimierungsstudien, da lediglich nicht beschriebene Moleküle für Aurora erwünscht waren. Ebenso beinhaltet Indazol **31** ein bekanntes Grundgerüst für Kinaseinhibition (Indazol, Benzimidazol), und es existiert bereits ein Patent für das hier vorliegende Substitutionsmuster und angelehnte Derivate, jedoch wurden keine

biologischen Studien mit exakt dieser Struktur durchgeführt.¹⁴⁰ Auch zu den Vertretern der übergeordneten Strukturklassen, wie der erhaltenen hochpotenten Pyrimidine (**29**, **40**, **42**), Oxindole (**35**) und Chinazoline (**32**), sind zahlreiche Patente und Studien bekannt, was eine weitere Verwendung der Treffer diffizil gestaltet.¹⁴¹⁻¹⁴³ Einzig das Benzothiophen (**49**) ist zwar ein bekanntes strukturelles Motiv, jedoch in der Literatur und patentrechtlich noch nicht in Erscheinung getreten, und so ein idealer Kandidat für die Erschließung neuer struktureller Grundgerüste als Basis für die Entwicklung von Aurora A Inhibitoren. Lediglich ein Patent für die Anwendung in Bezug auf die zur Synthese und Degradation von β -D-Fructose-2,6-bisphosphat verantwortliche Transferase PFKFB3¹⁴⁴ ist bekannt, in welchem dieses Benzothiophen als Grundstruktur beschrieben wird, allerdings mit völlig unterschiedlichen Substitutionsmustern.¹⁴⁵ Ebenso konnte für die ebenfalls validierten, zu **49** strukturell verwandten, Moleküle **47** und **48** (IC_{50} = 143 nM bzw. 141 nM) lediglich ein Patent mit entfernt verwandten Strukturen gefunden werden.¹⁴⁶ Die drei Vertreter wiesen eine distinkte SAR auf, denn wird das Motiv an 5-Position des Benzothiophens vom Furan-2-sulfonamid (**49**) zum Cinnamamid (**48**) überführt, so lässt sich eine massive Erhöhung (47-fach) des IC_{50} -Wertes von 3 nM auf 141 nM beobachten. Auch bei dem an 5,6,7-Position Halo- und Hydroxy-substituierten Molekül (**47**), einhergehend mit einer weiteren sterisch anspruchsvollen Substitution an 2-Position, lässt sich mit 143 nM ein Anstieg in der gleichen Größenordnung detektieren. Unter den übrigen als inhibitorisch aktiv validierten Strukturen der Auswahl waren Chinazoline (**43**, IC_{50} = 302 nM, Positivkontrolle), Pyridine (**34**, 1.03 μ M), Pyrimidine (**39** und **40**, 4.12 μ M bzw. 0.028 μ M), Chinoline (**45**, 353 nM) und ein Pyridopyrimidinon (**46**, 2.65 μ M), welche aber für die Inhibition von Kinasen in zahlreichen Quellen im Zusammenhang mit Aurora, VEGFR, PDGFR, EGFR, CDK, Axl, Raf sowie cSrc und Abl beschrieben sind.^{135, 147-150} Darüber hinaus konnten die Oxindole **41** und **38** sowie das Chinazolin **33** nicht als potente Inhibitoren von Aurora A bestätigt werden.

Für weitere medizinalchemische Ansätze und Charakterisierungen der oben aufgeführten Substanzklassen können die identifizierten Grundgerüste als Basis dienen, um einhergehend mit der biochemischen Validierung der übrigen Vertreter aus der entsprechenden Gruppe, welche im initialen Screening gefunden wurden, distinkte SARs herauszuarbeiten. Zusammenfassend ist dabei festzustellen, dass aus der Zusammenstellung an validierten Inhibitoren lediglich zwei vielversprechende Gerüststrukturen (Hydrazinyloxacetamid **30** (IC_{50} = 0.863 μ M), Benzothiophen **49**) für die weitere Optimierung geeignet schienen. Die Vorteile dieser Verbindungen liegen neben der eruierten inhibitorischen Potenz eindeutig in ihrer Seltenheit innerhalb des „Forschungsfelds Kinasen“ und liefern so das Potential durch weitere Optimierungen aussichtsreiche Verbindungen zur Anwendung in chemisch-genetischen Studien darzustellen. Für das Hydrazinyloxacetamid **30** existieren zwar

literaturbekannte, analoge Strukturen, jedoch mit 3,4-Hydroxy- anstelle des hier identifizierten 2,3,4-Hydroxy-substituiertem Aromaten. Diese aber tauchen allein in einem Patent im Zusammenhang mit PDGFR-Inhibition (ohne biochemische Charakterisierungen) als auch einer Veröffentlichung über NADPH-Oxidase-Inhibitoren auf,^{151, 152} und zeigen dort, zumindest im zellulären Experiment, eine NOX4-Inhibition im niedrigen mikromolaren Bereich ($IC_{50} \approx 1 \mu M$). Entsprechendes gilt für die untersuchten Benzothiophene (**47-49**), welche einerseits die Voraussetzung potenter Aurora A Inhibition erfüllen und somit ideale Qualifikanten für weitere Ansätze des rationalen oder strukturbasierten Designs und Generierung chemischer Sonden darstellen und darüber hinaus patentrechtlich sowie literaturwissenschaftlich nicht für Kinasen beschrieben sind.

Im Nachgang zur durchgeführten Durchmusterungsstudie wurde auf eine weiter ausgedehnte Untersuchung der identifizierten Moleküle aus Zeitgründen verzichtet.

4.3 TBK1 – biologische Funktion in Signalkaskaden

Neben den Kinasen der Aurora-Familie stellen auch andere Ser-/Thr-Kinasen, die bis dato wenig evaluiert sind, attraktive Ziele für chemisch-genetische Ansätze dar. Die IKK-ähnlichen Transferasen TBK1 (auch: NAK, T2K) und IKK ϵ sind beispielsweise zentrale Regulatoren der Typ-I Interferonproduktion und damit der angeborenen antiviralen Immunantwort, deren Auslösung essentiell von der raschen Bereitstellung von Interferonen (IFN) aber auch anderen proinflammatorischen Cytokinen abhängt.^{52, 153} Die Aktivierung von TBK1 durch virale Infektion im endosomal vermittelten Signalweg verläuft zunächst über die Erkennung viraler Nukleinsäuren im Endosom durch *Toll-like* Rezeptoren (hier: TLR3). Anschließend wird das Signal über das TBK1-bindende Adapterprotein TRIF weitergegeben und endet schließlich in der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7, die ihrerseits eine Translokation in den Zellkern vollziehen und dort als Homo- oder Heterodimere nach Assoziation an spezifische DNA-Bereiche die Transkription der IFN-Gene induzieren.^{52, 154, 155} Im cytosolischen Weg hingegen erfolgt eingangs eine Erkennung der eingeschleusten viralen RNA durch MDA5 oder RIG-I (ATP-abhängige RNA-Helicase), welche ihrerseits, über das mitochondrial assoziiertes Adapterprotein IPS-I, eine Adapterprotein-vermittelte TBK1-Aktivierung hervorrufen. Auch hier wird die IFN-Genexpression durch IRF-3/7-Phosphorylierung herbeigeführt (Abbildung 4.11).^{153, 156-159} Die direkten Substrate von TBK1, nämlich IRF3 und IRF7, sind wissenschaftlich belegt, jedoch ist nicht bekannt über welche internen Mechanismen die TBK1-Aktivität reguliert wird und inwieweit weitere direkte Interaktionspartner bzw. Substrate existieren.¹⁶⁰ Ursprünglich war TBK1 auch als Aktivator des NF- κ B-Signalwegs propagiert worden, welcher in der Regel durch die Phosphorylierung von I κ B (über den vorgeschalteten IKK α / β / γ -Komplex) und infolge dessen proteasomaler Degradation induziert wird, doch das Target zur Aktivierung dieses Wegs durch TBK1 war unbekannt.¹⁶¹⁻¹⁶³ Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass keine Aktivierung dieses Signalwegs vorliegt, sondern ausschließlich eine Rolle in der IRF-Signalkaskade (Phosphorylierung von IRF-3/7) eingenommen wird,^{52, 154, 164} aber auch gegenteilige Ergebnisse, die die ursprüngliche Hypothese der direkten NF- κ B Aktivierung stützen, existieren.¹⁶⁵

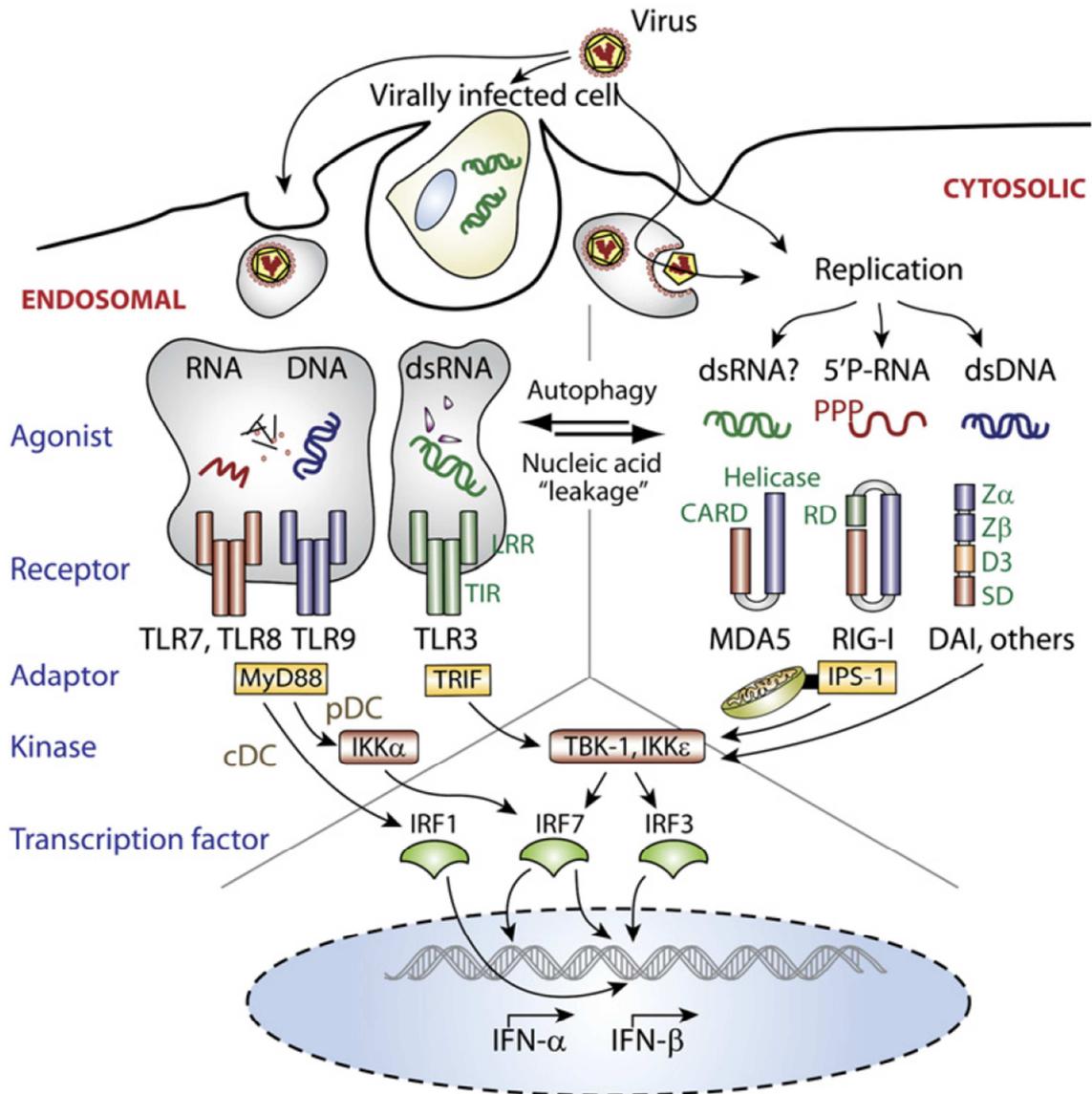


Abbildung 4.11: Im Jahre 2007 propagiertes Modell der Signalkaskade von TBK1 bzw. der aktivierten Maschinerie zur angeborenen Immunantwort auf virale Infektionen.¹⁵³

Ebenso war bislang die Rolle der Adapterproteine NAP1, TANK und SINTBAD völlig unklar, doch aktuelle Netzwerkuntersuchungen auf der Grundlage der Tandem-Affinitätsreinigung¹⁶⁶ gekoppelt mit massenspektrometrischen Analysen zeigen, dass TBK1 nicht wie ursprünglich vermutet einen einzigen Multienzymkomplex mit allen Adapterproteinen bildet, sondern isolierte Komplexe mit jeweils nur einem der Interaktionspartner formt, die ihrerseits wiederum weitere Proteine binden (vgl. Abbildung 4.12).⁵² Für diese Wechselbeziehungen steht in TBK1 strukturell betrachtet lediglich eine einzige Adapterbindungsstelle zur Verfügung, um welche die unterschiedlichen Konnektoren konkurrieren. Da letztere zellulär unterschiedliche Lokalisierungen aufweisen und auch eine unterschiedliche Affinität zu TBK1 besitzen, wird spekuliert, dass diese als Rekrutierungsproteine fungieren und

TBK1 somit je nach gebundenem Interaktionspartner in unterschiedlichen Signalwegen unterschiedliche Aufgaben einnehmen kann, wobei die spezifischen Funktionen durch die Lokalisation und somit Art des Bindungspartners vermittelt werden (vgl. Abbildung 4.12). Die Bindung der Adapterproteine scheint nicht obligat für die Transferaseaktivität, aber essentiell für eine vorgeschaltete Aktivierung zu sein.^{52, 167}

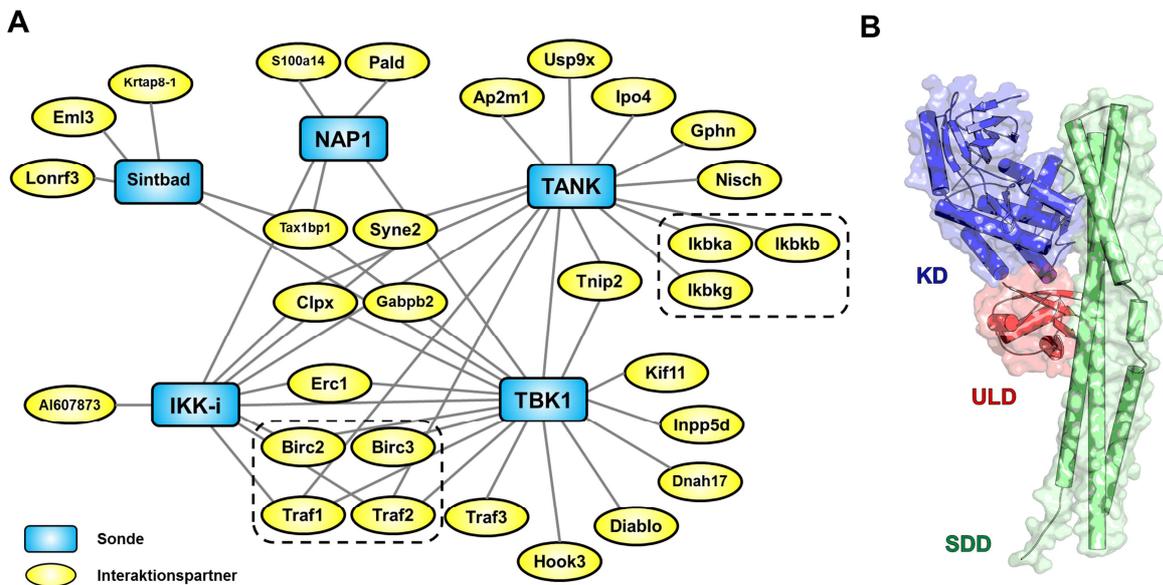


Abbildung 4.12: A) Interaktionspartner von TBK1, eruiert durch Tandem-Affinitätsreinigung gekoppelt mit massenspektrometrischen Analysen der isolierten Komplexe,⁵² B) Globale Organisation der Domänenstruktur von TBK1 mit vorhandener Kinasedomäne (KD), Ubiquitin-artigen Domäne (ULD) sowie der gerüstgebenden und Dimerisierungsdomäne (SDD), die ursprünglich durch Sequenzvergleiche mit IKK β identifiziert und 2013 mit Hilfe röntgenkristallographischer Studien als gerüstgebendes Element bestätigt wurde.^{158, 168, 169}

Obwohl die Schlüsselreize zur TBK1 Regulation und Substraterkennung weiterhin unbekannt sind, zeigen erste strukturbiochemische Untersuchungen durch Ma *et al.*, dass möglicherweise spezifische Bereiche, wie die Ubiquitin-artige Domäne und die gerüstgebende Dimerisierungsdomäne (ULD bzw. SDD), die Kolokalisation von Transferase und Substrat steuern. Weiterhin stützt die Existenz dieser Domänen die Hypothese, dass TBK1 als Homodimer interagiert.^{52, 158, 170} Diese Annahme wurde 2013 durch Röntgenbeugungsexperimente, sowie biochemische Studien bestätigt.^{168, 169} Anhand der Kristallstrukturen kann möglicherweise durch das Design selektiver Inhibitoren die Komplexität des Netzwerks in naher Zukunft entschlüsselt werden.

Darüber hinaus existieren bereits Arbeiten, die eine Rolle von TBK1 in Signalwegen postulieren, die einen Einfluss auf die Zelltransformation und Tumorprogression besitzen. Genetische *knock down* Studien aus 2009 belegen die Relevanz von TBK1 als potentielles Onkogen, welches essentiell für das Überleben *KRAS*-mutierter bzw. -gesteuerter Krebszellen ist, beispielsweise in Adenokarzinomen der Lunge (z.B. NSCLC).⁵¹ Seitdem rückte diese Kinase vermehrt in den Fokus der Wissenschaft, und es wurden vermehrt Bemühungen unternommen, um den komplexen Signalweg und die Regulation bzw. Aktivierung von TBK1 zu entschlüsseln.^{51, 171-173} Die biologische Funktion und Rolle, speziell innerhalb des spezifischen Abhängigkeitsverhältnisses in *KRAS*-mutierten Zellen, ist ebenso wie das assoziierte komplexe Netzwerk der Interaktion, Aktivierung und Regulation bislang nicht vollständig geklärt. Daher braucht es chemisch-genetische Ansätze, um einerseits mit niedermolekularen, selektiven Inhibitoren, in einem dem genetischen *knock out* orthogonalen System die Kinaseaktivität von TBK1 als onkogen zu bestätigen und andererseits die spezifischen Interaktionspartner zu identifizieren. Kleine organische Moleküle können dabei als potentielle Sonden dienen, die die Zielkinase kovalent modifizieren. Bislang sind einige wenige Grundgerüste zur Inhibition von TBK1 bekannt, welche reversible Bindungsmodi aufweisen. Das Pyrimidin BX795 stellt beispielsweise einen hochaffinen Liganden dar und wurde bereits als Grundlage für weitere Optimierungen verwendet. Allerdings zeigt es ebenfalls eine signifikante Aktivität gegenüber PDK1 und lässt somit einen suboptimalen Nutzen als selektive chemische Sonde vermuten (Abbildung 4.13).^{87, 174}

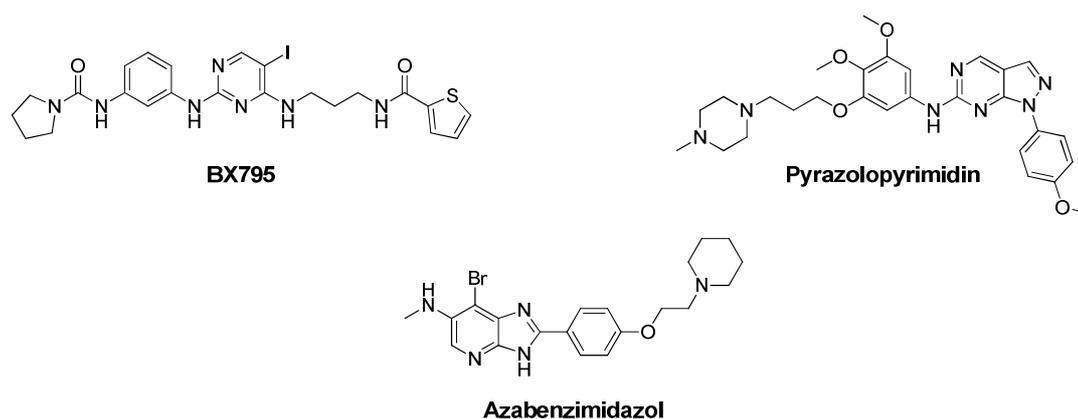


Abbildung 4.13: Bislang bekannte TBK1-Inhibitoren: BX795 als erster bekannter Inhibitor mit gleichzeitiger PDK1-Aktivität^{87, 175, 176} sowie ein selektives 6-Aminopyrazolopyrimidin¹⁵⁷ und ein Azabenzimidazol¹⁷⁷ als repräsentative Verbindung einer neuen Klasse an TBK1-Inhibitoren.

Ou *et al.* manifestierten kürzlich, mittels eines substituierten 6-Amino-Pyrazolopyrimidins mit Affinität zu TBK1 bzw. IKK ϵ , jedoch nicht zu PDK1, die Abhängigkeit *KRAS*-mutierter Krebszelllinien von diesen Transferasen und identifizierten Akt als direktes Target von TBK1.¹⁵⁷ Weitere Studien zur Auffindung und Generierung neuer und selektiver Inhibitoren stellen demnach ein attraktives Ziel für die Forschung an *KRAS*-mutierten Krebszelllinien und der Validierung der biologischen Funktion von TBK1 dar. Auch Vertreter der substituierten Azabenzimidazole zählen wie kürzlich veröffentlicht zur Klasse der potenten Modulatoren, jedoch wurden bislang keine Selektivitätsprofile erstellt.¹⁷⁷

4.4 Ergebnisse

4.4.1 TBK1 Homologiemodell und Kristallstruktur

Um eine generelle Vorstellung vom Aufbau der katalytischen Domäne und im Speziellen der ATP-Bindetasche zu erhalten, wurde anfänglich die Erstellung von Homologiemodellen verfolgt, da keine strukturellen Daten zu TBK1 verfügbar waren. Diese Vorgehensweise stellt bei unbekannter 3D-Struktur aber bekannter Aminosäuresequenz die Methode der Wahl dar, um Strukturinformationen vorzuberechnen.⁵⁶ Durch *in silico* Abgleich der Primärstruktur von TBK1 mit den in der Protein Datenbank (PDB) verfügbaren Sequenzen und zugehörigen Kristallstrukturen mit Hilfe einer BLAST-Analyse (*standard protein blast*, *blastp*-Algorithmus) des NCBI^{178, 179} konnte zunächst gezeigt werden, dass innerhalb der Scharnierregion ein charakteristisches Motiv, bestehend aus der Aminosäureabfolge Cys-Pro-Cys (CPC), präsent ist (vgl. Abbildung 4.14A).

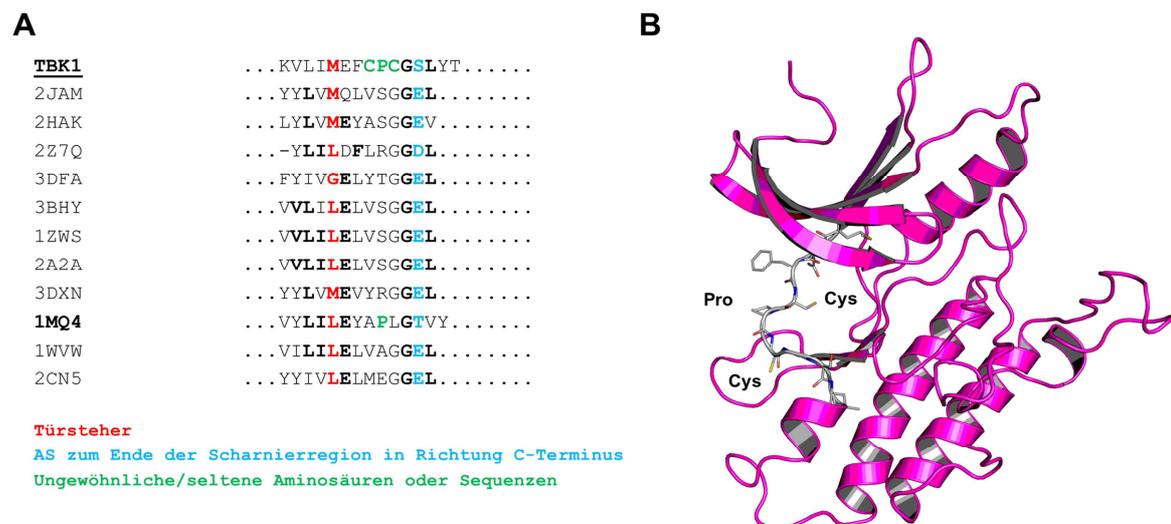


Abbildung 4.14: **A)** Auszug aus Sequenzvergleichen verschiedener, homologer Kinasen mit bekannter Kristallstruktur im Bereich der Scharnierregion; **B)** *In silico* berechnetes Homologiemodell auf Grundlage der Struktur von CDPK3 (PDB-Eintrag: 3HZT). Die Struktur wurde mit Hilfe des Protein-Homologiemodell Servers „Swiss-Model“ (Swiss Institute of Bioinformatics und Biozentrum of the University of Basel)^{180, 181} erstellt, wobei die Sequenzhomologie des Templats zu TBK1 bei 27% lag.

Eine tiefere Untersuchung durch Sequenzvergleiche zeigte, dass TBK1 als einzige der 518 proteinogenen Kinasen das charakteristische CPC-Motiv innerhalb der Scharnierregion aufweist und somit potentiell Ansatzpunkte für die Entwicklung kovalenter Inhibitoren zur Verfügung stehen. Die Existenz eines Prolins führt weiterhin zur partiellen Rigidisierung der Verknüpfungsregion und findet sich lediglich in einigen wenigen Kinasen, wie z.B. Aurora A

(PDB-Eintrag: 1MQ4), wieder. Diese Struktur wurde als Templat für die Berechnung des Homologiemodells ausgewählt, jedoch war die Ähnlichkeit zu TBK1 in den übrigen Bereichen und Domänen (Sequenzähnlichkeit: 15%) zu gering, um ein verlässliches und robustes Modell zu erstellen, sodass dieser Ansatz nicht zielführend war.

Stattdessen konnte durch eine automatische Templatsuche mit Swiss-Model^{180, 181} eine entsprechende Vorlage (Kinase: CDPK3, PDB-Eintrag: 3HZT, Sequenzhomologie: 27%) gefunden und auf Grundlage dieser homologen Struktur ein TBK1-Modell berechnet werden (Abbildung 4.14B). Dieses zeigte mit einer N-terminalen Subdomäne, vorwiegend bestehend aus β -Faltblättern sowie der Helix C, und einer α -Helix-reichen C-terminalen Subdomäne die charakteristischen, strukturell konservierten Domänen einer Kinase. Darüber hinaus konnte in Übereinstimmung mit den ursprünglichen Sequenzvergleichen auch das kennzeichnende CPC-Motiv in der Scharnierregion identifiziert werden.

Kürzlich wurden von Ma *et al.* die ersten Proteinkristallstrukturen von TBK1 (unphosphoryliert und phosphoryliert) im Komplex mit dem literaturbekannten Inhibitor BX795 veröffentlicht (PDB-Einträge 4EUT und 4EUU).¹⁵⁸ Neben der katalytischen Domäne, welche alle charakteristischen Elemente einer typischen Kinasedomäne aufweist konnte auch eine C-terminal verknüpfte Ubiquitin-artige Domäne identifiziert werden, welche den Autoren nach die Substratspezifität steuert und als gerüstgebende Einheit die Assoziation von TBK1 als Teil eines Protein-Proteinkomplexes unterstützt (Abbildung 4.15). Die Superposition der berechneten mit der experimentell ermittelten Struktur zeigt einen hohen Grad an Übereinstimmung bezüglich der Ausprägung der globalen Domänen, jedoch auch signifikante Unterschiede, welche durch eine differenzierte Betrachtung offenbar werden.

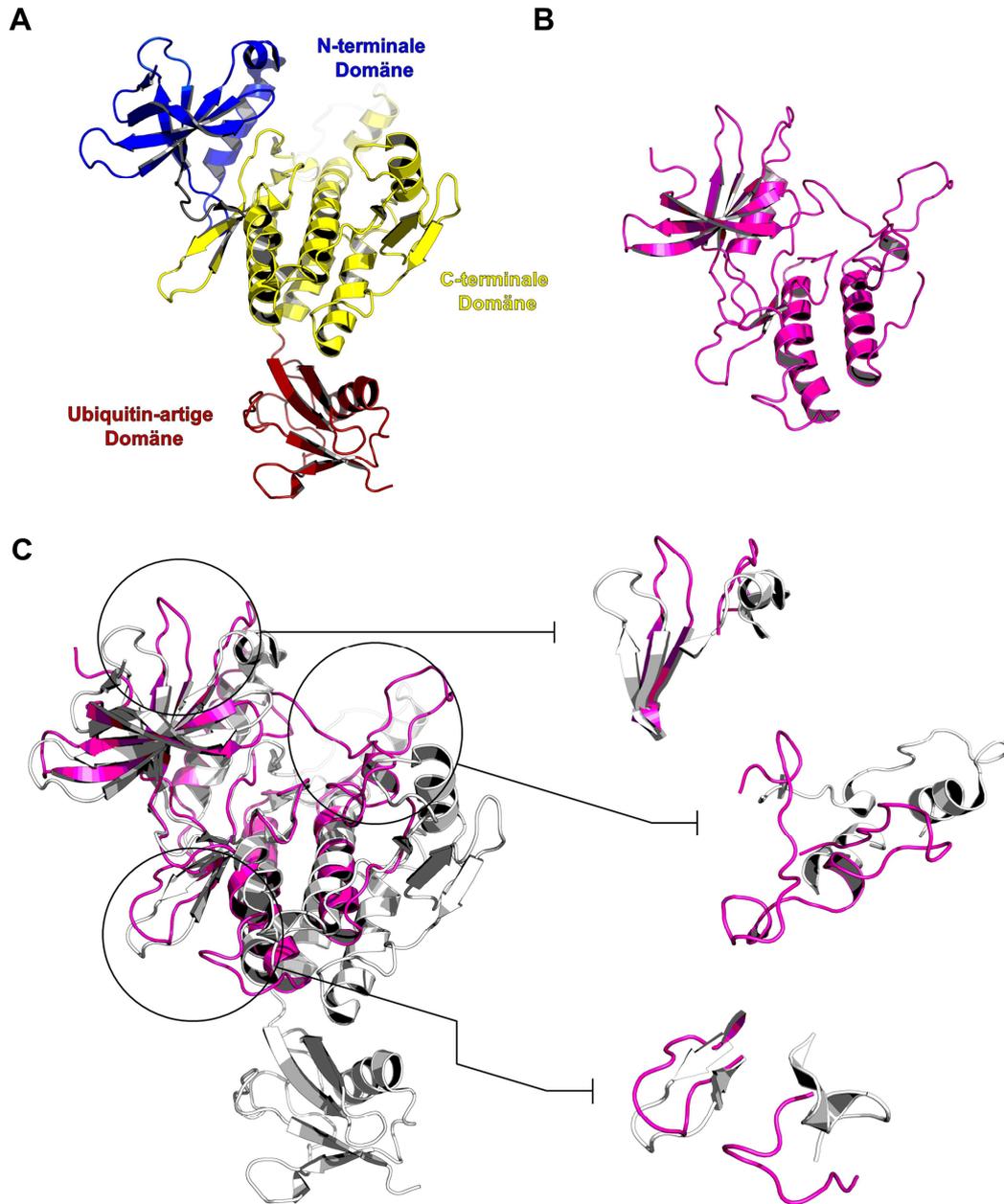


Abbildung 4.15: **A)** Kristallstruktur von unphosphoryliertem TBK1 im Komplex mit BX795 nach Ma *et al.* (PDB-Eintrag: 4EUT, AS 2-383) sowie **B)** *in silico* erzeugtes Homologiemodell. Charakteristisch zu erkennen sind die N- sowie C-terminalen Domänen (blau bzw. gelb) sowie die Ubiquitin-artige Domäne (ULD, rot), welche essentielle strukturgebende Funktionen besitzt und Substratspezifität erzeugt. Dem artifiziel berechneten Homologiemodell (AS 4-224) fehlt diese Domäne, da in der Templatstruktur keine ULD codiert war. Dieses Strukturelement repräsentiert keine unter den Proteinkinasen konservierte Domäne. Die korrespondierende phosphorylierte Form nach Ma *et al.* ist nicht gezeigt (PDG-Eintrag: 4EUU, AS 2-308), da lediglich im Bereich der Aktivierungsschleife signifikante Unterschiede auftreten und im kristallisierten Konstrukt keine Information zur Codierung der ULD gegeben war. **C)** Superposition beider Strukturen und Hervorhebung der strukturell abweichenden Bereiche (TBK1: grau, Homologiemodell: pink).

Während im Bereich der klassischerweise von Kinasen ausgebildeten Sekundär- und Tertiärstrukturelemente in C- und N-terminaler Domäne die relativen Positionen von α -Helices und β -Faltblättern nahezu in allen Bereichen übereinstimmen, weist die Ausprägung

verbrückender Schleifenelemente an der Proteinoberfläche Abweichungen zwischen Homologiemodell und Kristallstruktur auf (vgl. Abbildung 4.15). Im Allgemeinen können diese jedoch eine hohe Dynamik aufweisen, die durch Kristallstrukturen nicht illustriert werden kann,⁵⁶ da diese lediglich die Momentaufnahme der im Kristall stabilsten Konformation darstellen, die in Lösung nicht notwendigerweise Bestand hat. Die Konformation der Kinase im Homologiemodell entspricht weitgehend der phosphorylierten TBK1-Form, da hier die Aktivierungsschleife in Richtung des katalytisch aktiven Zentrums orientiert ist und eine kompakte Form der katalytischen Domäne wiedergibt, wohingegen diese Schleife in der nicht phosphorylierten Form dem umgebenden Lösungsmittel exponiert ist und Homodimerkontakte vermittelt.¹⁵⁸ Weiterhin taucht die Ubiquitin-artige Domäne im berechneten Modell nicht auf, da sie kein allgemeines Strukturelement einer typischen Kinase darstellt und auch in der Templatstruktur (PDB-Eintrag: 3HZZ) nicht vorhanden war. Trotz geringfügiger Unterschiede zeigen sowohl die experimentell ermittelte als auch die berechnete Struktur das charakteristische CPC-Motiv innerhalb der Scharnierregion, womit zweifelsfrei verdeutlicht wurde, dass eine kovalente Adressierung mit niedermolekularen Verbindungen prinzipiell in Betracht kommt. Zusätzlich stellt sich eine hohe Ähnlichkeit im gesamten Bereich der Bindungstaschen dar, die für die hoch konservierte Familie der Kinasen charakteristisch ist.

4.4.2 Screening und Validierung identifizierter TBK1-Binder

Zur Identifizierung eines strukturellen Startpunkts, in dessen Anlehnung Inhibitoren entworfen und optimiert werden können, wurden zunächst zwei Substanzbibliotheken („Vichem“ und „RL“) gegenüber TBK1 durchmustert. Die Zusammensetzung der beiden Sammlungen variierte dabei von einerseits ausschließlich kommerziell bezogenen Verbindungen zu andererseits intern synthetisierten Verbindungen und Zwischenstufen auf Grundlage diverser Arbeitsgruppenprojekte. Zur Testung wurde erneut auf das universelle, aktivitätsbasierte KinEASE™-System zurückgegriffen, welches schon in den vorhergehenden Screening-Kampagnen zum Einsatz kam. Zur in Mikrotiterplatten vorgelegten Kinase wurden dabei die zu untersuchenden Verbindungen aus 10 mM Reservoirs mit Hilfe eines automatisierten *Pin-Tool*-Systems überführt^{xi} und für 30 min inkubiert. Anschließende Kinasereaktion und Auswertung der Primärdaten erfolgte wie in Kapitel 9.2.4 beschrieben.

^{xi} In Zusammenarbeit mit der Lead Discovery Center GmbH, Dortmund.

4.4.2.1 „Vichem“-Bibliothek

Aufgrund der zahlreichen Substanzen, die eine wesentliche Erniedrigung der Kinaseaktivität (<40%) hervorriefen wurde der Schwellenwert für die Auswahl der Trefferverbindungen auf $\leq 25\%$ verbleibende Kinaseaktivität festgelegt. Aus einer Gesamtmenge von 968 Molekülen konnten somit im initialen Screening 52 Verbindungen als effektiv gegenüber TBK1 herausgestellt werden (Trefferrate: 5.4%).

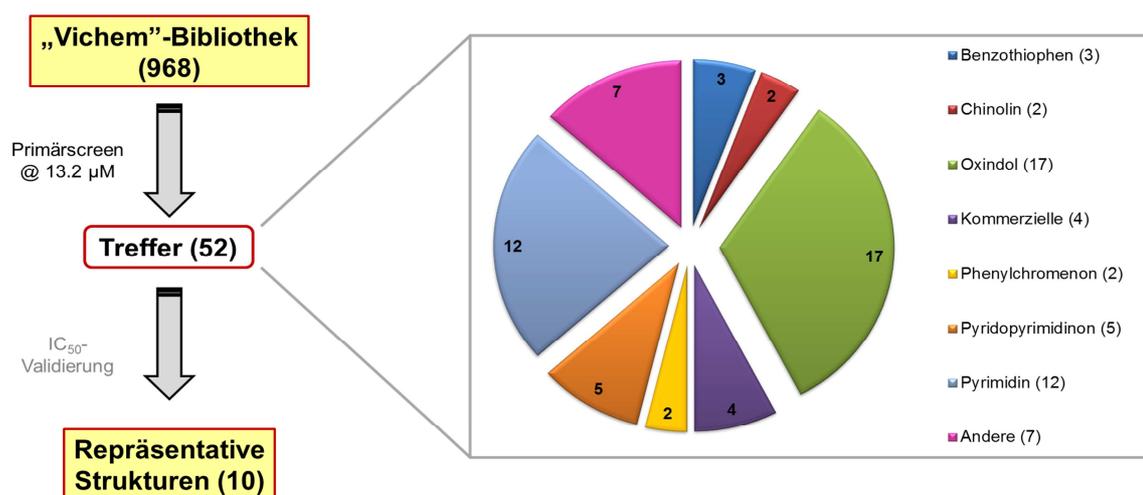


Abbildung 4.16: Schematische Vorgehensweise zur Identifizierung von potentiell interessanten und inhibitorisch wirksamen Verbindungen und Übersicht der verschiedenen Grundgerüste der Trefferverbindungen, die aus der Durchmusterung von 968 kommerziell erhältlichen Verbindungen der „Vichem“-Bibliothek gegen TBK1 (Z' -Faktor = 0.68) hervorgingen. Als Treffermoleküle wurden jene Verbindungen ausgewählt, die eine verbleibende Restaktivität von $\leq 25\%$ am Zielprotein herbeiführten.

Da es sich bei der verwendeten Substanzbibliothek um eine kooperativ genutzte Ressource handelte, welche nicht vollständig offengelegt wurde, konnte die globale Zusammensetzung der differenten Grundstrukturen nicht visualisiert werden. Im Trefferbild wird jedoch ersichtlich, dass vorwiegend Monoamino- bzw. Diamino-substituierte Pyrimidine sowie Oxindole unter den wirksamen Effektoren waren (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17).

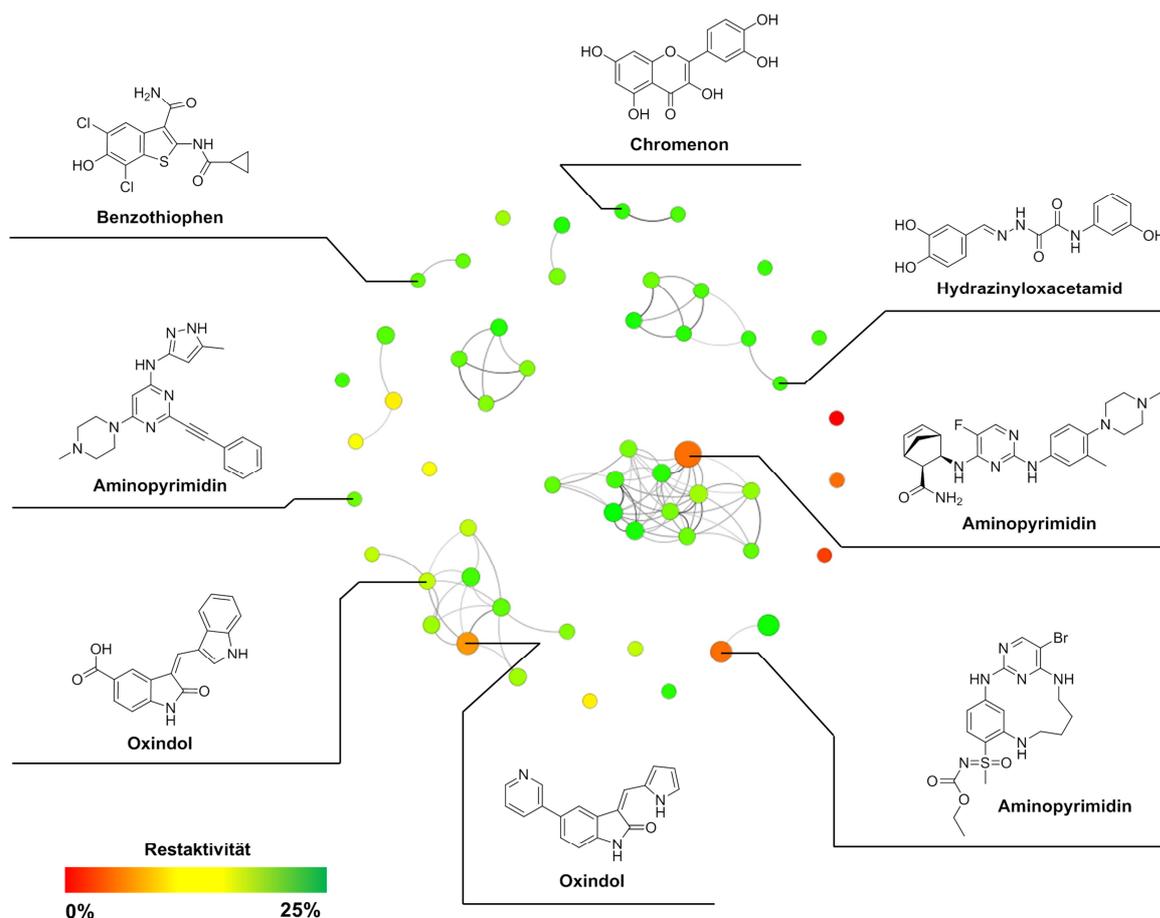
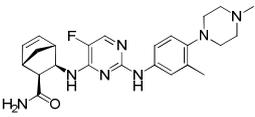
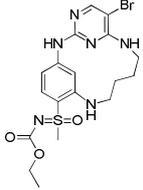
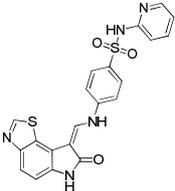
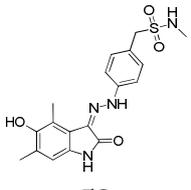
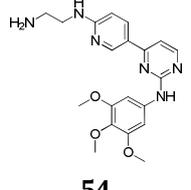
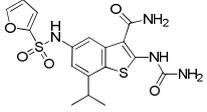
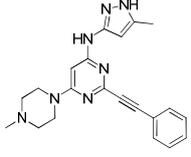
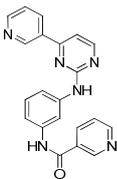
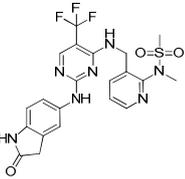
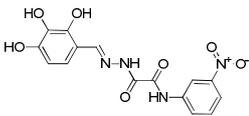


Abbildung 4.17: Zusammenstellung der Trefferverbindungen innerhalb eines Clusters unter Berücksichtigung der strukturellen Verwandtschaftsgrade, arrangiert mit Hilfe des frei zugänglichen Programms SARANEA.¹³⁶ Die Größe der farbigen Kreise determiniert für die Diskontinuität der angelehnten SAR (marginale strukturelle Veränderungen bedingen signifikante Änderungen der Aktivität), während die Farbe die Hemmstärke der jeweiligen Verbindung illustriert.

Unter letzteren wurden Analoga des kommerziellen Multitarget RTK-Inhibitors Sunitinib (Sutent)⁷⁷ identifiziert, welcher - wie auch die verwandten Oxindole - ein bekanntes Inhibitorgrundgerüst für die Adressierung von TBK1 darstellt.⁸⁷ Aus dem Portfolio dieser 52 Trefferverbindungen wurden zehn repräsentative Vertreter, darunter Oxindole, Pyrimidine und Benzothiophene, ausgewählt und validiert (Tabelle 4.4.1), wobei Pyridopyrimidinone nicht berücksichtigt wurden. Grundlage der Auswahl war einerseits die erzielte Potenz im Primärscreen, aber andererseits auch die Tatsache, dass einige der Strukturen im Hinblick auf TBK1 weder patentrechtlich noch anderweitig in der wissenschaftlichen Literatur in Erscheinung traten und somit die Novität bezüglich des gegebenen Zielenzym gewährleistet war.

Tabelle 4.4.1: Übersicht der zur Validierung ausgewählten Verbindungen, deren charakteristische Strukturelemente sowie hervorgebrachte Restaktivität an TBK1 in der initialen Durchmusterung der „Vichem“-Bibliothek und korrespondierende IC₅₀-Werte.

Struktur	Grundgerüst	Restaktivität @ 13.2 μM	Validierung IC ₅₀ (μM) ^a
 <p>50</p>	Pyrimidin	4.5%	0.14
 <p>51</p>	Pyrimidin	4.6%	≥ 2.2
 <p>52</p>	Oxindol	8.7%	0.17
 <p>53</p>	Oxindol	12.8%	ni ^b
 <p>54</p>	Pyrimidin	5.2%	0.16
 <p>55</p>	Benzothiophen	21.2%	1.46
 <p>56</p>	Pyrimidin	19.2%	≥ 8.6

 <p>57</p>	Pyrimidin	22.6%	≥ 25.0
 <p>58</p>	Pyrimidin/ Oxindol	28.5%	≥ 9.3
 <p>59</p>	Hydrazinyl- oxacetamid	24.9%	≥ 15.0

^a Einfaches Experiment in Duplikaten

^b ni = nicht inhibierend bei 20 µM applizierter Molekülkonzentration

Die Validierung der identifizierten Pyridine machte deutlich, dass bei gleichem Grundgerüst aber unterschiedlicher Substitution ein breiter IC₅₀-Bereich abdeckt wird. Beispielsweise zeigen die 2,6-verknüpften bzw. substituierten Pyridine **50** und **54** mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 0.14-0.16 µM einen signifikanten Effekt in Bezug auf TBK1, doch das strukturell verwandte Molekül **57** mit ≥25 µM geht als nicht inhibierend aus der Analyse hervor. Auch das makrozyklische Anilino-Pyrimidin **51** zeigt mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von ≈2.2 µM eine Struktur, welche durchaus Potential für den Einsatz in Optimierungsstudien besitzt, allerdings stehen mit der zyklischen Grundstruktur sowie dem Substitutionsmuster (*N*-(Ethoxycarbonyl)-sulfoximid) synthetische Hürden zur Disposition, die eine bequeme Derivatisierung in hohem Durchsatz für SAR-Betrachtungen erschweren. Ein analoges, verzweigtes Pyrimidin (**56**) stellt mit einem IC₅₀-Wert von ≈9 µM den Brückenschlag zwischen beiden Extremen der 2,6-verknüpften Vertreter, und damit eine mögliche Grundstruktur zur weiteren Optimierung, dar. Zudem ist diese Grundstruktur für die Inhibition von Aurora A bekannt bzw. patentrechtlich beschrieben,¹⁸² ein Fakt, der unter Betrachtung der Scharnierregion relevant erscheint, da auch Aurora das charakteristische Prolin innerhalb der Linkerregion aufweist und somit ebenfalls eine Rigidisierung der konformationellen Flexibilität in diesem Bereich aufweist. Weiterhin ist das Grundgerüst bequem über eine vierstufige Synthese zu erhalten bzw. derivatisieren. Auch für die getesteten Oxindole war eine ähnliche Beobachtung festzustellen, denn mit **52** und IC₅₀ = 0.17 µM im Vergleich zu **53**, welches keine Inhibition bis zu einer applizierten Konzentration von 20 µM aufwies, konnten ebenfalls zwei Vertreter ein breites Wirkungsspektrum bedienen.

Da diese Art der Strukturen jedoch bereits als TBK1-Inhibitoren bekannt war, wurden sie nicht in die engere Auswahl zur Verfolgung einer Optimierungsstudie herangezogen. Das untersuchte Thiophen **55** wiederum stellt einerseits aufgrund der Individualität der Gerüststruktur in Bezug auf Kinasehemmung und andererseits die substanzielle Inhibition des Zielenzym betreffend ($IC_{50} = 1.46 \mu\text{M}$) durchaus einen vielversprechenden Ansatzpunkt für medizinisch-chemische Ansätze zur rationalen Verbesserung der Potenz dar. Der Vertreter der Hydrazinyloxacetamide (**59**) wies im Zuge der Validierungsstudie mit einem IC_{50} -Wert von $\approx 15 \mu\text{M}$ keine vielversprechende Aktivität auf, um basierend auf dieser weitere Untersuchungen voranzutreiben.

4.4.2.2 „RL“-Bibliothek

In einem zweiten Ansatz wurde die arbeitsgruppeninterne „RL“-Bibliothek (839 Verbindungen) nach oben beschriebenen Verfahren durchmustert und dabei elf Verbindungen (Trefferquote 1.8%) mit signifikantem Effekt zur Reduktion der TBK1-Aktivität identifiziert. Im Gegensatz zu den im vorhergehenden Ansatz verwendeten Strukturen wiesen die nun eingesetzten Moleküle, welche lediglich durch einige wenige Vertreter fokussierter Kinaseinhibitoren gekennzeichnet ist, durchweg geringere Effektivitäten auf, sodass der Schwellenwert für die Wahl eines Treffermoleküls auf $\leq 40\%$ angepasst wurde. Unter den herausgestellten Strukturen befanden sich neben acht kommerziell erhältlichen Inhibitoren ebenfalls ein Pyrazol- sowie zwei Thiazolharnstoffe (Abbildung 4.18). Die frei erhältlichen Inhibitoren wiesen dabei bezüglich ihrer strukturellen Komposition eine erhebliche Diversität auf. So waren neben Pyrimidinen (Tozasertib) und Oxindolen (Sunitinib), die bereits im vorhergehenden Screening auftauchten, beispielsweise auch Chinazoline (Erlotinib) sowie Pyrrolo- und Pyrazolopyrimidine (Tofacitinib) und Benzpyrazole (Axitinib) vertreten.

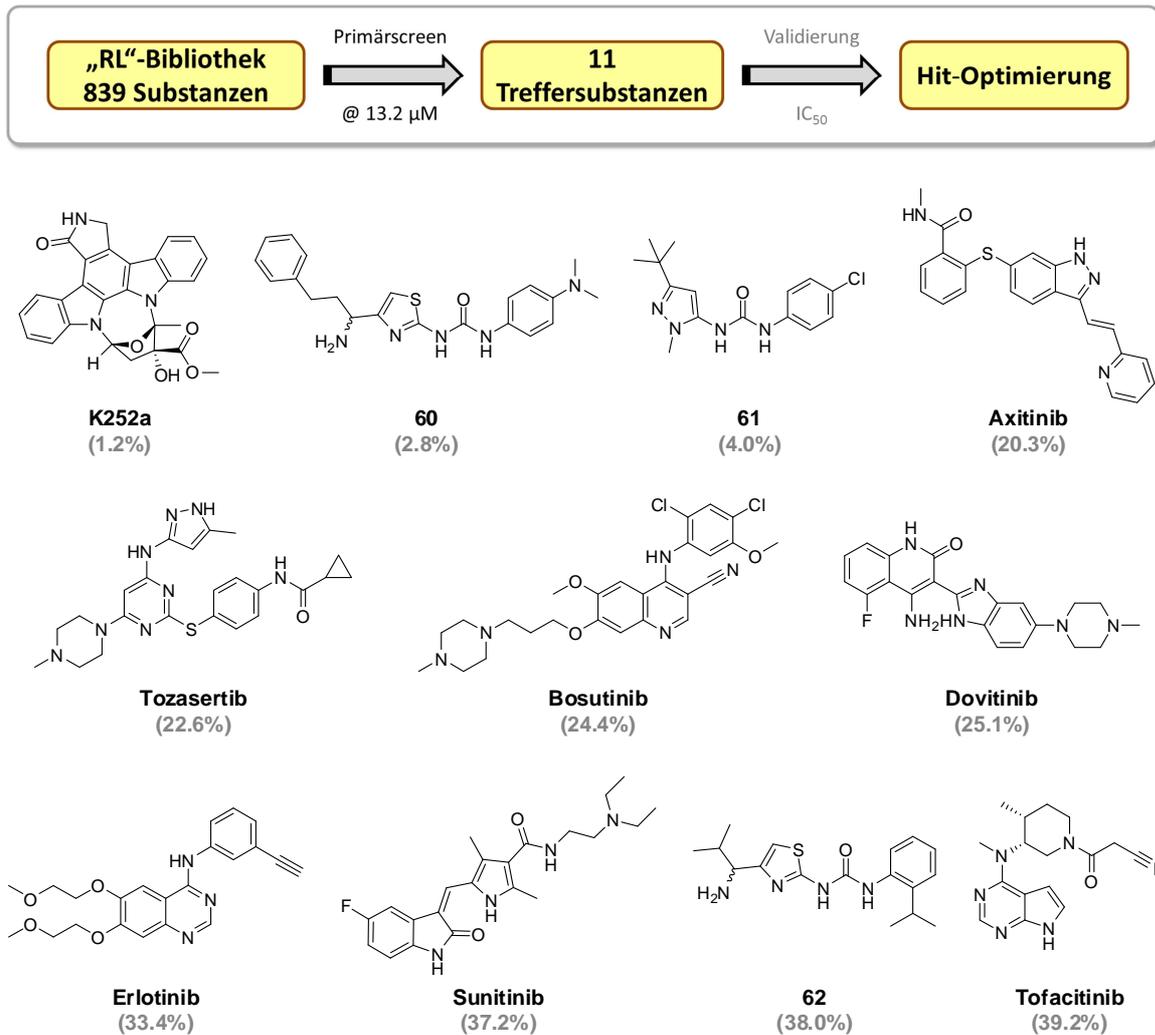


Abbildung 4.18: Durchmusterung von 839 Verbindungen der RL-Bibliothek gegen TBK1 (Z' -Faktor = 0.79). Als Treffermoleküle wurden jene Verbindungen ausgewählt, die eine verbleibende Restaktivität von $\leq 40\%$ am Zielprotein herbeiführen. Schematische Vorgehensweise zur Identifizierung von potentiell interessanten und inhibitorisch wirksamen Verbindungen (oben); Zusammenstellung der Trefferverbindungen in Korrelation zur hervorgerufenen Restaktivität am Zielprotein (unten).

Die elf als potentielle Modulatoren identifizierte Substanzen der „RL“-Bibliothek wurden der Bestimmung von IC₅₀-Werten unterzogen und biochemisch validiert (vgl. Kapitel 9.2.2.2), wobei unter diesen ein Großteil kommerziell erhältlicher Inhibitoren (8 aus 11) auszumachen war. Im Zuge dieser Validierungsstudie konnte gezeigt werden, dass nicht alle im Primärscreen aufgefundenen Moleküle *de facto* als TBK1-Inhibitoren bestätigt werden konnten. So waren für die Thiazol- als auch Pyrazolharnstoffe **60**, **61** und **62** keine IC₅₀-Werte zu determinieren, da eine Perturbation der Kinaseaktivität ausblieb (vgl. Tabelle 4.4.2). Im Gegensatz dazu wiesen die herausgestellten Kinaseinhibitoren eine durchaus unterschiedliche Inhibitionsstärke hinsichtlich der untersuchten Kinase auf, so dass schlussfolgernd lediglich die Fraktion bestehend aus bereits renommierten Verbindungen einen

Effekt hervorrief. Unter diesen war der Staurosporin-verwandte Multitarget-Inhibitor K252a die potenteste Verbindung (Gerüst: Polyaromat, $IC_{50} = 0.009 \mu\text{M}$), gefolgt von Dovitinib (Benzimidazochinolinon, $0.290 \mu\text{M}$) und Sunitinib (Oxindol, $0.737 \mu\text{M}$). Allen gemeinsam ist die Adressierung multipler Zielenzyme, die für Sunitinib und Staurosporin schon 2005 in einer breit angelegten Profilierungsstudie durch Fabian *et al.*⁵⁴ veranschaulicht wurde. Dovitinib als chronologisch später publizierte Struktur folgte 2008 in einer von Karaman *et al.*⁵⁵ durchgeführten Profilierung, wobei diese jedoch TBK1 nicht als Zielenzym enthielt. Die signifikante Inhibition von TBK1 war zudem für eine Selektion zur weiteren rationalen Entwicklung und Optimierung nachteilig, da bereits optimale Inhibitionseigenschaften in Verbindung mit promiskuitiver Adressierung existent waren. Vielversprechende Grundgerüste stellten die moderat aktiven Verbindungen Axitinib (Benzpyrazol, $1.30 \mu\text{M}$), Erlotinib (Chinazolin, $2.21 \mu\text{M}$), Bosutinib (Chinolin, $2.33 \mu\text{M}$) und auch Tozasertib (Pyrimidin, $6.22 \mu\text{M}$) dar, welche aufgrund ihrer vergleichsweise moderaten Wirkung Spielraum für weitere Optimierungen zur Erhöhung von Selektivität und Affinität der Grundstruktur bieten. Zuletzt war auch das Pyrrolopyrimidin Tofacitinib unter den zu validierenden Strukturen vorhanden, doch aufgrund eines eruierten IC_{50} -Wertes von $\approx 11.5 \mu\text{M}$ wurde von einer weiteren Verwendung zum rationalen Design abgesehen.

Tabelle 4.4.2: Zusammenstellung der zu validierenden Zielstrukturen in Gegenüberstellung zu deren IC_{50} -Werten und optionalen Primärtargets.

	Struktur	Restaktivität	$IC_{50} [\mu\text{M}]^a$	Primärtarget
„RL“-Bibliothek	K252a	1.2%	0.009	Pan-Kinase
	60	2.8%	ni ^b	-
	61	4.0%	ni ^b	-
	Axitinib	20.3%	1.30	VEGFR1/2/3, PDGFR β , KIT
	Tozasertib	22.6%	6.22	Aurora A/B/C
	Bosutinib	24.4%	2.33	cSrc/Abl
	Dovitinib	25.1%	0.290	FLT3, KIT, VEGFR1/2/3, PDGFR β , CSF-1R, FGFR3
	Erlotinib	33.4%	2.21	HER1/EGFR
	Sunitinib	37.2%	0.737	VEGFR2, PDGFR β , KIT, FLT3
	62	38.0%	ni ^b	-
Tofacitinib	39.2%	≈ 11.5	JAK3	

^a Einfaches Experiment in Duplikaten

^b ni = nicht inhibierend bei $20 \mu\text{M}$ applizierter Substanzkonzentration

Unter den aussichtsreichen Strukturen repräsentierte Tozasertib eine effizient zu synthetisierende⁴⁰ und somit in der Theorie auch unproblematisch zu derivatisierende Molekülklasse, die jedoch ebenfalls für Multitarget-Inhibition bekannt ist. Auch in der vorhergehenden Durchmusterung der „Vichem“-Bibliothek konnte eine artverwandte Struktur (**56**) identifiziert werden, die eine Eignung als generelle Struktur zur Adressierung von TBK1 weiter untermauerte, da erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet werden können.

4.4.3 Rationales Design zur Optimierung einer Hit-Struktur

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse beider Durchmusterungs- und Validierungsstudien konnte ein gemeinsames Grundgerüst zur weiteren Optimierung identifiziert werden: Die Verbindung Tozasertib aus der „RL“-Bibliothek mit analogem Aufbau zum zuvor in der „Vichem“-Bibliothek identifizierten 2,4,6-substituierte Pyrimidin **56** zeigt an 2-Position eine differente Substitution (Thiophenylcyclopropylcarboxamid vs. Ethinylbenzol), welche zu einer lediglich marginalen Verbesserung der inhibitorischen Aktivität führt ($IC_{50} = 6.22 \mu\text{M}$ vs. $8.6 \mu\text{M}$). Die weitere Derivatisierung der 2-Position mit unterschiedlichen Substituenten sollte zur Herausarbeitung einer distinkten SAR dienen, um allgemeine Regeln zur Einführung funktioneller Gruppen abzuleiten. Ein weiterer Aspekt, der eine Auswahl dieser Strukturen bestärkt, ist die bereits existierende Komplexkristallstruktur von Tozasertib in Aurora A (PDB-Eintrag: 3E5A), einer Kinase, die wie TBK1 ein charakteristisches Prolin innerhalb der Scharnierregion besitzt. Dies führt zur Rigidisierung dieses Strukturelements und eröffnet die Möglichkeit, dass Liganden mit ähnlichen Bindungsmodi auch in TBK1 akzeptiert werden.¹⁸³ Modellierungsstudien, die auch die mögliche Einführung von Elektrophilen zur Generierung kovalenter Inhibitoren berücksichtigen, werden dadurch grundlegend simplifiziert. Auch die Selektivität kann dadurch die Einführung reaktiver Gruppen erhöht werden, da diese die Verweildauer am zielgerichteten Target verlängert und so in niedrigeren Dosen mit minimalen Nebeneffekten appliziert werden kann.^{19, 32} Im ursprünglichen, literaturbekannten Bindungsmodus von Tozasertib in Aurora A (Abbildung 4.19A,B) finden sich Scharnierkontakte, die über das Pyrazol-Motiv generiert werden und eine große Affinität zum Protein sicherstellen.¹⁸³ Weiterhin wird der Thio-verbrückte Aromat durch Hydrophobe van-der-Waals Wechselwirkungen mit dem in der Glycin-reichen Schleife lokalisierten Phe144 fixiert und trägt dadurch ebenfalls maßgeblich zur Protein-Ligand-Interaktion bei. Das Lösungsmittel-exponierte Piperazin sorgt für optimale pharmakokinetische Eigenschaften bezüglich Löslichkeit der Verbindung und sollte daher auch in den entworfenen Verbindungen erhalten bleiben, wobei diesem allerdings kein offensichtlicher pharmakodynamischer Beitrag zur Affinitätssteigerung beigemessen wurde.

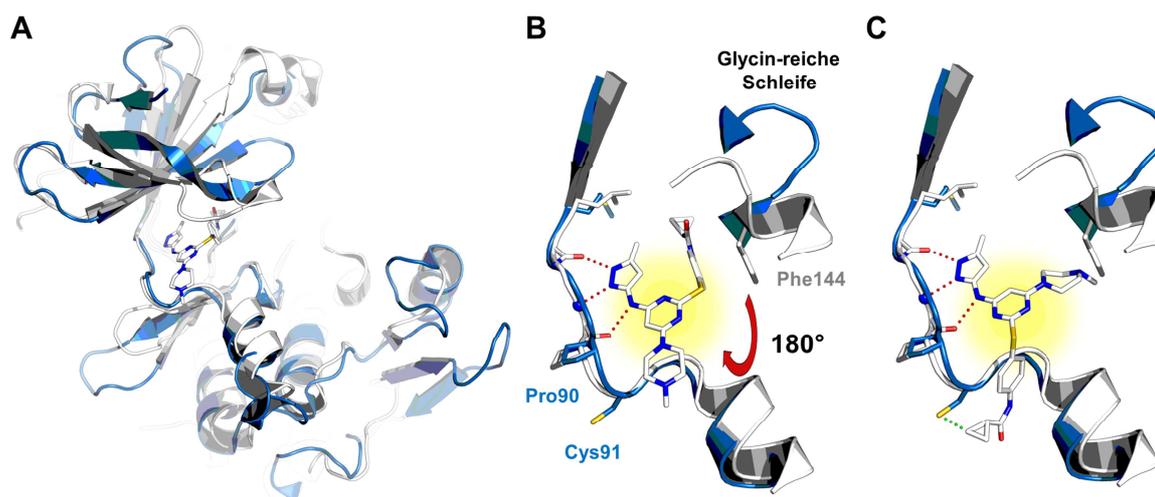


Abbildung 4.19: Bindungsmodus von Tozasertib in Aurora A (weiß) und Übertragung des Bindungsmodus auf die zu untersuchende Kinase TBK1 (blau). **A)** Superposition der Kristallstrukturen von Aurora A im Komplex mit Tozasertib und TBK1 (PDB-Einträge: 3E5A, 4EUT); **B)** Detailansicht des Bindungsmodus und der ausgebildeten Interaktionen zur Scharnierregion in Aurora A; **C)** Basierend auf der Annahme eines flexiblen Bindungsmodus besteht die Möglichkeit der Generierung räumlicher Nähe des terminalen Cyclopropylamids zu Cys91 in TBK1 und somit potentieller Adressierung durch Elektrophil-dekorierte Tozasertib-Derivate.

Für eine Anpassung an die Topographie der TBK1-Bindungstasche wurde zunächst vorausgesetzt, dass prinzipiell zwei Bindungsmodi eingenommen werden können. Einerseits jener, welcher schon durch die publizierten Tozasertib-Komplexstrukturen bekannt war (Abbildung 4.19B), und weiterhin eine durch Rotation des zentralen Pyrimidins um 180° hervorgerufene Interaktionsart, um die Lokalisierung von Aromat und Piperazin zu invertieren und so räumlichen Nähe des substituierten π -Systems zum Scharnier-Cys91 zu schaffen (vgl. Abbildung 4.19C). Die Dekoration dieses Aromaten mit Elektrophilen eröffnet die prinzipielle Möglichkeit das reaktive Thionukleophil (Cys91) kovalent zu adressieren. Tozasertib zeigt gegenüber TBK1 lediglich moderate Aktivität, möglicherweise aufgrund des Fehlens des für die Protein-Ligand-Interaktion essentiellen Phenylalanins innerhalb der Glycin-reichen Schleife, so dass der Aromat des Liganden nicht durch π - π -Wechselwirkungen fixiert wird. Diese Tatsache eröffnet jedoch ebenfalls Möglichkeiten in Bezug auf die Inhibitorgestaltung, denn ein nicht fixierter Aromat erlaubt eine Rotation und möglicherweise eine ausreichende Flexibilität, so dass der Aromat in Richtung der Scharnierregion positioniert wird und so eine kovalente Bindung des eingeführten Elektrophils mit Cys91 ermöglicht.

In parallelen Studien konnte bereits herausgestellt werden, dass eine Dekoration des Aromaten an gleichem Grundgerüst mit einem Michael-Akzeptor in *meta*-Position beispielsweise dafür geeignet ist das Cys797 in EGFR am Rande der Scharnierregion zu adressieren.^{xii} Grundsätzlich sollte dies auch analog für TBK1 gelingen, nämlich für den Fall, in welchem das Elektrophil in *para*-Position des Aromaten angefügt wird, denn so kann eine ausreichende räumliche Nähe zum Cystein hergestellt werden, was aber bei Verknüpfung in *meta*-Position nicht möglich erscheint (vgl. Abbildung 4.19). Der Hypothese nach würde damit weiterhin sichergestellt, dass die Selektivität der Ausbildung einer kovalenten Bindung zu TBK1 zumindest gegenüber EGFR gewährleistet ist, da dieses *para*-Substitutionsmuster für letztgenannte Kinase nicht zur irreversiblen Modulation führt.

Unter Berücksichtigung der vorhandenen Daten wurden diverse unterschiedlich substituierte Verbindungen basierend auf Tozasertib entworfen (vgl. Abbildung 4.20), wobei ein Fokus auf die synthetische Umsetzung des rational designten Inhibitors mit Michael-Akzeptor in *para*-Position (**63a**), sowie dessen korrespondierendes gesättigtes Analogon (**63b**) gelegt wurde. Zu Vergleichszwecken wurden auch die *ortho*- und *meta*-substituierten Verbindungen (**64**, **65**, vgl. Tabelle 4.4.4) in die Substanzbibliothek aufgenommen.

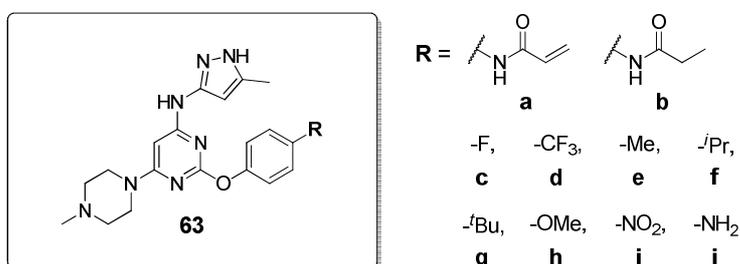


Abbildung 4.20: Dem rationalen Design zugrunde liegendes Grundgerüst und eingeführte Substituenten zur reversiblen und potentiell kovalenten Modulation von TBK1.

Der verbrückende Thioether wurde durch einen klassischen Ether ersetzt, da dieser zum einen als isoster gilt und zum anderen eine größere kommerzielle Verfügbarkeit an 4-substituierten Phenolen im Vergleich zu Thiophenolen für die synthetische Darstellung der Derivate bestand. Als *para*-Substituenten wurden sowohl polare (-NH₂) als auch lipophile (-Me, -OMe, -NO₂, -iPr, -tBu, -CF₃, -F) Funktionalitäten eingeführt und dabei ebenfalls elektronenziehende und -donierende (-NO₂ vs. -NH₂) Eigenschaften berücksichtigt.

^{xii} Vergleiche Masterarbeit „Synthese und biochemische Charakterisierung kovalenter Kinaseinhibitoren zur Umgehung der Wirkstoffresistenz T790M in EGFR“, Julian Engel, TU Dortmund, 2011.

Neben den entworfenen Hit-Derivaten wurde aus der Kenntnis des Bindungsmodus des reversibel modulierenden BX795 im Komplex mit TBK1 (PDB-Einträge: 4EUT, 4EUU) ebenfalls ein Ansatz verfolgt, indem dieses Molekül in einen potentiell kovalent bindenden Inhibitor konvertiert wurde. Dazu wurde der gesättigte Pyrrolidin-Teil an 3-Position mit einem Acrylamid dekoriert und dabei zunächst die Stereochemie des Knüpfungspunktes außer Acht gelassen, um den generellen Effekt eines Racemats auf die Kinase zu untersuchen. Der übrige Teil der Grundstruktur wurde unverändert übernommen, um eine maximale Affinität im Vergleich zur Referenzstruktur BX795 zu gewährleisten (vgl. Abbildung 4.21).

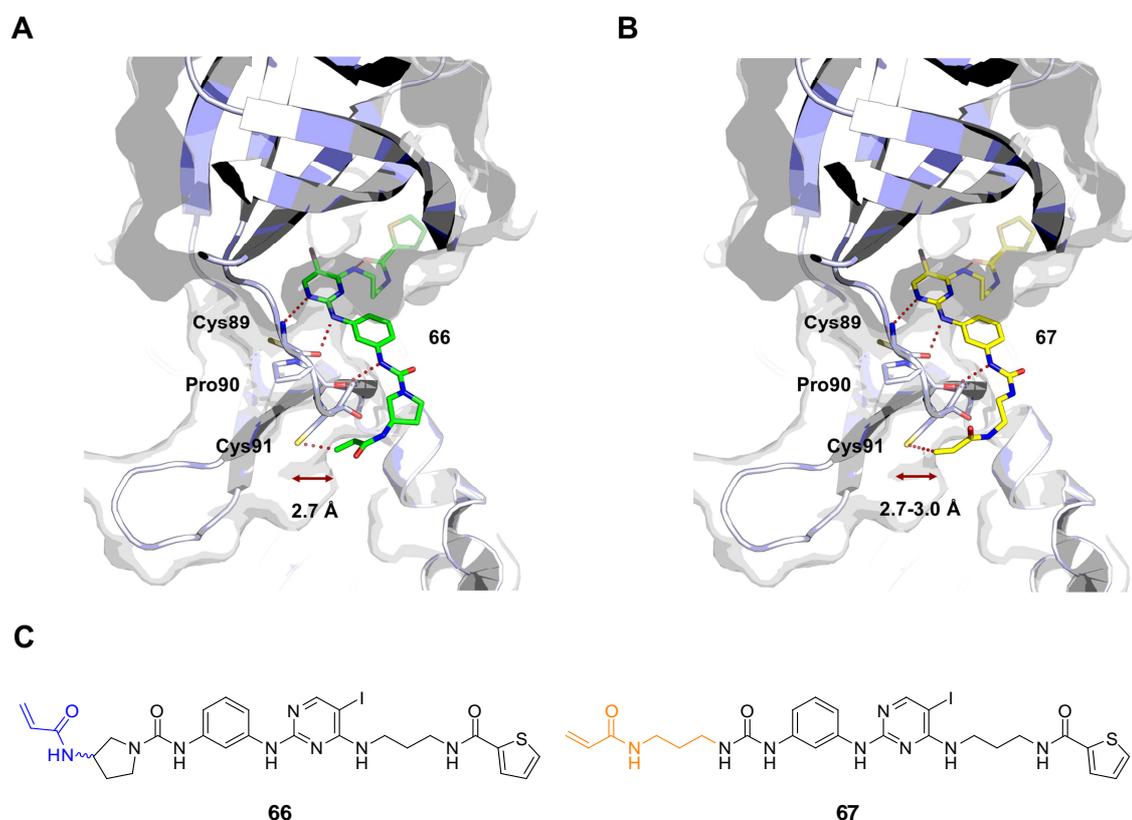


Abbildung 4.21: Manuelle Superposition von BX795-Analoga, welche mit Elektrophilen zur Adressierung des Cys91 am Rande der Scharnierregion ausgestattet sind. **A)** Acrylamid-Substituent über direkte Knüpfung des Elektrophils an 3-Position des terminalen Pyrrolidins und **B)** Acrylamid-Substituent über Aminopropyl-Linker, um die Flexibilität des terminalen Motivs zu erhöhen und so die Möglichkeit einer räumlichen Nähe zur Generierung einer kovalenten Bindung zu geben. **C)** 2D-Strukturen der von BX795 abgeleiteten, potentiell kovalent bindenden Derivate.

Im manuellen Ansatz zur Superposition zeigt sich der postulierte Bindungsmodus der neu kreierten Derivate analog zu BX795. Im rückwärtigen Teil der Bindungstasche im Bereich von DFG-Motiv und C-Helix ist das Thiophen lokalisiert. Angrenzend an dieses strukturelle Merkmal zeigt sich eine interne Wasserstoffbrücke zwischen verbrückendem Amid und

4-Aminopyrimidin. Scharnierkontakte werden sowohl direkt über das Pyrimidin, als auch über das an 2-Position geknüpfte Amin sowie den Harnstoffteil gebildet. Die Studien zeigen, dass im Falle des Pyrrolidin-Analogons **66** lediglich das *R*-Enantiomer für eine mögliche kovalente Adressierung von Cys91 in Betracht gezogen werden kann, da die Geometrie im korrespondierenden *S*-konfigurierten Molekül, für den Fall eines zu BX795 analogen Bindungsmodus, keine räumliche Nähe zum Scharniercystein generiert. Eine definitive Aussage lässt dich jedoch durch diese qualitativ vorausgesagten Interaktionsmodi nicht treffen, da das Modell keiner Minimierung der Molekulardynamik in Bezug auf die energetisch günstigsten Zustände unterzogen wurde. Aus diesem Grund wurde zunächst das Racemat hergestellt, um die generelle Auswirkung eines Michael-Akzeptors in dieser Position zu untersuchen. Im zweiten, abgeänderten Molekül **67** wurde der Fokus auf die relative Flexibilität des terminal eingeführten Elektrophils gelegt, mit dem Ziel, die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer hinreichenden räumlichen Nähe zur Scharnierregion zu maximieren. Dazu wurde der Pyrrolidin-Ring geöffnet und durch eine bewegliche Propylkette ersetzt (vgl. Abbildung 4.21).

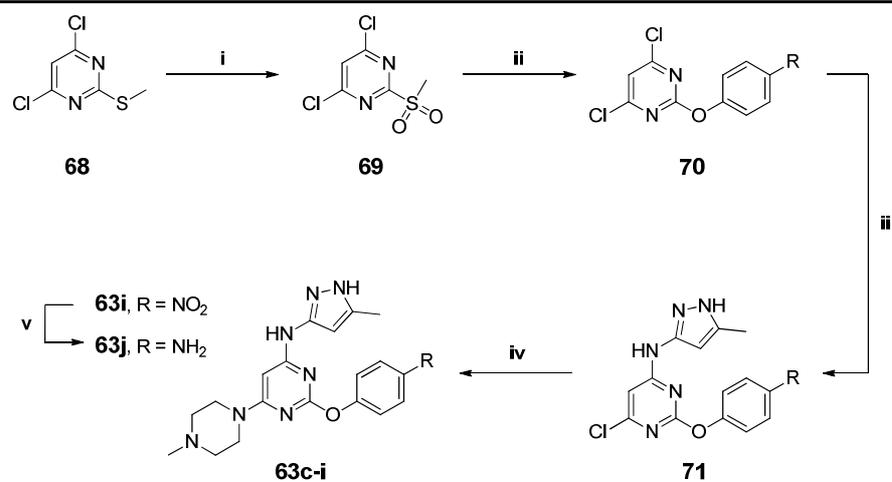
Die Serie der kovalenten Analoga und dabei im Speziellen die BX795-Derivate sollten prinzipiell als Sonden zur selektiven Adressierung von TBK1 dienen, um in nachfolgenden chemisch-genetischen Ansätzen das Verständnis für die biologische Funktion zu fördern.

4.4.4 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek

Reversible Analoga: Zur Darstellung der reversiblen Tozasertib-Derivate konnte eine effiziente Syntheseroute (vier Stufen) in Anlehnung an literaturbekannte Vorschriften verfolgt werden.⁴⁰ Im initialen Schritt wurde durch Oxidation von 2-Methylthio-4,6-Dichlorpyrimidin (**68**) mit *m*CPBA in DCM das 2-Methylthiosulfonyl-Analogon **69** mit einer Ausbeute von 86% generiert und eine adäquate Abgangsgruppe an der 2-Position des Kerns eingeführt (Tabelle 4.4.3). Im direkten Anschluss wurde bereits die Route zur Herstellung der jeweiligen Derivate festgelegt, indem das gewünschte *para*-substituierte Phenol zunächst mit NaH oder NaOAc behandelt und anschließend mit **69** zum korrelierenden, aromatischen Ether (**70**) umgesetzt wurde. Diese Reaktion endete je nach Methodik und Isolierung in Ausbeuten von 45-95% oder aber mit dem unbehandelten Rohprodukt. In beiden Fällen wurde die sukzessive Umsetzung durch eine S_NAr mit 5-Methyl-1*H*-pyrazolamin in DMF und unter Erhitzen (85 °C) erreicht und auf diese Weise das Scharnierregion-kontaktierende Element eingeführt. Hierbei konnten sehr gute Ausbeuten im Bereich von \approx 70-80% (**71**) erzielt werden. Im letzten Schritt der Syntheseroute wurde die Anknüpfung von

1-Methylpiperazin (Reaktant und Solvens) unter starker thermischer Energiezufuhr (110 °C) in einer weiteren S_NAr mit guten Ausbeuten von 74-84% vollzogen. Sämtliche Reaktionsschritte zur Synthese der reversiblen Tozasertib-Analoga und Intermediate zeichneten sich durch das Auftreten lediglich weniger, nicht näher charakterisierter Nebenprodukte aus, wobei Ausbeuteunterschiede (vgl. Tabelle 4.4.3) auf die Art und Weise der Aufbereitung sowie Isolierung des jeweiligen Produktes zurückzuführen waren.

Tabelle 4.4.3: Synthese der reversiblen 4-Aminopyrazolpyrimidine.^a



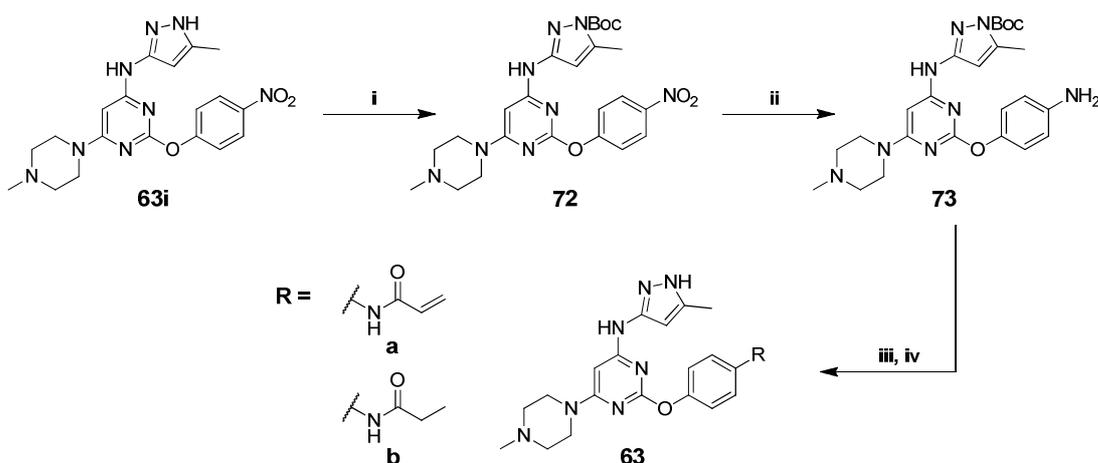
^a Reagenzien und Bedingungen: i) *m*CPBA, DCM, 0 °C-RT, 72 h, 86%, ii) 4-substituiertes Phenol und (a) NaH, THF, 0 °C, 30-240 min oder (b) NaOAc, *t*BuOH, 90 °C, 40 min, 45-95%, iii) 5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-amin, DIPEA, DMF, 85 °C, 12 h, 70-80%, iv) 1-Methylpiperazin, 110 °C, 30 min, 74-84%, v) Pd/C, NH₄HCOO, EtOH, 95 °C (Ölbadtemperatur), 1h, 69%.

Verbindung	R	Gesamtausbeute
63c	-F	19.8%
63d	-CF ₃	24.9%
63e	-Me	10.8%
63f	- <i>i</i> Pr	10.1%
63g	- <i>t</i> Bu	51.6%
63h	-OMe	9.3%
63i	-NO ₂	22.2%
63j	-NH ₂	19.5%

Kovalente Analoga: Ein kovalentes Derivat, sowie das entsprechende gesättigten Pendant wurden ausgehend von dem zuvor dargestellten, reversiblen Derivat **63i** synthetisiert. Im Gegensatz zu der vorhergehenden Syntheseroute war es in diesem Fall unumgänglich, intermediär eine Schutzgruppe einzuführen, um zu verhindern, dass das sekundäre Pyrazolamin im vorletzten Syntheseschritt der geplanten Route (vgl. Schema 4.4.1) durch den

Einsatz der Reagenzien Propionyl- bzw. Acryloylchlorid unbeabsichtigt funktionalisiert wird. Dazu wurde das Pyrazol zunächst unter Verwendung von Boc_2O in MeOH mit der Boc-Schutzgruppe versehen und das resultierende Produkt **72** in einer moderaten Ausbeute von 67% isoliert. Im Anschluss erfolgte die Reduktion der *para*-ständigen Nitrogruppe mit Pd/C und Ammoniumformiat in Ethanol und unter Rückfluss zum korrespondierenden Amin **73** (Ausbeute: 81%).

Schema 4.4.1: Synthese potentiell kovalenter 4-Aminopyrazolpyrimidin-Derivate.



^a Reagenzien und Bedingungen: i) Boc_2O , Et_3N , MeOH, RT, 12 h, 67%; ii) NH_4HCOO , Pd/C, EtOH, 90°C, 30 min, 81%; iii) Propionylchlorid bzw. Acryloylchlorid in THF, DIPEA, THF, 0 °C, 30 min + 30-120 min, Rohprodukt; iv) TFA (25% in DCM), DCM, RT, 1 h, 36-58% (2 Schritte).

Im Folgenden konnte das anilinisches Amin unter Verwendung geeigneter Säurechloride zum entsprechenden Acrylamid, respektive Propionylamid umgesetzt werden. Die Zugabe des jeweiligen Reagenz (Acryloyl-, Propionylchlorid) zum in THF vorgelegten Amin erfolgte hochverdünnt in THF (1000-fach) und tropfenweise, um potentielle Nebenreaktionen durch die erhebliche Reaktivität der eingesetzten Carbonsäurehalogenide zu minimieren. Im direkt nachgeschalteten Schritt wurde unter Verwendung des Rohprodukts die Boc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 25% TFA in DCM entfernt. Die Ausbeute nach zwei Reaktionsschritten betrug 58% im Falle der terminal gesättigten Verbindung **63b** und 36% für das Michael-Akzeptor-dekorierte Derivat **63a**.

Synthesen zur Herstellung der kovalenten BX795-Derivate (**66**, **67**) wurden von Dr. Debjit Basu durchgeführt und die resultierenden Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit lediglich biochemisch charakterisiert.

4.4.5 Biochemische Charakterisierung

Zur Analyse der inhibitorischen Eigenschaften der synthetisierten Derivate wurde abermals das im Rahmen dieser Arbeit mehrfach genutzte, aktivitätsbasierte Assaysystem KinEASE™ eingesetzt. In die Reihe der zu untersuchenden Inhibitoren wurden neben den rational entwickelten Verbindungen **63a-j** und der BX-Analoga **66** und **67** ebenfalls einige Derivate aufgenommen, die in parallelen Projekten innerhalb der AG Rauh ursprünglich zur Adressierung der konstitutiv aktiven und Türsteher-mutierten Form L858R/T790M von EGFR entwickelt wurden (Verbindungen **74a,b** und **75**, vgl. Tabelle 4.4.4) und zum Zeitpunkt der Hochdurchsatzdurchmusterung nicht Bestandteil der „RL“-Bibliothek waren.

Eine Betrachtung der reversiblen Vertreter **63a-j** der Zusammenstellung illustriert eine definierte SAR, hervorgerufen durch die differente *para*-Substitution des Ether-verbrückten Aromaten. Im Gegensatz zur Ursprungsstruktur konnten hier durchweg signifikante Effekte im Bereich von $<1 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 4.4.4, Verbindungen **63c-f** und **h-j**). Doch im direkten Vergleich untereinander wurde eine erhebliche Bandbreite an inhibitorischer Wirksamkeit abgedeckt. So führte beispielsweise die Einführung von Fluor-, Amino- oder Methoxy-Substituenten (**63c,h,j**) zu IC_{50} -Werten von 0.65-0.84 μM , während die Anknüpfung von Methylfunktionalitäten als Trifluormethyl-, Monomethyl- oder Isopropyl-Gruppen (**63d,e,f**) eine annähernd zweifache Steigerung der Effektivität bis hin zu 0.29-0.38 μM mittlerer inhibitorischer Konzentration erzielte. Das Äquivalent mit *tert*-Butylrest (**63g**) resultierte jedoch in ausgeprägtem Verlust an inhibitorischer Aktivität ($\text{IC}_{50} = 2.66 \mu\text{M}$). Weitere Optimierung konnte durch die Anbringung der stark elektronenziehenden Nitro-Gruppe erzielt werden, sodass zu diesem Molekül die höchste Affinität zum Target (**63i**, $\text{IC}_{50} = 0.06 \mu\text{M}$) eruiert wurde, eine im Vergleich zu Tozasertib ca. 100-fache Steigerung der Potenz. Aus diesem Grund wurden, einhergehend mit der Untersuchung anderer Derivate, auch *ortho*- und *meta*-Nitro dekorierte Verbindungen (verfügbar im Rahmen des o.g. EGFR-Projekts) untersucht, um die SAR nachzuvollziehen, doch in diesen Fällen konnten lediglich IC_{50} -Werte von 2.35 μM (**65c**) und 1.41 μM (**64c**) ermittelt werden, sodass *para*-modifizierte Moleküle offensichtlich den gewinnbringendsten Effekt hervorbrachten.

Tabelle 4.4.4: IC₅₀-Bestimmungen für ausgewählte Derivate gegenüber TBK1.

Verbindung	X	Y	Z	IC ₅₀ [μM] ^{a,b}
63c	H	H	F	0.84 ± 0.36
63d	H	H	CF ₃	0.29 ± 0.11
63e	H	H	Me	0.38 ± 0.10
63f	H	H	ⁱ Pr	0.34 ± 0.07
63g	H	H	^t Bu	2.66 ± 0.11
63h	H	H	OMe	0.65 ± 0.21
63i	H	H	NO ₂	0.06 ± 0.03
63j	H	H	NH ₂	0.73 ± 0.30
63a	H	H		1.13 ± 0.01
63b	H	H		2.50 ± 0.39
64a	H		H	>10
64b	H		H	>10
64c	H	NO ₂	H	1.41 ± 0.46
65a		H	H	ni ^c
65b		H	H	ni ^c
65c	NO ₂	H	H	2.35 ± 0.28
74a		-	-	0.36 ± 0.05
74b		-	-	3.76 ± 2.42
75		-	-	0.28 ± 0.03
Tozasertib	H	H		6.22 ± 2.86
BX795	-	-	-	0.004 ± 0.002
66	-	-	-	0.003 ± 0.001
67	-	-	-	0.009 ± 0.002

^a Drei unabhängige Experimente in Duplikaten^b Präinkubationsdauer: 30 min, ATP-Konzentration: 30 μM^c ni = nicht inhibierend bei 20 μM applizierter Molekülkonzentration

Die inhibitorische Aktivität der potentiell kovalent modulierenden Inhibitoren (**63a**, **64a**, **65a**), welche durch einen Michael-Akzeptor ausgezeichnet waren, wurde ebenfalls eruiert und kontrastiv in Bezug auf die korrespondierenden gesättigten Verbindungen analysiert. Dabei zeigte sich erneut, dass die Knüpfung von funktionellen Gruppen in 4-Position allen anderen Positionen am Aromaten zu bevorzugen war. Im Vergleich der Moleküle gleichen Typus, jedoch unterschiedlicher globaler Konfiguration, war der gleiche Trend zu beobachten. Während die Funktionalisierung mit Acrylamid in *para*-Position (**63a**) einen IC_{50} -Wert von $1.13 \mu\text{M}$ hervorrief, was einer fünffachen Verbesserung der Ursprungsstruktur ($6.22 \mu\text{M}$) entsprach, wurde bezüglich des *meta*-dekorierten Moleküls (**64a**) eine zu applizierende Menge von $>10 \mu\text{M}$ benötigt, um die Proteinaktivität auf 50% abzusenken. Im Falle des *ortho*-Derivats (**65a**) blieb der Effekt gänzlich aus. Auch die korrespondierenden Propionylamid-tragenden Verbindungen (**63a**, **64a**, **65a** $IC_{50} = 2.50 \mu\text{M}$ vs. $>10 \mu\text{M}$ vs. ni) zeigten analoges Verhalten. Es bestand also kein signifikanter Unterschied im Inhibitionsverhalten der potentiell kovalent modulierenden Analoga im Vergleich zu ihren entsprechenden reversiblen Pendants.

Die bereits eingangs erwähnten, im Zuge eines auf der kovalenten Adressierung der Rezeptortyrosinkinase EGFR basierenden Projekts hergestellten, Derivate (**74a,b**, **75**) zeigten eine deutliche Wirksamkeit hinsichtlich der Herabsetzung der TBK1-Aktivität im *in vitro* System. Dabei lagen die determinierten IC_{50} -Werte, trotz gleichen Grundgerüsts aber völlig unterschiedlichem Knüpfungspunkt des Elektrophils, mit $0.36 \mu\text{M}$ (**74a**) und $0.28 \mu\text{M}$ (**75**) in etwa im gleichen Bereich. Isoliert betrachtet spricht dieses Resultat dafür, dass die Existenz eines Acrylamids nicht für die erzielte Wirkung verantwortlich scheint, doch bei Betrachtung des reversiblen Analogons **74b** konnte ein circa zehnfacher Wirkungsverlust im Vergleich zu **74a** ($0.36 \mu\text{M}$ vs. $3.76 \mu\text{M}$) aufgezeigt werden, was mit einer kovalenten Modulation vereinbar ist. Für **75** konnte diese Parallele nicht gezogen werden, da ein reversibles Molekül nicht verfügbar war. Aus Zeitgründen wurden diese Verbindungen biochemisch nicht weiter auf ihr kompetitives Verhalten gegenüber ATP im aktivitätsbasierten Assay und damit mögliches kovalentes Bindungsverhalten hin untersucht.

Im Zuge der Analyse von BX795-Derivaten erfolgten neben der einfachen Evaluierung der IC_{50} -Werte unter Standardbedingungen ([ATP] und [Substrat] entsprechen in etwa deren K_M -Werten) auch Verdrängungsstudien auf Basis der Betrachtung einer konzentrationsabhängigen Konkurrenz von ATP mit dem entsprechenden Liganden. Reversibel bindende Liganden werden dabei durch hohe Konzentrationen an ATP aus der Bindungstasche verdrängt, während kovalent gebundene Effektoren nicht aus dieser entfernt werden können (vgl. Abbildung 4.22).

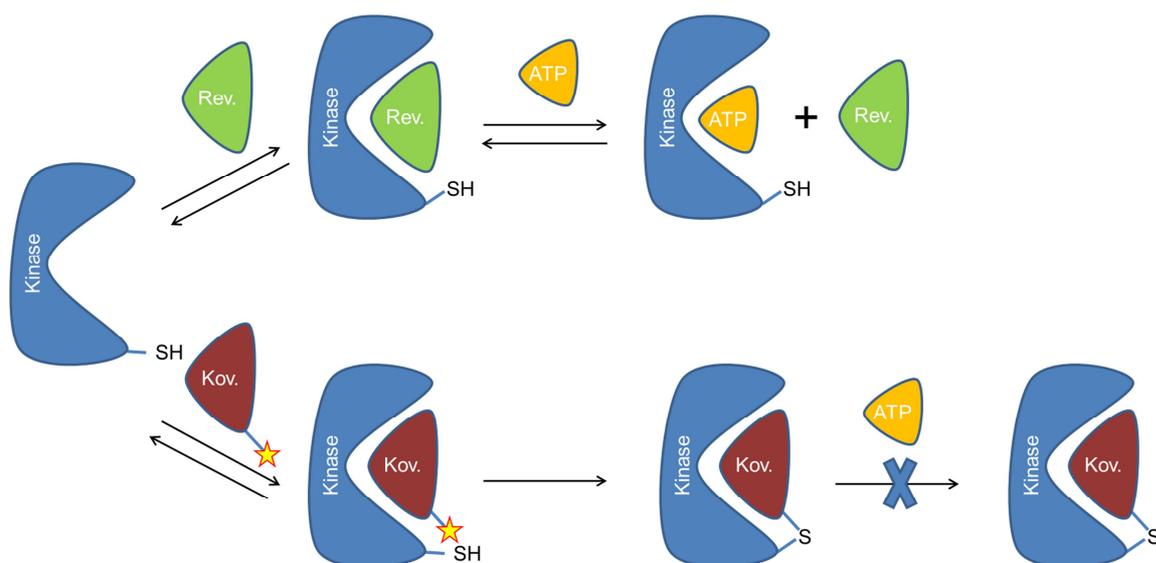


Abbildung 4.22: Grundlegender Mechanismus der (nicht-)kovalenten Inaktivierung einer prototypischen Kinase. Im Falle reversibler Bindung an das Target erfolgt eine Gleichgewichtsreaktion zwischen ATP und nicht-kovalent gebundenem Inhibitor. Dieses GGW kann analog dem Massenwirkungsgesetz durch Erhöhung der Konzentration eines der beiden Interaktionspartner verschoben werden (oben). Durch Bindungsbildung wird der entsprechende Ligand im aktiven Zentrum der Kinase fixiert und kann nicht durch ATP verdrängt werden (unten). Ein initialer reversibler Bindungsmodus erfolgt in beiden Fällen. (Rev. = Reversibel bindender Ligand; Kov. = Kovalent/irreversibel bindender Ligand; ★ = Elektrophil).

Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von **66** und **67** zu BX795 und der damit einhergehenden Annahme, dass der initiale Bindungsmodus durch den nicht veränderten Strukturteil mit hoher Wahrscheinlichkeit analog hervorgerufen wird, sollten im Falle kovalenter Bindung offensichtliche Unterschiede im Verdrängungsverhalten (**66/67** vs. BX795) zu observieren sein. Um einen möglichen kovalenten Bindungsmodus zu bestätigen wurde ebenfalls die Präinkubationsdauer der Derivate mit TBK1 verlängert, da diese mit standardmäßig 30 min möglicherweise zu kurz gewählt ist, um einen signifikanten Effekt der mit Michael-Akzeptor ausgestatteten Moleküle gegenüber den reversiblen Verbindungen herauszustellen. Aus literaturbekannten Arbeiten ist bekannt, dass die Kinetik der vollständigen kovalenten Bindungsbildung und somit ein signifikanter Effekt durchaus mit einer Inkubationsdauer von 90-120 min assoziiert ist.³² Analog der üblichen IC_{50} -Bestimmungen wurde eine gleichbleibende Verdünnungsreihe an zu untersuchender Verbindung appliziert und die Änderung des IC_{50} -Wertes nach unterschiedlicher Präinkubationszeit und Gegenwart verschiedener ATP-Konzentrationen beobachtet (Tabelle 4.4.5 und Abbildung 4.23).

Tabelle 4.4.5: ATP-Kompetitionsexperimente mit BX795 und der potentiell kovalenten Analoga **66** und **67**. Aufgrund abnehmender Proteininstabilität konnten fundierte Daten lediglich bis zu einer Präinkubationsdauer von 120 min erhoben werden. Die Werte, welche unter Verwendung der Standardkonzentration an ATP (30 μ M) eruiert wurden sind grau unterlegt dargestellt.

		IC ₅₀ [nM] ^a											
Verbindung		BX795				66				67			
ATP [μ M]		30	90	180	900	30	90	180	900	30	90	180	900
Präinkubation [min]	0	2.4 \pm 1.3	4.9 \pm 3.4	13.5 \pm 0.8	29.7 \pm 13.7	3.7 \pm 1.2	6.5 \pm 2.3	13.1 \pm 5.6	21.2 \pm 4.9	4.1 \pm 0.7	17.4 \pm 13.3	23.1 \pm 13.5	36.3 \pm 7.4
	30	3.5 \pm 1.0	11.7 \pm 0.3	19.2 \pm 7.4	64.9 \pm 8.1	2.5 \pm 0.1	5.0 \pm 1.0	14.2 \pm 11.5	46.8 \pm 20.1	8.8 \pm 2.3	11.9 \pm 2.5	29.0 \pm 9.7	84.7 \pm 28.6
	90	4.2 \pm 1.7	13.5 \pm 0.3	53.7 \pm 7.4	146 \pm 8.1	4.8 \pm 2.6	6.7 \pm 5.7	30.4 \pm 7.3	97.3 \pm 93.4	5.4 \pm 2.6	10.5 \pm 3.9	48.8 \pm 10.5	239 \pm 24.0
	120	6.0 \pm 0.5	15.4 \pm 1.2	49.4 \pm 5.1	226 \pm 18.3	3.4 \pm 1.4	8.6 \pm 6.1	29.5 \pm 9.3	116 \pm 15.9	17.4 \pm 11.5	31.9 \pm 6.9	52.5 \pm 20.7	186 \pm 64.4
	180 ^a	28.5	48.4	51.1	180	7.4	14.2	10.4	68.9	25.8	33.5	35.4	243
	240 ^a	27.7	42.5	55.2	238	8.0	15.0	25.1	87.5	22.3	11.1	81.9	278

^a Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten

Charakteristisch für reversibel bindende Moleküle lässt sich für BX795 ein Anstieg des IC₅₀-Wertes mit erhöhter Konzentration an ATP determinieren. Dieses Resultat konnte für Präinkubationszeiten zwischen 0 und 120 min belegt werden. So wurde beobachtet, dass ohne eine Vorbehandlung der Kinase mit Inhibitor der IC₅₀-Wert von 2.4 nM bei Standardbedingungen (30 μ M ATP) um das ca. 12-fache ansteigt, wenn 900 μ M des Cosubstrats eingesetzt werden. Ein Trend, welcher durchgängig zu beobachten war und mit steigender Inkubationsdauer deutlich signifikanter ausfiel. So war bei einer Vorinkubation von 120 min im Vergleich der niedrigsten zur höchsten applizierten Menge an ATP (30 μ M vs. 900 μ M) ein 38-facher Anstieg der mittleren inhibitorischen Konzentration von 6.0 nM auf 226 nM herausstellbar. Ähnliche Verhältnisse wurden für Inkubationszeiten von 30 min und 90 min offenbar (19- bzw. 35-fach). Auffällig war, dass mit erhöhter Inkubationsdauer bei gleicher ATP-Konzentration auch ein erhöhter IC₅₀-Wert detektiert wurde. Nichtsdestotrotz lagen die Werte unter Verwendung von Standardbedingungen (vgl. Tabelle 4.4.5) im Bereich des literaturbekannten Referenzwertes von \approx 3-6 nM (bei Verwendung von 50-100 μ M ATP).^{87, 175} Eine weitere Verlängerung der Präinkubation führte allerdings zu signifikanten Erhöhungen der IC₅₀-Werte (\approx 28 nM bei 180-240 min) und andererseits zur dramatischen Verringerung des Assayfensters (Daten nicht gezeigt), so dass davon auszugehen war, dass die Proteininstabilität mit zunehmender Präinkubation bei RT abnimmt und keine verlässlichen Datenpunkte bei einer Inkubation >120 min generiert werden können. Für BX795 konnte dennoch eindeutig belegt werden, dass ein reversibler Bindungsmodus vorliegt, da durch Erhöhung der ATP-Konzentration im Assaysystem eine kompetitive Verdrängung erfolgt.

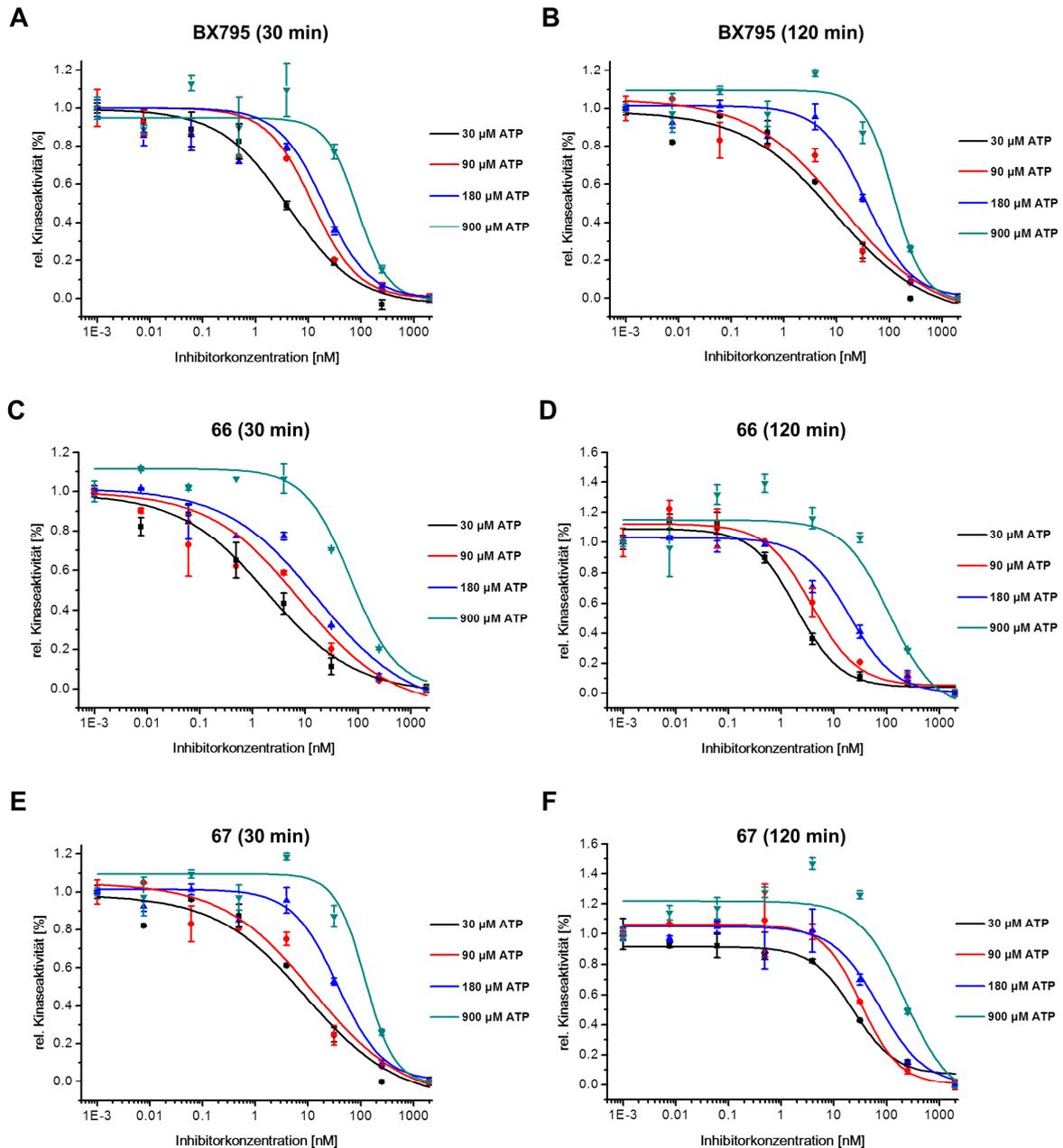


Abbildung 4.23: Exemplarische Bestimmung der IC₅₀-Werte von BX795, **66** und **67** in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an ATP (30-900 μM) sowie unterschiedlicher Präinkubationszeiten (30 und 120 min).

Dem rationalen Design und den Vorüberlegungen entsprechend sollten die Resultate für die kovalenten Modulatoren different ausfallen, da durch die Ausbildung eines irreversibel gebildeten Enzym-Ligand-Komplexes die Verdrängung des Inhibitors durch ATP und damit die Reaktivierung der Enzymaktivität nicht erfolgen kann (Abbildung 4.22). Bei Betrachtung des Analogons **67**, ausgestattet mit flexibler Propylkette und terminalem Acrylamid, zeigt sich der gleiche Trend, welcher auch schon bei der Urverbindung BX795 beobachtet wurde. Durchweg konnte mit steigender ATP-Konzentration auch ein gleichzeitiges Ansteigen des

IC₅₀-Wertes detektiert werden. Ohne Vorbehandlung trat dabei eine ca. 9-fache Steigerung von 4.1 nM auf 36.3 nM bei 30 bzw. 900 μM ATP hervor, während auch bei steigender Präinkubationszeit, beispielsweise für 90 min eine Vervielfachung von 44-fach (5.4 nM vs. 239 nM) aufgetreten war. Bei weiter verlängerter Präinkubation (120 min) war zwar der Faktor der IC₅₀-Erhöhung (10-fach) im Gesamtvergleich eher marginal, doch die absoluten Werte sowie Standardabweichungen stiegen ebenfalls (IC₅₀ = 17.4 nM bei 30 μM ATP). Diese Resultate unterstützen die These, dass **67** keinen kovalent bindenden Inhibitor in Bezug auf TBK1 darstellt, sondern dieser vielmehr eine reversible Protein-Ligand-Interaktion eingeht.

Unter Betrachtung der racemischen Verbindung **66** und der schrittweise erhöhten ATP-Konzentration (30-900 μM) in der Studie, konnte ebenfalls eine Cofaktor-abhängige Zunahme der IC₅₀-Werte festgestellt werden, jedoch nicht in dem Umfang wie es für die beiden Vorgängersubstanzen gezeigt wurde. Während bei ausgelassener Vorinkubation ein moderater Anstieg der IC₅₀-Werte von 3.7 nM auf 21.2 nM eruiert wurde (bei 30 bzw. 900 μM ATP), konnte nach 90 und 120 min Inkubation ein 20- bis 31-facher Anstieg der mittleren inhibitorischen Konzentration von 4.8 auf 97.3 nM bzw. 3.7 auf 116 nM beobachtet werden. Grundsätzlich betrachtet bekräftigen diese Tatsachen, nämlich die geringe Erniedrigung der inhibitorischen Effektivität bei Erhöhung der ATP-Konzentration von 30 auf 900 μM, die Annahme einer zumindest in Teilen kovalenten Adressierung von TBK1 durch **66**, jedoch nicht in zufriedenstellendem Maße. In diesen Resultaten schlägt sich der Nachteil der Verwendung eines Racemats nieder, denn unter der Annahme, dass der modellierte Bindungsmodus tatsächlich eintritt, würde im Falle der potentiell optimalen Geometrie des *R*-Enantiomers eine große Wahrscheinlichkeit der Formierung einer kovalenten Bindung bestehen. Im entgegengesetzten Fall des *S*-Enantiomers jedoch fehlt die räumliche Nähe für die Ausbildung dieser Modifikation völlig und so liegen im Racemat de facto 50% eines reversiblen Binders vor (vgl. Abbildung 4.24). Dies hat zur Folge, dass unter Annahme einer 1:1-Belegung des aktiven Zentrums mit *R*- bzw. *S*-Enantiomer unter statistischem Gesichtspunkt 50% des Mischliganden durch ATP wieder verdrängt werden können und somit der IC₅₀-Wert zwar steigt, aber dies nicht in vergleichbarer Evidenz wie im Falle von BX795 und **66**. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint es unumgänglich, zunächst das *R*-Enantiomer zu isolieren und dieses anschließend den Studien zur kovalenten Adressierung von TBK1 zu unterziehen, um eine definitive Aussage über den Wirkmechanismus von treffen zu können und diese Spezies gegebenenfalls als chemische Sonde zur weiteren Untersuchung der biologischen Funktion von TBK1 einzusetzen.

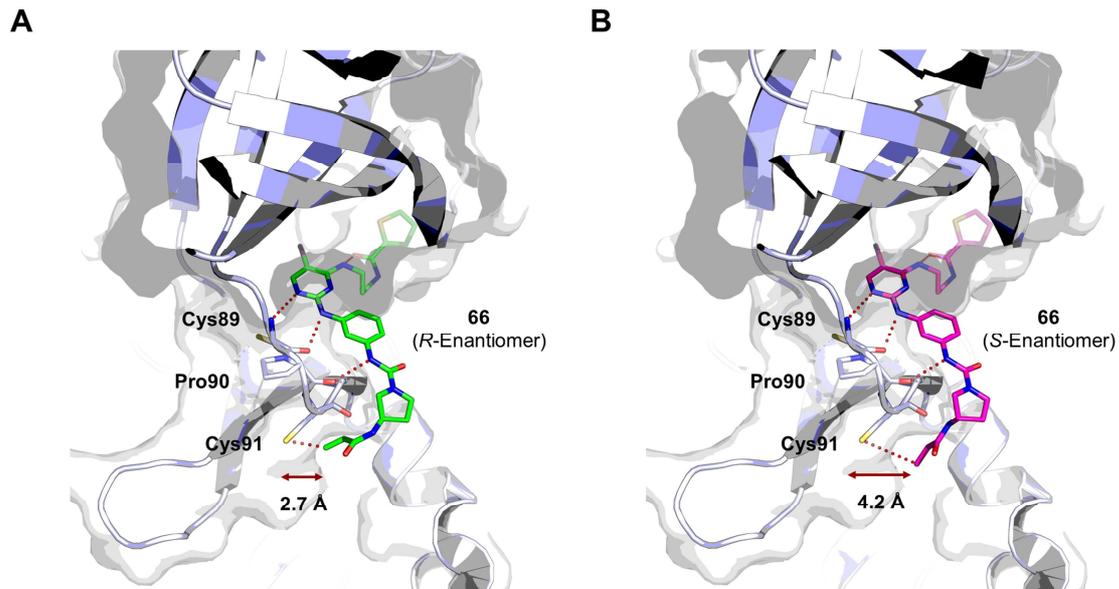


Abbildung 4.24: Gegenüberstellung der Einführung eines Acrylamids in **66** mit **A)** *R*- sowie **B)** *S*-konfiguriertem Knüpfungszentrum an 3-Position des terminalen Pyrrolidins. Die Abstände zwischen terminalem Kohlenstoff beziffern sich auf circa 2.7 Å (*R*-Enantiomer) und 4.2 Å (*S*-Enantiomer).

Die Gründe für die unterschiedliche Reaktivität der beiden Michael-Akzeptor tragenden Derivate **66** und **67** bezüglich ihrer potentiell reversiblen bzw. irreversiblen Modulation können auf ihre unterschiedliche Struktur zurückgeführt werden. Die Einführung mehrerer Freiheitsgrade (Propylkette) in **67**, um die Chance zu erhöhen durch Adaption multipler Konformationen statistisch betrachtet auch die räumliche Nähe zum Cys91 (zumindest partiell) abzudecken, führt jedoch auch dazu, dass die Präorganisation des Michael-Akzeptors wie im analogen Pyrrolidin-Molekül **66** aufgehoben wird und durch die hohe Dynamik mutmaßlich keine Reaktion oder lediglich in geringerem Maße mit dem gewünschten Cystein erfolgen kann. Eine vollständige oder partielle Bindungsbildung von **67** zu TBK1 unter Berücksichtigung des kinetischen Aspekts und der großen Anzahl an Freiheitsgraden würde weiterhin deutlich längere Inkubationszeiten in Anspruch nehmen im Vergleich zu rigiden und präorganisierten Grundgerüsten.¹⁸⁴

Aufbauend auf den Verdrängungsstudien können massenspektrometrische Analysen, gekoppelt mit vorhergehendem tryptischen Verdau, des kovalenten Protein-Ligand-Addukts Aufschluss über die Art der Modulation liefern. Dazu sind jedoch Mengen an Protein nötig, die im Rahmen des Projekts nicht zur Verfügung standen.

4.4.6 Zelluläre Charakterisierung

In Verbindung mit Untersuchungen zur generellen Aktivität der Inhibitoren im zellulären System wurden humane alveolar Adenokarzinomzellen (A549) verwendet, welche eine Abhängigkeit von TBK1 aufweisen und so die Proliferations- bzw. Überlebensrate direkt an die Anwesenheit eines einzelnen Enzyms gekoppelt ist.¹⁵⁷ Zunächst wurde die *KRAS*-mutierte Adenokarzinomlinie A549, deren Abhängigkeit von TBK1 durch Barbie *et al.*⁵¹ in *knock out* Studien belegt wurde, für 96 h mit BX795 als auch **66** und **67** inkubiert. Die Viabilität wurde anschließend mit Hilfe des *Cell Titer-Glo* Assays (Promega GmbH) über Lumineszenzmessungen determiniert und diese in Relation zur DMSO-Kontrollstudie gegen die verwendete Inhibitorkonzentration aufgetragen (Abbildung 4.25). H1437 diente als *KRAS*-Wildtyp Referenzzelllinie, deren Überleben nicht durch TBK1-*knock out* beeinflusst wird.

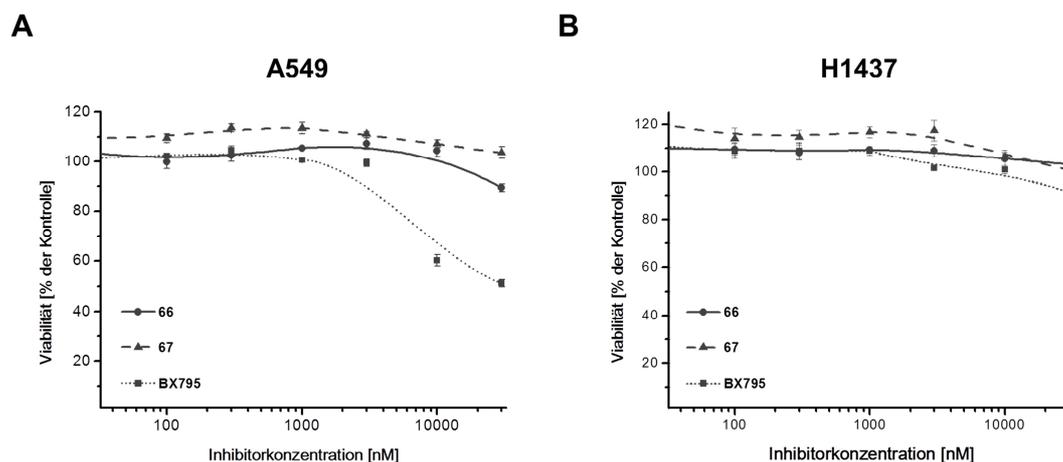


Abbildung 4.25: Viabilitätsassay für ausgewählte Verbindungen gegenüber der *KRAS*-mutierten und TBK1-abhängigen Adenokarzinomlinie K549 sowie der Referenzzelllinie H1437.

Unter keiner der eingesetzten Inhibitor Dosen von **66** und **67** (0.003-30 μM) konnte ein Effekt auf die Viabilität der Zelllinien beobachtet werden. Die relative Gesamtzellzahl blieb in allen Fällen auf konstantem Niveau im Bereich von 100%. Lediglich die Referenzverbindung BX795 zeigte eine mäßige Reduktion der absoluten Zellzahl auf ca. 60% bei 10 μM und 30 μM applizierter Substanzkonzentration. Da Vorgängerstudien belegen, dass zumindest BX795 eine gewisse Zellpermeabilität gewährleistet,¹⁷⁶ und die strukturellen Veränderungen, zumindest im Falle von **66** mutmaßlich geringe Auswirkung auf Löslichkeit und Zellpenetration der Verbindungen besitzen, mag dieses Resultat nicht auf der Unfähigkeit der Verbindungen beruhen, die zelluläre Membranbarriere zu passieren. Möglicherweise ist dies vielmehr ein Indiz dafür, dass a) TBK1 im zellulären System nicht oder nur in geringem

Maße durch die verwendeten Inhibitoren adressiert wird oder b) die Kinaseaktivität nicht die treibende Kraft für die Abhängigkeit der Zellen von TBK1 ist und deren Aufhebung somit keinen Effekt nach sich zieht. Aus weiteren Untersuchungen geht hervor, dass diese Kinase über ihre Transferaseaktivität hinaus auch wichtige strukturgebende Aufgaben innerhalb von Adapterproteinkomplexen besitzt,¹⁵⁸ welche zur Weiterleitung äußerer Signale, hervorgerufen durch TLR-Aktivierung, dienen. Barbie *et al.*⁵¹ zeigten jedoch die Abhängigkeit *KRAS*-mutierter Krebszellen von TBK1 durch *knock out* Studien unter Verwendung von shRNA, welche den Gesichtspunkt der (potentiellen) Gerüstfunktion allerdings völlig vernachlässigten, da diese Methode drauf basiert, das Protein substanziell aus dem zellulären Umfeld zu entfernen. Aus diesem Grund ist die Verwendung chemischer Sonden zur orthogonalen Validierung des Zielenzym essentiell. Weitere Untersuchungen, um die generelle Zellpermeabilität der Verbindungen als auch die gerüstgebende Funktion von TBK1 im zellulären Netzwerk zu untersuchen sind daher unumgänglich.

4.4.7 Generierung von Sonden für das unerforschte Kinom

Das in weiten Teilen unerforschte Kinom (Musterbeispiel: TBK1) stellt eine besondere Herausforderung in der Etablierung neuer Kinaseinhibitoren für die klinische Anwendung dar, denn *off-target*-Effekte können vielfach der Adressierung von biologisch und pharmakologisch wenig untersuchten Targets zugeordnet werden.^{39, 185} Um diese nicht untersuchten Kinasen biologisch zu evaluieren und das pharmakologische Verständnis zu fördern braucht es qualitativ hochwertige und selektive chemische Sonden, da orthogonale Systeme zur Target-Identifizierung und Entschlüsselung biologischer Netzwerke wie die Anwendung von RNAi und genetischer *knock out* Studien nicht zwischen der katalytischen und strukturgebenden Relevanz des Zielproteins unterscheiden können. Aktuell bieten Unternehmen wie GSK (Boston, MA) und Roche (Basel) dem akademischen Umfeld repräsentative Auszüge ihrer Substanzbibliotheken für die Auffindung von Startpunkten zur Entwicklung niedermolekularer Sonden an, um die Adressierung der wenig erforschten Zielkinasen des Kinoms voranzutreiben.³⁹ Ein Screening dieser Bibliotheken erscheint durchaus sinnvoll, da diese bekannte Template zur Kinaseinhibition enthalten und so großes Potential für die Grundlagenforschung in Bezug auf die Entschlüsselung biologischer Netzwerke bergen.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden repräsentative Auszüge großer Substanzbibliotheken bezogen („GSK“- , „Roche“-Bibliothek) und für weitere Durchmusterungsstudien in Bezug auf TBK1 verwendet. Die Vorteile hinsichtlich der Verwendung dieser Zusammenstellungen liegen darin, dass sie einerseits kostenfrei zur Verfügung gestellt wurden, und andererseits stellen die Vertreter dieser Bibliotheken schon über Jahre hinweg die strukturelle Grundlage für die industrielle Forschung dar und liefern so grundlegendes Potential zur Auffindung attraktiver - jedoch bekannter - Strukturen. TBK1 stellt dabei ein Musterbeispiel zur Erforschung dar, da dieses wie eingangs erwähnt in Verbindung zu klinischer Relevanz steht und zudem wenig über Funktionsweise und Regulation im komplexen Signalnetzwerk bekannt ist. Aus diesen Gründen wurden beide Substanzkollektionen in einer Durchmusterungsstudie im aktivitätsbasierten *in vitro* Assaysystem (KinEASE™) bei einer Konzentration von 10 μ M auf die Existenz potentieller TBK1-Modulatoren hin untersucht.

Dabei wies die „GSK“-Bibliothek eine sehr hohe Diversität bezüglich der implementierten chemischen Strukturen auf, und so konnten im ersten Schritt aus 360 vorhandenen Strukturen in einem einmalig durchgeführten Screening 59 Trefferverbindungen identifiziert werden, die eine verbleibende Kinase-Restaktivität im Bereich von $\leq 25\%$ herbeiführten (Abbildung 4.26). Dies entsprach einer Trefferrate von 16.4%, wobei elf unterschiedliche Grundgerüste mit jeweils mindestens zwei Vertretern determiniert werden konnten.

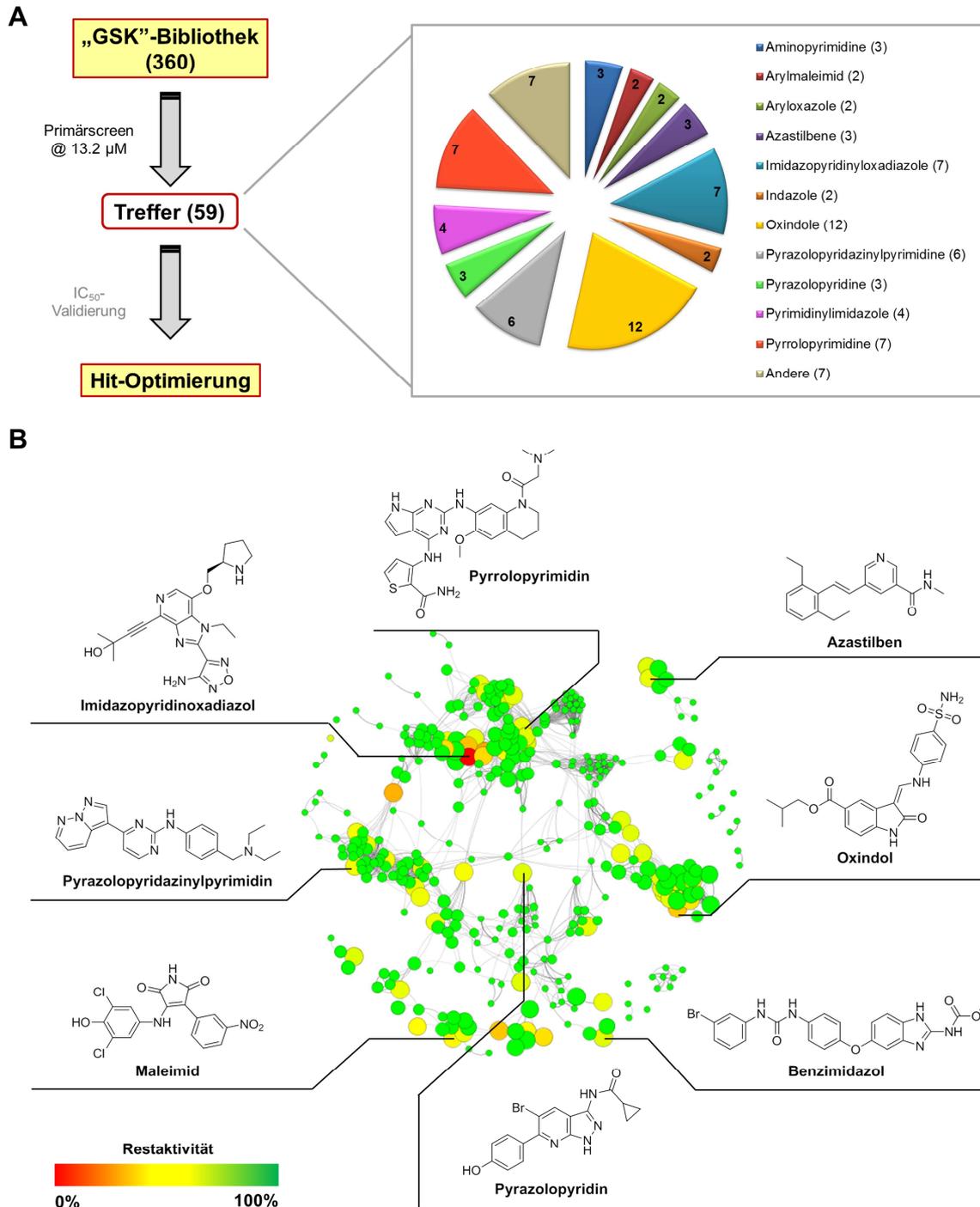


Abbildung 4.26: A) Allgemeine Vorgehensweise zur Durchmusterung der „GSK“-Bibliothek (Bedingungen: [TBK1] = 11.7 nM, [ATP] = 30 μ M, [Substrat] = 1 μ M, Vorinkubation: 30 min, Kinasereaktion: 110 min, Z' = 0.77) sowie kompositionelle Zusammensetzung der verwendeten Bibliothek; B) Clusteranalyse, durchgeführt mit der frei zugänglichen Software SARANEA,¹³⁶ zur Visualisierung der unterschiedlichen chemischen Grundgerüste, die zur Herabsetzung der Kinaseaktivität auf $\leq 25\%$ führten. Die Farbe der Kreise determiniert für die hervorgerufene inhibitorische Aktivität, während deren Größe die Diskontinuität zur SAR mit strukturell verwandten Molekülen illustriert (marginale strukturelle Veränderungen bedingen signifikante Änderungen der Aktivität).

Unter diesen waren die als promiskuitiv bekannten Oxindole (Restaktivität: 2-24%), Pyrimidine (16-24%) und auch Staurosporin-ähnliche Grundgerüste ($\approx 10\%$), aber auch substituierte Imidazopyridine (2-21%) und Pyrazolopyridazinylpyrimidine (1-23%) sowie Benzpyrazole (15-25%), um nur einige der vertretenen Strukturen zu nennen. In der Cluster-Analyse wird deutlich, dass aus diversen Bereichen der strukturell hochgradig inhomogenen Bibliothek potentielle Binder hervorgingen und diese mögliche Ansatzpunkte für weitere Studien zur Generierung chemischer Sonden repräsentieren (Abbildung 4.26).

Innerhalb der zweiten zur Verfügung gestellten Bibliothek („Roche“), die kompositionell weniger divers zusammengesetzt war, waren im Vergleich zur „GSK“-Bibliothek deutlich unterschiedliche Grundgerüste, darunter auch Peptidomimetika, enthalten. Den größten Teil aller Strukturen (235) repräsentierten dabei die 2,3-Bisarylmaleimide (94/235) gefolgt von Pyridopyrimidinonen und Chinolinythiazolidinonen (beide 35/235) sowie substituierten Pyrazolen (31/235). Der Schwellenwert für die Selektion potenter Inhibitoren wurde in diesem Fall bereits bei $\leq 20\%$ gesetzt, da eine Vielzahl der eingesetzten Verbindungen eine signifikante Inhibition von TBK1 zeigte und auf diese Weise die Anzahl der zu validierenden Strukturen wesentlich reduziert wurde. Dennoch wurden mit einer Trefferrate von 34% im Screening 80 Verbindungen identifiziert, von denen ein wesentlicher Teil (45) aus der Substrukturklasse der substituierten 2,3-Bisarylmaleimide stammte und eine verbleibende Restaktivität im Bereich von 0-20% abdeckte. Auch die Chinolinythiazolidinone repräsentierten einen Großteil der identifizierten Verbindungen (16) mit signifikanter Reduktion der TBK1-Kinaserestaktivität (1-18%), während unter den Pyridopyrimidinonen lediglich ein Treffer war (1% Restaktivität). Dies stellt jedoch ein Indiz dafür dar, dass in diesem Fall, aufgrund der Präsenz vieler strukturell konservierter Grundgerüste ohne inhibitorische Potenz, ein falsch-positiver Hit vorliegt. Möglicherweise gilt dies auch für die Pyrazole, unter denen lediglich drei potente Verbindungen waren, die die Transferaseaktivität auf 0% absenkten, jedoch keine andere der verwandten Strukturen einen Effekt zeigte. Sofern der Effekt jedoch in Validierungsexperimenten bestätigt werden kann, liefern die Pyrazole einen interessanten Startpunkt für weitergehende Studien. Eine ebenfalls vielversprechende Molekülklasse mit signifikanter inhibitorischer Wirkung stellten die Dihydrobenzopyrazolodiazepine mit vier inhibitorisch aktiven Verbindungen dar (Restaktivität: 1-20%).

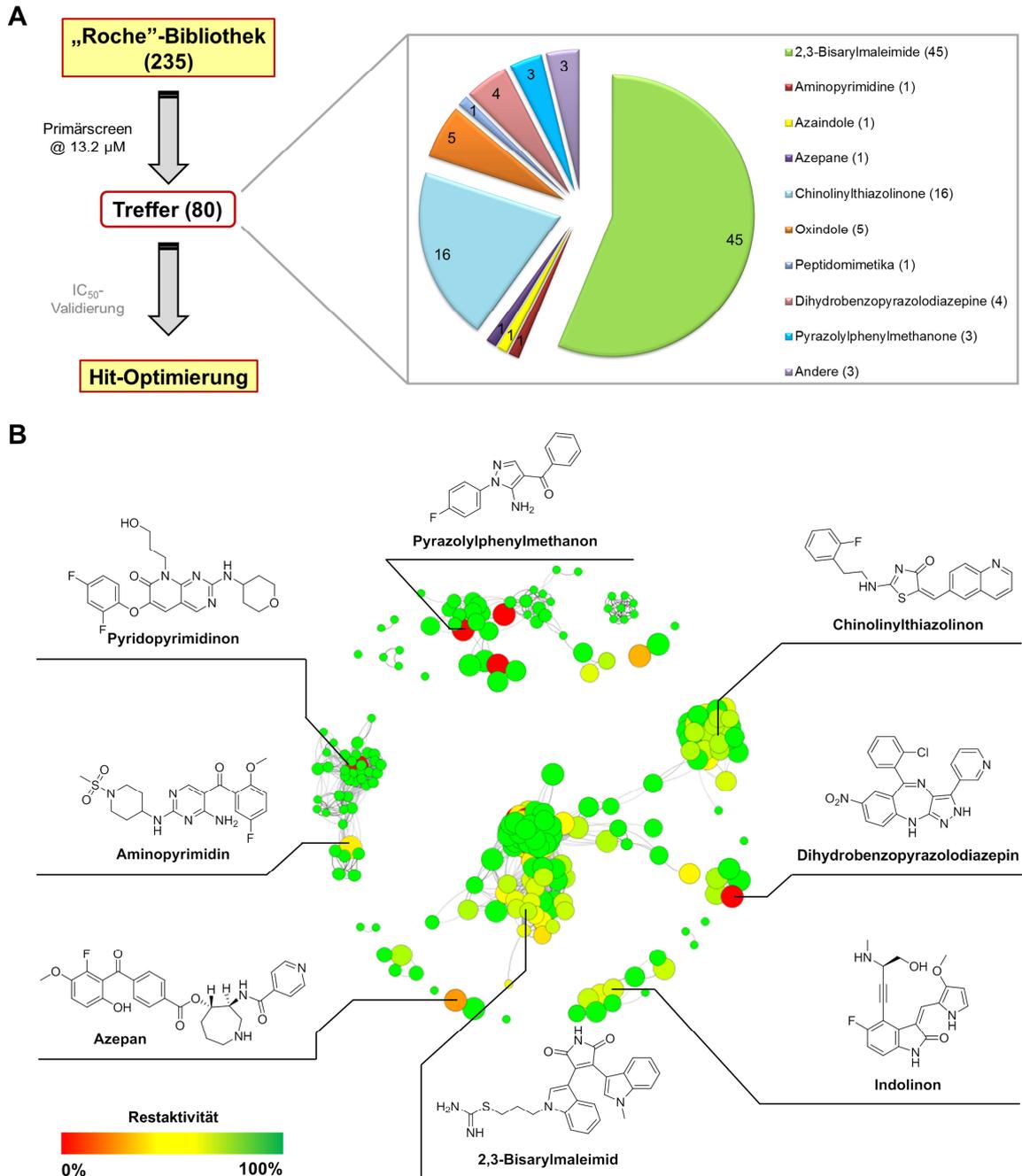


Abbildung 4.27: **A)** Allgemeine Vorgehensweise zur Durchmusterung der „Roche“-Bibliothek sowie die kompositionelle Zusammensetzung der Treffergerüststrukturen; (Bedingungen: [TBK1] = 11.7 nM, [ATP] = 30 μM , [Substrat] = 1 μM , Vorinkubation: 30 min, Kinasereaktion: 110 min, $Z' = 0.68$; **B)** Clusteranalyse, durchgeführt mit der frei zugänglichen Software SARANEA,¹³⁶ zur Visualisierung der unterschiedlichen chemischen Grundgerüste, die zur Herabsetzung der Kinaseaktivität auf $\leq 20\%$ führten. Die Farbe der Kreise determiniert für die hervorgerufene inhibitorische Aktivität, während deren Größe die Diskontinuität zur SAR mit strukturell verwandten Molekülen illustriert (marginale strukturelle Veränderungen bedingen signifikante Änderungen der Aktivität).

Im Rahmen aufbauender Projekte wird die abschließende Validierung der initial herausgefilterten Strukturen durch Determinierung der IC_{50} -Werte angestrebt. Anschließend bilden die verbleibenden Moleküle die Basis rationaler Weiterentwicklungen zu selektiven chemischen Sonden und synthetischer Erschließung geeigneter Hit-Derivate und tragen damit gegebenenfalls zur Entschlüsselung des TBK1-Signalnetzwerks auf zellulärer Ebene bei.

4.4.8 Ausblick

Gerade in Bezug auf die Untersuchung von TBK1 als Zielprotein ist in der Literatur wenig über die biologische Funktion dieser Kinase bekannt.^{168, 169} Daher braucht es weitere Studien zur Auffindung von Strukturen, die als chemische Sonden geeignet sind, dieses Enzym selektiv zu adressieren, um in chemisch-genetischen Ansätzen die Funktion zu evaluieren. Zudem können über solche Ansätze ebenfalls hochselektive und effektive niedermolekulare Verbindungen generiert werden, die das Potential bieten als Wirkstoffe zu fungieren. In Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit hervorgebrachten Hit-Strukturen ist die Durchführung weiterer Optimierungsstudien unumgänglich, um die Verbindungen einerseits als chemische Sonden und andererseits als effiziente kovalent sowie reversibel modulierende Inhibitoren einzusetzen. Da im Falle der racemischen Verbindung **66** keine zufriedenstellende Aufklärung über die Art und Weise der Interaktion mit dem Zielprotein herausgestellt werden konnte, sollte die enantiomerenreine Synthese bzw. Separation des Racemats verfolgt werden. Orthogonale Verfahren zur Evaluierung einer möglichen kovalenten Modulation sowie der Verweildauer der Inhibitoren am Target, wie z.B. von Copeland *et al.* beschrieben,⁸³ sollten ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Weiterhin ist eine tiefergehende Untersuchung der Verbindungen in zellbasierten Experimenten (z.B. chemischer *knock-down* in *bump and hole* Ansätzen) essenziell für eine weitergehende Evaluierung der biologischen Funktion von TBK1 und sollte weiter vorangetrieben werden. Im Zuge dieser Verfahrensweisen kann ebenfalls geklärt werden, inwieweit TBK1 in *KRAS*-mutierten Krebszellen als essentiell erachtet werden kann und weiterhin, ob diese Relevanz auf der gerüstgebenden Funktion oder der Transferaseaktivität basiert.

Die zukünftige Identifizierung und Validierung neuer chemischer Grundgerüste zur Adressierung von TBK1 basierend auf repräsentativen Substanzbibliotheken (wie z.B. GSK und Roche) bietet weiterhin großes Potential für die medizinisch-chemische Entwicklung von Sondenmolekülen zur Analyse der Netzwerkstruktur von TBK1 in chemisch-genetischen Verfahren.

5 Strukturbiologische Untersuchungen an Kinasen

Strukturbiologische Untersuchungen stellen einen eminent wichtigen Baustein in der Anwendung der heutigen Medizinischen Chemie sowie der Chemischen Genetik dar. Erst durch die Kenntnis der 3D-Struktur eines Zielproteins können rationale Ansätze zum Design von Liganden verfolgt werden, die zur Generierung von Sonden zur weiteren Untersuchung der biologischen Funktion eines spezifischen Targets herangezogen werden können. Ebenso können diese auch als direkte Inhibitoren des Enzyms Verwendung finden und somit eine wertvolle Grundlage für die Entwicklung und Optimierung von Therapeutika für klinische Ansätze darstellen. Das Prinzip der Röntgenkristallographie beruht auf der Fähigkeit von Kristallen, und hier im Speziellen Proteinkristallen, monochromatische Röntgenstrahlung zu beugen. Die gekrümmte Strahlung wird von einem Detektor erfasst und auf diese Weise Beugungsbilder mit einer regelmäßigen Anordnung an Reflexen generiert. Um einen vollständigen Satz an nicht redundanten Reflexen zu erhalten, wird der Kristall im Röntgenstrahl rotiert und mit Hilfe der Gesamtheit der erhaltenen Beugungsbilder aus Position und Intensität dieser Reflexe auf die Symmetrie des Kristallgitters rückgeschlossen. Dazu werden den Reflexen distinkte Werte, die sog. Miller'schen Indizes (h, k, l), zugeordnet und die erhaltenen Daten somit reduziert und vereinfacht (Indizierung und Integration).

Aus der Intensität kann durch Fouriertransformation die Strukturfaktoramplitude eines jeden Strukturfaktors, gegeben durch jeden einzelnen Reflex, berechnet werden. Die zugehörige Phaseninformation kann aus den erhaltenen Daten jedoch nicht berechnet werden. Diese Information kann aber durch verschiedene Methoden, beispielsweise molekularen Ersatz und geeigneter Rotations- und Translationssuche mit dem Templat einer verwandten Proteinstruktur, generiert werden. Basierend auf der Information der experimentell bestimmten Länge und auf Grundlage eines Templates berechneten Phasenwinkel jedes Strukturfaktors (Modell) kann anschließend durch Fouriertransformation eine Elektronendichtekarte erzeugt werden. Abschließend wird die Aminosäuresequenz des untersuchten Proteins in die Dichte eingepasst und das Modell verfeinert bis die statistisch ermittelten R-Werte solide Größen (<25%) aufweisen. Diese bewerten die Qualität der generierten Struktur, indem sie die mittlere statistische Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden angeben.

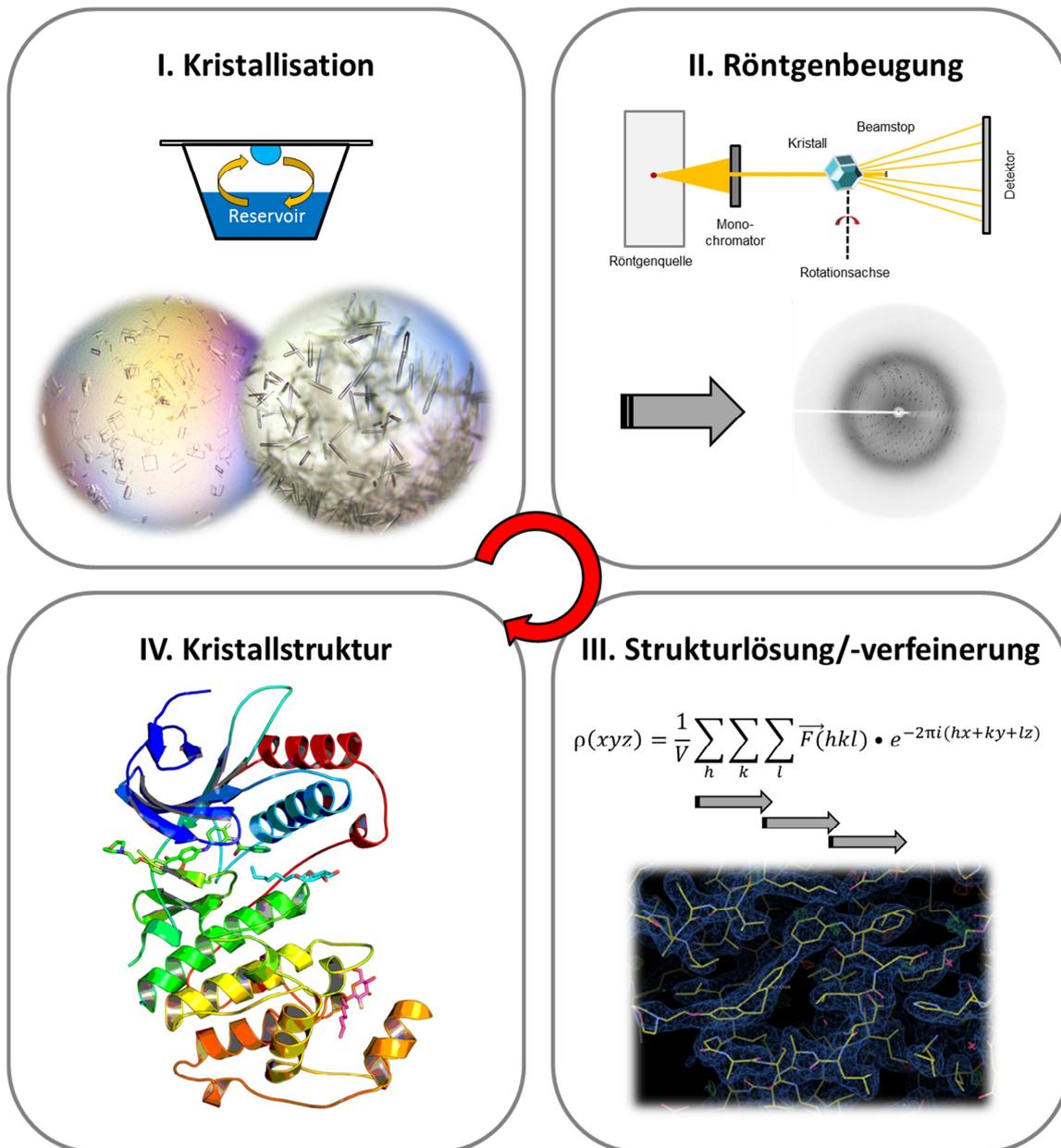


Abbildung 5.1: Vorgehensweise zur Generierung von Komplexkristallstrukturen. **I)** Kristallisation in Gegenwart vom zu untersuchenden Liganden mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode (hängender Tropfen); **II)** Datensammlung durch Aufnahme von Beugungsbildern im Röntgenstrahl; **III)** Datenanalyse sowie molekularer Ersatz und Verfeinerung des Modells anhand der generierten Elektronendichte; **IV)** Finale, verfeinerte Struktur inklusive definierter, übergeordneter Strukturelemente.

Im Rahmen von Kooperationsprojekten wurden Kristallisationssysteme zur Charakterisierung der Bindungsmodi von Liganden im Komplex mit den Wildtypformen der Kinasen p38 α und cSrc genutzt.

5.1 Neuartige Scharnierregion-bindende Fragmente durch strukturbasiertes *de novo* Design

Es existieren zwei Hürden, die überwunden werden müssen, um Kinasen als Zielenzyme in der Wirkstoffforschung erfolgreich mit niedermolekularen Verbindungen zu adressieren: Einerseits bereitet die Feinabstimmung der Selektivitätsprofile von Kinaseinhibitoren und im Speziellen das Erreichen von Selektivität bei der Adressierung der hoch konservierten ATP-Bindetasche große Probleme.^{34, 186} Andererseits ist die Identifizierung von nicht IP-geschützten Strukturen essentiell, um im kommerziellen Sektor der Wirkstoffentwicklung zu operieren.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Das Auffinden neuartiger chemischer Grundgerüste, die nicht patentrechtlich als geistiges Eigentum geschützt sind, stellt jedoch eine große Herausforderung im Bereich der Kinaseforschung dar. Vielfach wird für die Durchführung von HTS-Ansätzen bzw. im virtuellen oder Fragment-basierten Screening auf kommerziell erhältliche Bibliotheken zurückgegriffen, die zwar problemlos verfügbar sind, jedoch in vielen Fällen ausschließlich bekannte Kernstrukturen beinhalten und so ein lediglich sehr beschränkter struktureller Raum abgedeckt wird, der zumal auch patentrechtlich oftmals bereits erschlossen ist. Das limitiert wiederum auch den chemisch verfügbaren Raum für die weitere Entwicklung und daher braucht es neue Techniken, um unbekannte Kerngerüste zu identifizieren, die nicht für die Inhibition von Kinasen patentiert oder bekannt sind. Aus diesem Grund gehen viele Unternehmen dazu über ihre Bibliotheken mit Fragmenten zu erweitern, die nicht kommerziell erhältlich sind.¹⁹⁰⁻¹⁹⁴

In der Arbeitsgruppe um Dr. Ruth Brenk an der Drug Discovery Unit der University of Dundee wurde eine Methode zum strukturbasierten *de novo* Design auf der Basis Kinaseartiger sowie synthetisch realisierbarer, Scharnierregion-bindender Fragmente entwickelt, die isoliert betrachtet nicht literaturbekannt in Bezug auf die Inhibition von Kinasen sind. Dazu wurden ausgehend von einer kommerziell erhältlichen Bibliothek mit über >2 Mio. Molekülen durch das Anlegen von Algorithmen 6000 Kernfragmente identifiziert, die in 46 DFG-*in* Kinase-Kristallstrukturen gedockt wurden. Aus dieser Studie wurden anschließend die 100 höchst bewerteten, nicht-selektiven Verbindungen mit Hilfe von ChEMBL¹⁹⁵ und SciFinder (*Chemical Abstract Service*, Columbus, Ohio) auf ihre Einzigartigkeit hin überprüft. Es stellte sich heraus, dass bereits 73 der Fragmente als Teil bekannter Kinaseinhibitoren in der Literatur bekannt waren. Aus der Palette der übrigen 27 wurden sechs repräsentative Gerüststrukturen ausgewählt und auf diesen basierende, fokussierte Substanzbibliotheken synthetisiert. Aus diesen wurden wiederum 15 repräsentative Verbindungen gegen ein Panel von 117 Kinasen getestet. Mit **76** wurde das am geringsten selektive Fragment, welches

63 der 117 Kinasen mit >40% Inhibition adressiert und inhibitorische Aktivität gegen cSrc ($IC_{50} \approx 20 \mu M$) besitzt, ausgewählt, um es im Rahmen dieser Arbeit strukturbiologisch zu untersuchen.

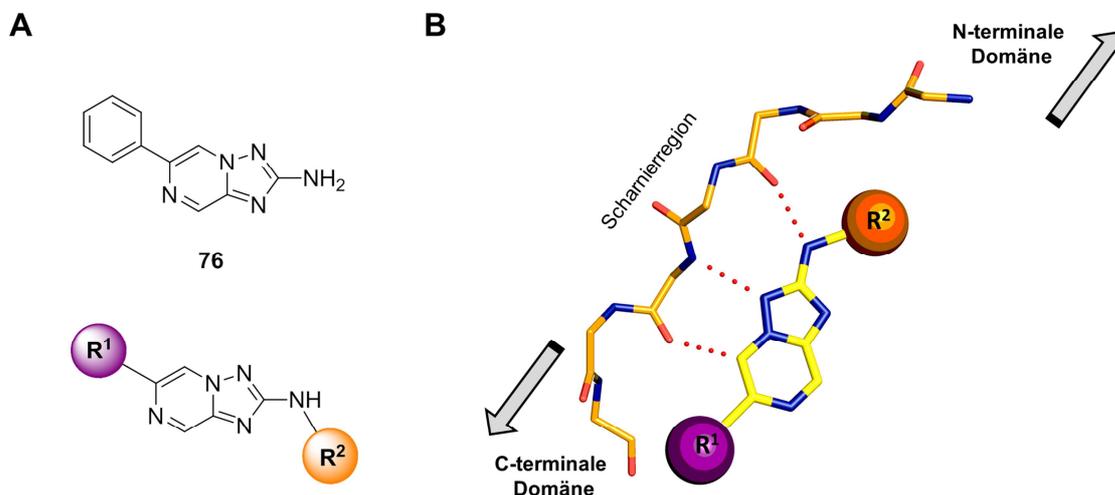


Abbildung 5.2: **A)** Triazolopyrazin-Fragment **76** zur strukturbiologischen Untersuchung des Bindungsmodus in cSrc, sowie eine substituierte Modellverbindung (unten); **B)** *In silico* kalkulierter Bindungsmodus eines analogen, substituierten Modellfragments als repräsentativer Vertreter der Gerüstklasse in cSrc. Ein alternativer Bindungsmodus, in welchem das verbrückende Stickstoffatom durch Rotation des Bicyklus um 180° von der Scharnierregion weg orientiert ist wurde ebenfalls identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Dazu wurde **76** unter bekannten Bedingungen¹¹ mit cSrc Wildtyp kokristallisiert (Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen) und Röntgendiffraktionsexperimente der plattenförmigen Kristalle am Synchrotron des Paul Scherer Instituts in Villingen (Schweiz) durchgeführt (siehe Kapitel 9.3.3.1). Nach Prozessierung der Daten sowie Strukturverfeinerung konnte eine Komplexkristallstruktur im asymmetrischen, triklinen Kristallsystem in der Raumgruppe P1 mit einer Auflösung von 2.5 \AA generiert werden, die zwei cSrc-Monomere in der asymmetrischen Einheit aufwies. Die erhaltene Kokristallstruktur zeigt die Kinase inklusive des Scharnierregion-bindenden Fragments **76** in der aktiven DFG-*in* Konformation, wobei sowohl für den Verlauf der Aktivierungsschleife, als auch die Atompositionen der Helix C und Teile der Glycin-reichen Schleife lediglich diffuse Elektronendichte beobachtet werden konnte, so dass diese Bereiche nicht vollständig modelliert werden konnten.⁹⁶

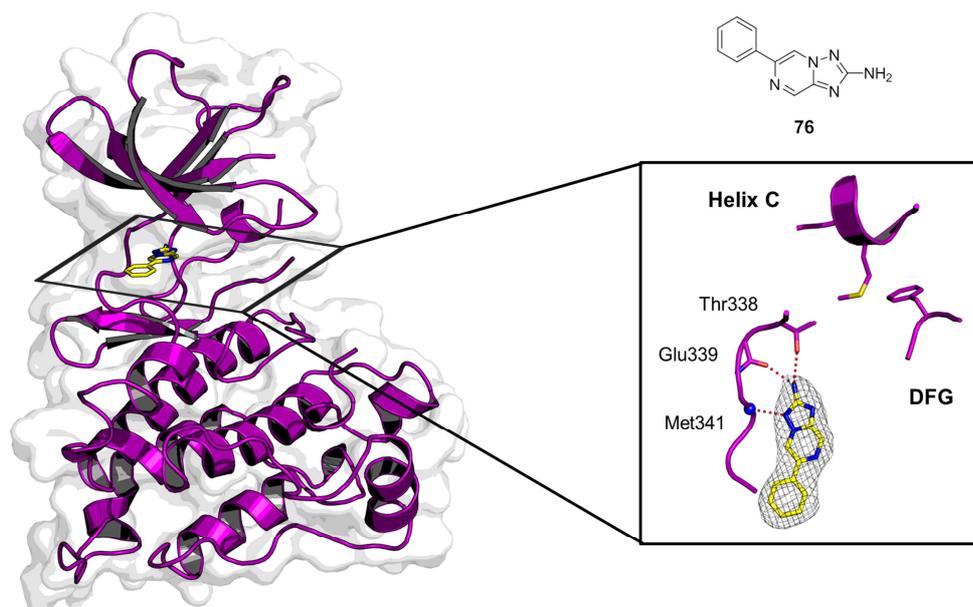


Abbildung 5.3: Experimentell bestimmter Protein-Ligand-Komplex, welcher die postulierte Interaktionsweise bestätigt. Kristallographische Parameter: Auflösung 2.5 Å, Elektronendichtekarte $2Fo - Fc$ konturiert bei 1σ , PDB-Eintrag: 4FIC.⁹⁶

Das exozyklische primäre Amin ist in Richtung des Türstehers (Thr338) orientiert und bildet sowohl zu diesem, als auch zum Peptidrückgrat des Glu339 eine Wasserstoffbrücke. Ein weiterer Kontakt zur Scharnierregion wird durch das Triazol-3-Stickstoff und Peptidgerüst an Met341 erzeugt. Ein Vergleich des experimentell bestimmten mit dem *in silico* postulierten Bindungsmodus zeigt eine vollständige Übereinstimmung aller Atompositionen. Trotz der Übereinstimmung von Modell und experimentell ermittelten Bindungsmodus wurde innerhalb der Dockingstudie auch eine alternative Orientierung des Bicyklus vorhergesagt, in welcher das verbrückende Stickstoffatom nicht zur Scharnierregion sondern um 180° rotiert in Richtung der ATP-Tasche lokalisiert ist. Dieser wurde jedoch nicht, auch nicht partiell, in der verfeinerten Komplexstruktur beobachtet.

Mit dem Wissen über die Orientierung des Scharnierregion-bindenden Triazolopyrazinamins **76** innerhalb des katalytisch aktiven Zentrums können nun weitere medizinisch-chemische Optimierungen auf der Grundlage rationalen Designs angestrengt werden, um das promiskuitiv bindende Fragment zu einen selektiven Inhibitor weiterzuentwickeln.

5.2 Strukturbiologische Studien in cSrc

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Maurizio Botta der pharmazeutischen Fakultät der Università degli Studi di Siena, wurde ein *in silico* entworfenes und rational synthetisiertes Molekül (**77**) für Kristallisationsstudien in cSrc herangezogen. Dabei handelte es sich um ein mehrfach substituiertes Pyrazolo-4-aminopyrimidin (Abbildung 5.4), als kompositionelles Analogon der Kernstruktur einiger bekannter Kinaseinhibitoren.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Ein spezifisches Merkmal stellt das Chlor-substituierte, stereogene Zentrum am verbrückenden Ethyllinker in 1-Position des Pyrazolopyrimidins dar. Trotz des enthaltenen Chiralitätszentrums wurde keine stereoselektive Synthese der Verbindungen verfolgt, sondern ein Racemat für die strukturbiologischen Untersuchungen an cSrc verwendet.

Es konnte eine Komplexkristallstruktur von **77** mit cSrc wt im triklinen Kristallisationssystem in der symmetriellosen Raumgruppe P1 mit einer Auflösung von 2.1 Å generiert werden (Abbildung 5.4). In der asymmetrischen Einheit befinden sich dabei zwei Monomere, welche beide eine Ligandenbindung aufweisen.

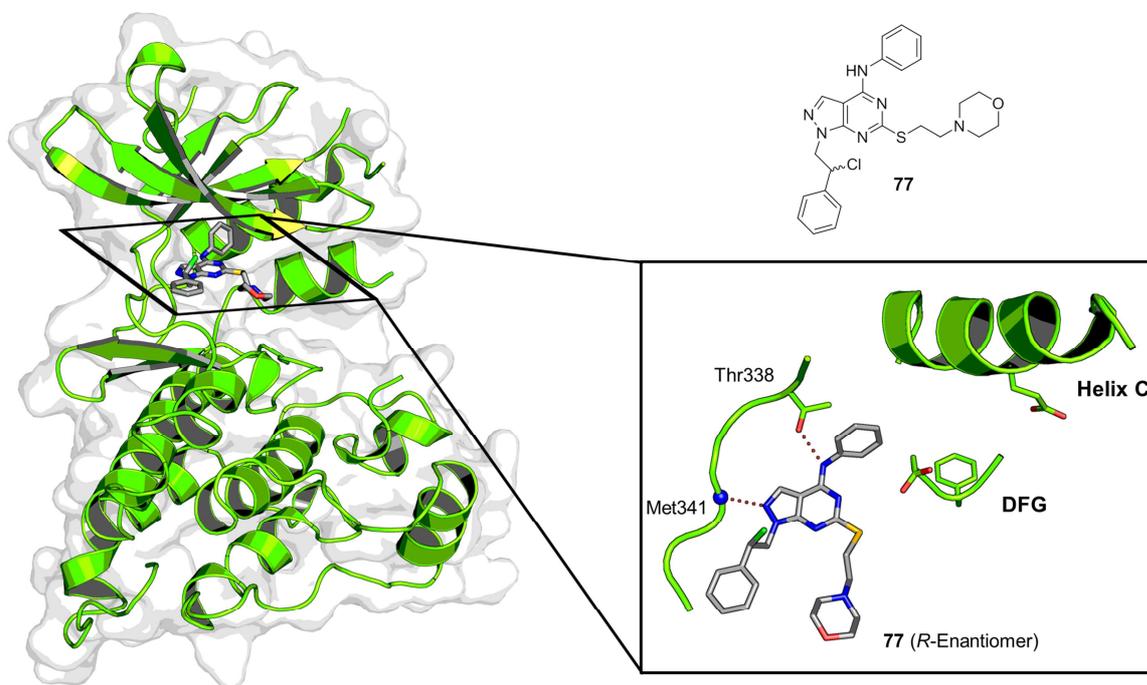


Abbildung 5.4: Komplexkristallstruktur von cSrc im Komplex mit **77** (grau). Kristallographische Parameter: Auflösung 2.1 Å, Elektronendichtekarte $2Fo - Fc$ konturiert bei 1σ .

77 wechselwirkt über einen Typ-I Bindungsmodus unter Adaption der klassischen DFG-*in* Konformation mit cSrc. Dabei werden zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Scharnierregion generiert, einerseits über das Pyrazol zum Peptidrückgrat-NH von Met341 und andererseits durch eine direkte Interaktion des verbrückenden 4-Amins zur Seitenkette der Thr338-Türsteheraminosäure. Weiterhin belegt das Anilin in 4-Position die rückwärtige hydrophobe Tasche im Bereich des Türstehers. Üblicherweise erfolgt der Kontakt von Pyrazolopyrimidinen zur Scharnierregion über das N7 oder N5,^{196, 198} jedoch wird in diesem Fall aufgrund der sterisch anspruchsvollen Substitution an 6-Position keine Interaktion an diesen Stellen hervorgerufen. Die Morpholinoethylthio- sowie 2-Chloro-2-ethylphenyl-Substituenten an 6- und 1-Position weisen eine Lösungsmittel-exponierte Orientierung auf und beim Chloroethyl-verknüpften Aromaten erfolgt aufgrund der räumlichen Nähe zur Scharnierregion lediglich die Bindung des *R*-Enantiomers, da das Halogen in diesem Fall von der flexiblen Verknüpfungsregion weg orientiert ist. Im Vergleich dazu ist beim Molekül mit *S*-konfiguriertem stereogenen Zentrum eine Umgehung der auftretenden sterischen Repulsion mit der Seitenkette von Tyr340 nicht möglich. Auf diese Art und Weise findet eine Selektion der Komponenten des Racemats statt, welche lediglich die Bindung des *R*-Enantiomers erlaubt.

5.3 Strukturbiologische Studien zum Bindungsverhalten an p38 α

Hohe Expressionsraten der proinflammatorischen Cytokine TNF- α sowie IL-1 β durch die Stress-induzierte Aktivierung von p38 α stehen in direkter Verbindung mit dem Ausbruch von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder chronisch-inflammatorischer Darmerkrankungen aber auch Alzheimer und Krebserkrankungen.¹⁹⁹⁻²⁰³ Die MAPK p38 α repräsentiert ein Schlüsselenzym in der Regulation der Biosynthese proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α und IL-1 β auf translationaler und transkriptionaler Ebene und daher spielt deren Regulation eine wichtige Rolle in antiinflammatorischen Therapien.²⁰⁴⁻²⁰⁶ Obschon gezeigt wurde, dass die Transkriptionslevel dieser Cytokine durch niedermolekulare Verbindungen gesenkt werden können, hat bislang noch kein p38 α Inhibitor die klinische Reife erreicht.²⁰⁷ Trotzdem zeigten PH-797804²⁰⁸ zur Behandlung von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen oder BMS-582949²⁰⁹ für rheumatoide Arthritis positive Resultate in klinischen Studien der Phase II und werden aktuell weiter verfolgt.⁵⁹ Aufgrund der breiten Anwendungsgebiete und dem Fehlen zugelassener Therapeutika besteht eine unumgängliche Notwendigkeit der steten Entwicklung neuer oral bioverfügbarer p38 α -Inhibitoren.^{207,210}

In einer Durchmusterungsstudie wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stefan Laufer (Universität Tübingen) die Klasse der substituierten Dibenzosuberone mit signifikanter Potenz zu p38 α identifiziert und die initialen Hit-Strukturen sukzessive zur Verbindung Skepinon-L als selektiven p38 α -Inhibitor weiterentwickelt (vgl. Abbildung 5.5).²¹¹ Der Typ-I Bindungsmodus von Skepinon-L wurde mit Hilfe röntgenkristallographischer Studien in der AG Rauh identifiziert und weist Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf, die darauf schließen lassen, dass eine geringe Anzahl an Kinasen selektiv adressiert wird. Zunächst wird durch den hydrophoben anilinischen Aromaten die hydrophobe Region in der Nähe des Türstehers belegt. Diese kann besetzt werden, da sie im Falle der p38 α Kinase frei zugänglich ist, denn die Türsteheraminosäure (Thr) weist eine Seitenkette mit geringem sterischen Anspruch auf. Weiterhin kontaktiert das Carbonyl des Dibenzosuberons die Scharnierregion durch Wasserstoffbrückenbindungen der Peptidrückgrat-NHs von Met109 und Gly110. Das Alleinstellungsmerkmal letzterer Interaktion ist die Zugänglichkeit des Glycins, welche erst durch Rotation des verbrückenden Amids um 180°, dem sogenannten *Gly-flip*, ermöglicht wird (vgl. Abbildung 5.5A). Die Selektivität der entworfenen Inhibitoren lässt sich an wenigen strukturellen Eigenschaften verdeutlichen: Lediglich 46 der 518 genetisch codierten

Kinasen besitzen ein Glycin an äquivalenter Position zu Gly110, von denen lediglich drei ein sterisch wenig anspruchsvolles Threonin an der Türsteherposition aufweisen.^{199, 211, 212}

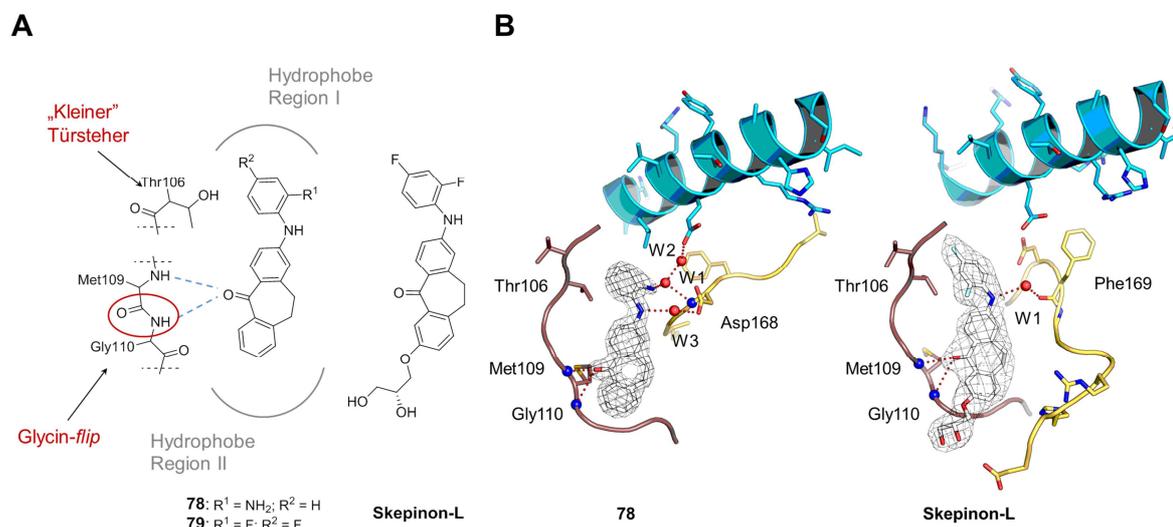


Abbildung 5.5: **A)** Strukturen von Skepinon-L sowie einiger verwandter Pinon-Derivate (**78**, **79**) und ihre Bindungsmodi mit charakteristischem Glycin-*flip*. **B)** Die Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit **78** (links) und Skepinon-L (rechts) bei einer Auflösung von 1.9 Å bzw. 2.7 Å (PDB-Einträge: 3ZYA und 3QUE). Für die Liganden ist die experimentell ermittelte Elektronendichtekarte (*2Fo-Fc*), konturiert bei 2σ (**78**) und 1σ (Skepinon-L), gezeigt. Unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den Amidstickstoffen von Met109 und Gly110 zeigen beide Verbindungen eine über die Carbonylgruppe vermittelte Interaktion zur Scharnierregion, wobei Gly110 einen *flip* vollzieht, um die Bindung der Liganden zu ermöglichen. Das sekundäre Amin in **78** sorgt für eine Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücke zum Hauptketten-carbonyl von Tyr35, sowie der Carboxylat-Funktion von Asp168. Eine weitere gleichgelagerte Interaktion wird vom primären Amin zum Rückgratamid von Asp168 ausgebildet. Im Gegensatz dazu kann durch das sekundäre Amin im Falle von Skepinon-L eine Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücke zum Hauptkettenamid von Phe169 als auch zum Seitenkettenamin von Lys53 generiert werden.²¹¹

Die traditionellen Herangehensweisen an das rationale Design selektiver p38 α Inhibitoren beinhalten also einerseits die Adressierung der Scharnierregion im Bereich des Gly110 mit einer Carbonylfunktion, um den Glycin-*flip* zu induzieren,²¹³ sowie die Belegung der hydrophoben Tasche mit (substituierten) Aromaten.²¹⁴ Darüber hinaus erzeugt auch die Einführung von Rigidität, um die Konformation der Kinase in gebundener Form zu stabilisieren und die möglichen Konformationsänderungen durch Hervorrufung eines *induced fit* durch andere Wechselwirkungspartner zu minimieren, eine gewisse Selektivität.²¹⁵ Des Weiteren kann die Verweildauer an der Zielkinase durch Annahme eines Typ-II Bindungsmodus erhöht werden, da der strukturelle Übergang von aktiver (DFG-*in*) in die inaktive (DFG-*out*) Form mit quasistatischen Assoziations- sowie Dissoziationskonstanten assoziiert ist und so die Effizienz von Inhibitoren bei niedrigen Konzentrationen erhöht.^{19, 216}

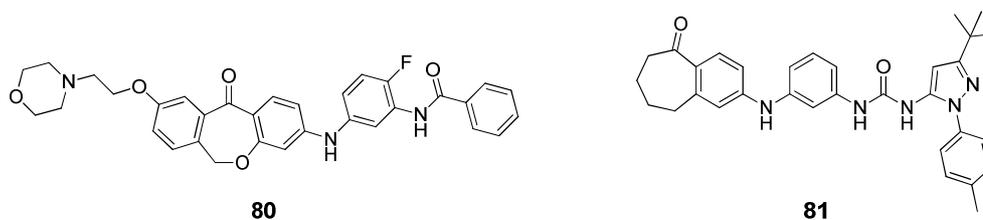


Abbildung 5.6: Strukturbiologisch zu untersuchende Strukturen: Dibenzoaxepinon **80** sowie Tetrahydrobenzannulen **81**.²¹¹

Basierend auf diesen Resultaten wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stefan Laufer (Tübingen) weitere Entwicklungen in Form der Einführung verschiedener Substituenten zur Optimierung der Struktur durchgeführt. Eine sukzessive Erweiterung in Richtung der allosterischen Tasche im Bereich des DFG-Motivs und der Helix C sollte dazu dienen, einen Typ-II Inhibitor zu entwickeln. Durch konsequente Umsetzung der o.g. Leitsätze wurden die weiter optimierten Strukturen **80** und **81** (Abbildung 5.6) synthetisiert. Die zur Verfügung gestellten Verbindungen wurden anschließend in p38 α kokristallisiert, um die Protein-Ligand-Interaktionen zu evaluieren.

Die Komplexstrukturen von p38 α mit **80** als auch **81** zeigen bei einer Auflösung von je 2.1 Å die Adaption eines orthorhombisch primitiven Kristallisationssystems in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ mit drei zweifachen Schraubenachsen sowie zugehöriger einfacher Spiegelachsen. In der asymmetrischen Einheitszelle ist lediglich ein Proteinmonomer vorzufinden. Im Falle des Dibenzoaxepinons **80** lässt sich eine Typ-II Adressierung der inaktiven Kinase herausstellen, wobei das DFG-Motiv in der sog. *in-between* Konformation vorliegt, einem Übergangszustand zwischen *in* und *out*, welcher sich dadurch auszeichnet, dass Phe169 in Richtung der Glycin-reichen Schleife orientiert ist (vgl. Abbildung 5.7). Darüber hinaus können zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen observiert werden, darunter die charakteristische Interaktion des Carbonyls mit dem Peptidrückgrat von Met109 sowie des Gly110, welches zuvor durch einen *flip* in die geeignete Position übergegangen ist, um diese Wechselwirkung zu ermöglichen. Eingebettet zwischen Helix C und DFG-Motiv belegt der Amid-verknüpfte Aromat des Liganden die hydrophobe allosterische Tasche an der rückwärtigen Seite der Bindungsspalte und induziert dort die Formierung weiterer Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu71 sowie Asp168. Zusätzlich kann in der Lipidbindetasche als auch in der Nähe der hydrophoben allosterischen Tasche die Existenz jeweils eines Detergenzmoleküls (BOG) nachgewiesen werden, welche die Kinase während des Kristallisationsprozesses stabilisieren.

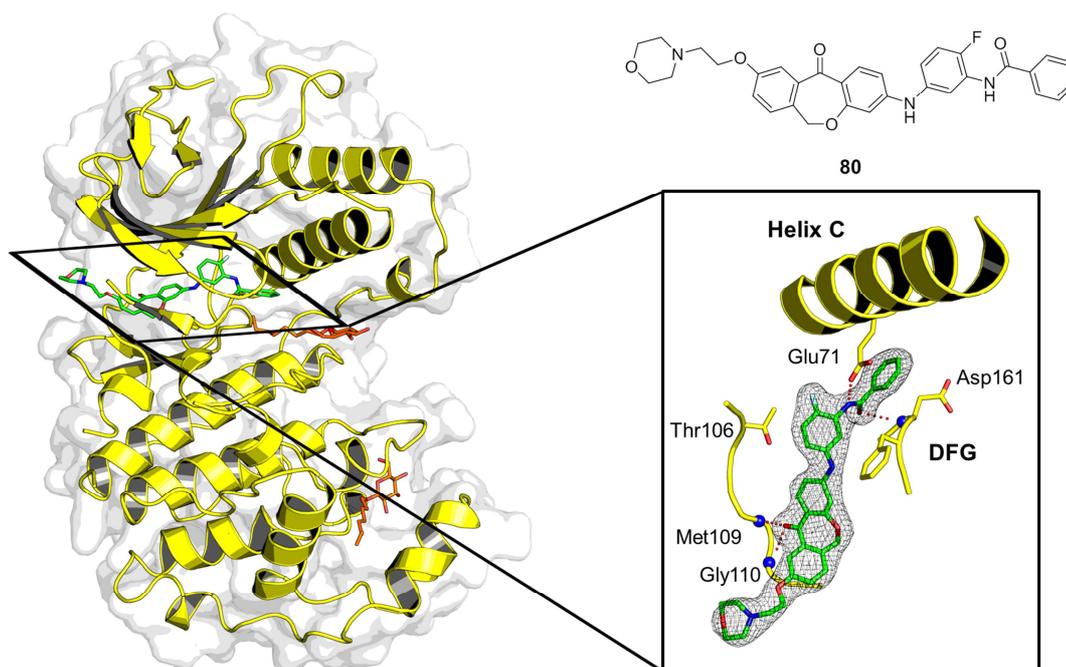


Abbildung 5.7: Komplexkristallstruktur von p38 α im Komplex mit **80** (grün) und zwei Molekülen BOG (orange, allosterische Tasche und Lipidtasche).

Verbindung **81** besitzt ein terminales Pyrazolharnstoff-Motiv, welches bekannt dafür ist, innerhalb der allosterischen Tasche zu binden und somit die DFG-out Konformation der Kinase zu induzieren²¹⁷ und zeigt einen typischen Typ-II Bindungsmodus in p38 α . Weiterhin bildet die aromatische Aminosäure Phe169 vorteilhafte aromatische *face-to-edge*⁷⁹ Wechselwirkungen mit dem Aromaten des Benzosuberons aus, die zur Stabilisierung der Konformation beitragen. Der Harnstoff wird, wie schon bei den Hybridinhibitoren (Kapitel 3.2.5) gezeigt, vom Glu71 der Helix C sowie dem Peptidrückgrat des Asp168 über insgesamt drei Wasserstoffbrücken stabilisiert. Durch das Carbonyl des Liganden wird ein Scharnierregionkontakt zum Peptid-NH von Met109 erzeugt. Auch ein partieller *flip* des achiralen Gly110 kann beobachtet werden, doch mit 3.6 Å scheint die räumliche Distanz zum Carbonyl nicht optimal zur Ausbildung einer direkten Wasserstoffbrücke. Auch hier konnte die Existenz zweier Detergenzmoleküle, beide im Bereich der Lipidtasche, festgestellt werden.

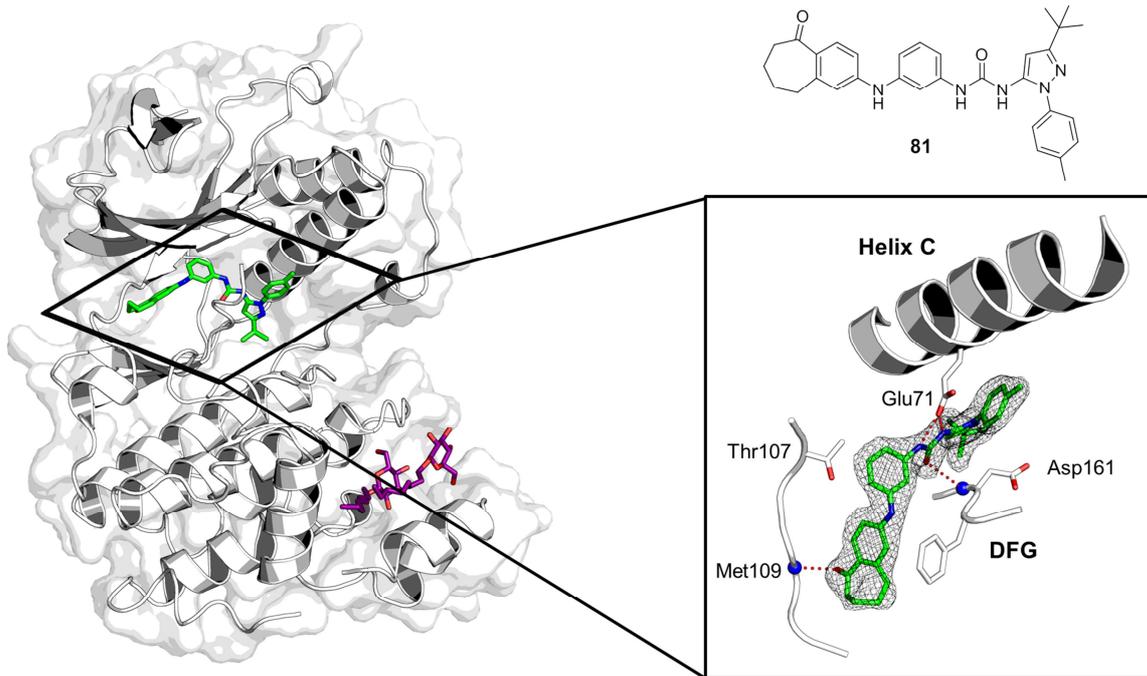


Abbildung 5.8: Komplexkristallstruktur von p38 α im Komplex mit **81** (grün) und zwei Molekülen BOG (violett) innerhalb der Lipidbindetasche, PDB-Eintrag: 3UVR.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl **80** als auch **81** einen für Typ-II Inhibitoren typischen Bindungsmodus zeigen. Durch Stabilisierung der inaktiven DFG-out Konformation besitzen diese möglicherweise eine verbesserte Verweildauer am Zielenzym und somit eine verbesserte inhibitorische Aktivität gegenüber p38 α , bei gleichzeitiger Erhaltung der Selektivität (*Glycin-flip*).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die Konzepte der rationalen Entwicklung von Inhibitoren als auch der Chemischen Genetik zur Untersuchung von Signalkaskaden aufgegriffen:

Basierend auf Chinazolin-Pyrazolharnstoff-Hybriden ist die strukturbasierte Entwicklung und synthetische Darstellung einer fokussierten Substanzbibliothek, mit starker inhibitorischer Wirksamkeit gegenüber Proteinkinasen, geglückt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Derivatisierung der Chinazolin 6-Position mit Wasserstoffbrücken-Akzeptoren gelegt. SAR-Studien zeigten eine verbesserte inhibitorische Aktivität der 1,4-Hybridinhibitoren **2f-h** gegenüber cSrc wt bzw. T338M ($IC_{50} \approx 1$ nM), entsprechend einer 14- bzw. 23-fachen Verbesserung im Hinblick auf das Ursprungsmolekül **1b**. Strukturbiologische Untersuchungen lieferten Hinweise auf die Ursachen gesteigerter Wirksamkeit, wobei nicht die Erweiterung der 6-Position die treibende Kraft für eine verbesserte Effektivität war, sondern das Zusammenspiel des im allosterisch bindenden Teil der Grundstruktur eingeführten anilinischen Amins in Koexistenz mit einem obligatorischen Amid an der 6-Position des Chinazolinkerns (vgl. **2f** vs. **2h**). Dieses Resultat konnte mit der Theorie der Enthalpie-Entropie-Kompensation für Protein-Ligand-Wechselwirkungen korreliert werden. Eine Übertragbarkeit des inhibitorischen Effekts auf die strukturell verwandte, klinisch relevante Proteinkinase Abl sowie die Variante T315I für **2a-i** wurde anhand biochemischer Charakterisierungen nachgewiesen, wobei **2a-d** ($IC_{50} = 40-157$ nM bzw. 81-561 nM für wt bzw. T315I) die höchste inhibitorische Aktivität zeigten. Auch die katalytische Aktivität des Stammzellwachstumsfaktorrezeptors KIT konnte durch diese Verbindungsklasse herabgesetzt werden. Dabei erwiesen sich sowohl **2b-d** als auch **2f-i** als äußerst potent gegenüber der Wildtyp-Variante wie auch der konstitutiv aktiven und zusätzlich Türsteher-mutierten Form V559D/T670I ($IC_{50} = 3-8$ nM und 3-38 nM). Insbesondere durch zelluläre Studien wurde die Hypothese zur effektiven Adressierung klinisch relevanter, konstitutiv aktiver Kinasen unterstützt. Neben der Bcr-Abl abhängigen CML Krebszelllinie K562, welche bei Behandlung mit der in diesem Fall potentesten Verbindung **2b** (10 μ M) einen Rückgang der proliferierenden Zellen um 80% zu verzeichnen hatte, wurden - mit GIST-T1 als nicht mutierte und GIST-T1 T670I als Türsteher mutierte, KIT exprimierende Linien - auch Vertreter solider Tumoren durch die Mehrheit der 1,4-Hybride ohne das Auftreten toxischer Nebenwirkungen in ihrer absoluten Anzahl vitaler Zellen zurückgedrängt. Jedoch stellte sich auch hier heraus, dass die Moleküle ohne Substitution an der Chinazolin 6-Position (**2b,d**) eine

deutlich größere Wirksamkeit zeigten ($GI_{50} = 11-17$ nM gegenüber GIST-T1 und $GI_{50} = 24-28$ nM gegenüber GIST-T1 T670I), als die Analoga mit erweiterten Strukturmotiven (**2f,h**), mit GI_{50} -Werten von 208-402 nM (GIST-T1) bzw. 324-385 nM (GIST-T1 T670I). Durch abschließende Western-Blotting Studien wurde die direkte zelluläre Adressierung von KIT durch Herabsetzung der pKIT-Level durch **2d** und **2h** sowie die Beeinflussung der nachgeschalteten Signalkaskade (pAkt und pMAPK) in GIST-T1 sowie der KIT T670I exprimierenden Zelllinie GIST-T1 T670I bestätigt. In aufbauenden Untersuchungen wurde der Beitrag der einzelnen Strukturelemente des Hybrid-Inhibitorgrundgerüsts in Bezug auf ihre Selektivität und Affinität zu zellulären Zielproteinen in einer Profilierungsstudie aus Lysat der humanen, Bcr-Abl positiven K562-Krebszelllinie evaluiert. Es konnte belegt werden, dass ausgehend vom Pyrazolharnstoffteil mit sukzessiver Verlängerung des Inhibitors eine Steigerung der Affinität hervorging. Damit einhergehend konnte jedoch auch ein Verlust an Selektivität herausgestellt werden. Die optimale Balance zwischen Molekülgröße, Selektivität und Affinität konnte für den Typ-III Inhibitor **18** festgestellt werden, welcher mit p38 α / β , JNK2, caMLCK und DDR1 die geringste Anzahl an Zielproteinen aufwies, diese jedoch mit signifikanter Affinität adressierte ($K_D < 1$ μ M). Lediglich für den rational designten Hybridinhibitor **2d**, der die Gesamtheit aller untersuchten Strukturmerkmale repräsentierte, konnte Abl als Zielprotein identifiziert werden.

Im Rahmen chemisch-genetischer Ansätze zur Untersuchung der Eigenschaften molekularer Sonden zur Nutzung in *bump and hole* Experimenten konnte neben der inhibitorischen Aktivität der niedermolekularen Verbindungen **24-27** auch die direkte kovalente Bindung an Ark1-as3-cys (L166A, E173C) im *in vitro* System bestätigt werden. Gegenüber der Mutationsvariante konnte für die Elektrophil-tragenden Strukturen sowohl eine direkte σ -Bindung als auch eine signifikante Potenz im niedrigen nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 1-9$ nM) belegt werden. Die Wildtyp-Kinase hingegen blieb von einem Effekt völlig unberührt. Somit bestätigten die Resultate das rationale Design zur Generierung kovalenter Sonden in Form substituierter 4-Anilinochinazoline und komplementärer, sensitiver Kinase für die Anwendung im *bump and hole* Ansatz in *S. pombe*. Darüber hinaus konnten in weiterführenden Studien an humaner Aurora A im Rahmen einer Durchmusterungsstudie von 968 kommerziell erhältlichen Substanzen neue Strukturen identifiziert werden, die zwar im Allgemeinen für die Kinaseadressierung bekannt, aber partiell (Verbindungen **30, 47-49**) bislang noch nicht im Zusammenhang mit Aurora A beschrieben waren. Diese besitzen das Potential für nachfolgende Optimierungsansätze und Verwendung als chemische Sonden, um komplexe Signalkaskaden in Bezug auf Aurora-Kinasen zu entschlüsseln und das Verständnis fehlregulierter Signalkaskaden zu fördern.

Ein Anwendungsbeispiel folgte im Screening zur Identifizierung neuer Binder für die kürzlich als onkogen propagierte und damit klinisch relevante Ser/Thr-Kinase TBK1, deren biologische Aktivierung und Funktion auf molekularer Ebene bislang weithin unbekannt ist.^{168, 169} Dazu wurden Substanzbibliotheken niedermolekularer organischer Verbindungen durchmustert und erfolgreich geeignete Hit-Strukturen für eine effektive Inhibition von TBK1 identifiziert, welche als Grundlage zur Generierung chemischer Sonden dienen sollten. Anhand der Erstellung eines Strukturmodells sowie publizierter TBK1-Kristallstrukturen konnten rationale Modellierungs- und Optimierungsstudien durchgeführt werden. Dem rationalen Design folgte die erfolgreiche Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek, bestehend aus reversiblen und kovalenten Molekülen (Tozasertib- und BX795-Analoga), die in der Folge gegenüber TBK1 biochemisch charakterisiert wurden. Dabei konnte die inhibitorische Aktivität der Hit-Struktur (Tozasertib, $IC_{50} = 6.22 \mu\text{M}$) um mehr als den Faktor 100 gesteigert und mit Verbindung **63i** ein reversibler Inhibitor mit Aktivität im niederen nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 0.06 \mu\text{M}$) erzeugt werden. Ansätze zur Generierung kovalent modulierender Inhibitoren auf der Grundlage des bekannten TBK1- und PDK1-Inhibitors BX795 führten zu Verbindungen (**66**, **67**), welche die inhibitorische Potenz der Urverbindung nachstellten ($IC_{50} \approx 3\text{-}5 \text{ nM}$). *In vitro* Verdrängungsstudien, in Konzentrationsabhängigkeit zu ATP, implizieren jedoch, dass **67** einen reversibel bindenden, kompetitiv verdrängbaren Liganden darstellt, während die Ergebnisse für das als Racemat eingesetzte Molekül **66** keine eindeutige Aussage über die Art der Wechselwirkung (reversibel vs. kovalent) zuließen. Zelluläre Studien unter Verwendung einer TBK1-abhängigen Krebszelllinie (A549) lieferten in ersten Untersuchungen keine Hinweise auf eine Inhibitor-induzierte antiproliferative Wirkung. Abschließend konnten weitere Verbindungen für die rationale Entwicklung selektiver Inhibitoren aus den Resultaten von Durchmusterungsstudien, auf Grundlage von repräsentativen Substanzbibliotheken der Firmen GSK und Roche, identifiziert werden.

Im Rahmen von Kooperationsprojekten wurden strukturbiologische Studien an Ser/Thr-Kinasen durchgeführt, welche in der Generierung zweier $p38\alpha$ -Komplekxkristallstrukturen resultierten. Dabei zeigten ein Dibenzoxepinon (**80**) sowie Tetrahydrobenzoannulen (**81**), einen Typ-II Bindungsmodus und die Herbeiführung des für diese Inhibitorklasse charakteristischen Glycin-*flip* innerhalb der Scharnierregion. Weitere Strukturen im Komplex mit der Tyr-Kinase cSrc zeigten den Bindungsmodus eines Scharnierregion-bindenden neuartigen Fragments (**76**), welches in einer *in silico* Studie identifiziert wurde, sowie den Typ-I Bindungsmodus eines mehrfach-substituierten, racemischen Pyrazolopyrimidins (**77**), welches spezifisch lediglich in der *R*-konfigurierten Form eine Bindung zum Protein einging.

7 Summary

Both, concepts of rational drug development as well as aspects of chemical-genetic approaches to dissect the function of proteins within signaling cascades were applied in this work:

Based on quinazoline-pyrazolourea hybrids the structure based development and synthetic production of a focused small molecule library with strong inhibitory potency on protein kinases was achieved. Particular attention has been paid to the derivatization of the quinazoline 6-position with hydrogen bond acceptors as well as the use of freely rotatable motifs to overcome gatekeeper resistance mutations. SAR studies revealed an improved inhibitory effect of 1,4-fused hybrid inhibitors (**2f-h**) on cSrc wt and T338M ($IC_{50} \approx 1$ nM) according to 14- and 23-fold improvement compared to the mother compound **1b**. Structural biology studies revealed the cause for the improved efficacy on a molecular basis. The extension of the quinazoline core was not crucial for the observed effect. Instead, the coexistence of a pyrazole-connected aniline and an obligatory amide at the quinazoline 6-position is mandatory (**2f** vs. **2h**). This result closely correlates to the principle of compensation effects caused by the interplay of enthalpy and entropy. Furthermore, a conserved inhibitory effect on structurally related and clinically relevant protein kinases such as Abl and the respective gatekeeper mutated species was illustrated with **2a-d** showing the most significant effect ($IC_{50} = 40-157$ nM and $81-561$ nM for Abl wt and T315I respectively). Likewise **2b-d** and **2f-i** were very potent on wildtype as well as constitutive active and gatekeeper mutated (V559D/T670I) variants of the stem cell factor receptor KIT. Subsequent studies confirmed the observed effects on a cellular level. **2b** reduced the amount of viable Bcr-Abl dependent human CML cells (K562) to 80% at a concentration of $10 \mu\text{M}$. In addition KIT expressing cells GIST-T1 (wildtype KIT) and GIST-T1 T670I (gatekeeper mutated KIT) derived from solid tumors were reduced in their absolute cell numbers by the majority of 1,4-fused hybrid compounds without exhibiting toxic side effects. Compounds lacking a substitution at the quinazoline 6-position (**2b,d**) evoked the most significant antiproliferative effect ($GI_{50} = 11-17$ nM on GIST-T1 and $GI_{50} = 24-28$ nM on GIST-T1 T670I) compared to extended molecules **2f,h** ($GI_{50} = 208-402$ nM and $324-385$ nM respectively). Western Blot analyses confirmed the direct impact of the hybrid compounds on KIT and the downstream signaling cascade by substantial reduction of pKIT, pAkt and pMAPK in GIST-T1 and GIST-T1 T670I. In further experiments the selectivity profile of different hybrid compounds and fragments was investigated to dissect the inhibitor parts contributions on selectivity and

affinity to cellular target proteins from K562 lysate. Successive extension of the pyrazolo-urea motif into the ATP-binding pocket accounts for increased affinity while simultaneously decreasing the compounds selectivity. An optimal compromise between good selectivity and low promiscuity coupled with low molecular weight was represented by type III inhibitor **18** with K_D values $<1 \mu\text{M}$ and solely addressing p38 α/β , JNK2, caMLCK and DDR1.

In the scope of chemical genetic approaches for analyzing features of molecular probes in order to use them in bump and hole experiments the electrophile equipped structures **24-27** showed significant inhibitory activity on the rationally designed mutant variant Ark1-as3-cys (L166A, E173C; $\text{IC}_{50} = 1-9 \text{ nM}$). Moreover the direct covalent binding to this mutant was demonstrated in *in vitro* systems while the wildtype form remained unaffected. This confirms the successful rational design of a complementary, artificial protein-ligand pair for a bump and hole approach in *S. pombe*. In subsequent studies investigating the related human Aurora A, novel scaffolds previously unknown as Aurora A inhibitors, were identified by activity-based screening of commercially available compound libraries. These structures showed potential for following optimization studies and their use as chemical probes to dissect the complex Aurora-related signaling network.

The necessity for chemical genetic approaches to analyze signaling cascades is reflected by TBK1, a recently proposed oncogene with clinical relevance. Its biological function on a molecular basis is unclear to a large extent so far. Here we successfully identified novel binders for the Ser/Thr-kinase by screening compound libraries for effective and unique TBK1 inhibitors as starting point for chemical probe design. Adapted from homology models and complex crystal structures of TBK1 the identified hits were optimized using rational design approaches. After synthesis of a focused compound library consisting of reversible and covalent binders the whole set was biochemically characterized. Compared to the initial hit compound (Tozasertib, $\text{IC}_{50} = 6.22 \mu\text{M}$) the most potent derivative (**63i**) exhibited a 100-fold improved inhibitory activity with an IC_{50} of $0.06 \mu\text{M}$. Efforts to generate covalent modulating inhibitors which are structurally closely related to the known TBK1 and PDK1 inhibitor BX795 led to **66** and **67**. While the inhibitory effect of the original compound was preserved ($\text{IC}_{50} \approx 3-5 \text{ nM}$), *in vitro* competing experiments with ATP as competitor indicated a reversible binding mode for **67** whereas the type of interdependency (reversible or covalent) in case of the racemic compound **66** could not clearly be evaluated. Cellular studies with a TBK1 dependent KRAS-mutated cancer cell line (A549) did not provide any conclusive evidence for an inhibitor induced antiproliferative effect.

Within the framework of cooperation projects structural biology studies were performed using p38 α and cSrc. In case of p38 α two complex crystal structures with dibenzoxepine **80** and tetrahydrobenzoannulene **81** respectively were generated. Both showed a type II binding mode and the characteristic induction of the so called glycine-flip within the hinge region that ensures selectivity over other kinases. With respect to cSrc the binding mode of a new, *in silico* identified hinge-region binding fragment (**76**) was evaluated. Furthermore the type I binding mode of **77** (racemic), a highly substituted pyrazolopyrimidine, was discovered. Notably only the *R*-configured isomer was able to bind inside the catalytic cleft of cSrc.

8 Publikationen

- [1] Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; **Richters, A.**; Tückmantel, S.; Simard, J.R.; Rauh, D., „Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases“, *Archiv der Pharmazie*, **2010**, *343* (4), 193-206.
- [2] Koch, A.; Rode, H.B.; **Richters, A.**; Rauh, D.; Hauf, S., „A chemical genetic approach for covalent inhibition of analogue-sensitive aurora kinase“, *ACS Chemical Biology*, **2012**, *7* (4), 723-31.
- [3] Grütter, C.; Simard, J.R., Mayer-Wrangowski, S.C.; Schreier, P.H., Pérez-Martín, J., **Richters, A.**; Getlik, M.; Gutbrod, O.; Braun, C.A.; Beck, M.E., Rauh, D., „Targeting GSK3 from *Ustilago maydis*: type-II kinase inhibitors as potential antifungals“ *ACS Chemical Biology*, **2012**, *7* (7), 1257-67.
- [4] Sos, M.L.; Dietlein, F.; Peifer, M.; Schöttle, J.; Balke-Want, H.; Müller, C.; Koker, M.; **Richters, A.**; Heynck, S.; Malchers, F.; Heuckmann, J.M.; Seidel, D.; Eyers, P.A.; Ullrich, R.T.; Antonchick, A.P.; Vintonyak, V.V.; Schneider, P.M.; Ninomiya, T.; Waldmann, H.; Büttner, R.; Rauh, D.; Heukamp, L.C.; Thomas, R.K., „A framework for identification of actionable cancer genome dependencies in small cell lung cancer“, *PNAS*, **2012**, *109* (42), 17034-9.
- [5] Urich, R.; Wishart, G.; Kiczun, M.; **Richters, A.**; Tidten-Luksch, N.; Rauh, D.; Sherborne, B.; Wyatt, P.; Brenk, R., „Getting to the core of the problem - *De Novo* Design of Protein Kinase Inhibitors by *in Silico* Identification of Hinge Region-Binding Fragments“, *ACS Chemical Biology*, **2013**, *8* (5), 1044-1052.
- [6] **Richters, A.**; Ketzer, J.; Getlik, M.; Grütter, C.; Schneider, R. ; Heuckmann, J.M.; Heynck, S.; Sos, M.L.; Gupta, A.; Unger, A.; Schultz-Fademrecht, C.; Thomas, R.K.; Bauer, S.; Rauh, D., „Targeting Gain of Function and Resistance Mutations in Abl and KIT by Hybrid Compound Design“, *J Med Chem*, **2013** (Manuskript eingereicht).

Manuskripte in Vorbereitung:

- [1] **Richters, A.**; Getlik, M.; Simard, J.R.; Jenne, A.; Godl, K.; Rauh, D., „Cellular Target Profiling of Kinase Inhibitors“.
- [2] **Richters, A.**; Basu, D.; Balke-Want, H.; Thomas, R.K.; Rauh, D., „Identification and rational optimization of TBK1 inhibitors“.
- [3] Baur, B.; **Richters, A.**; Rauh, D.; Laufer, S., „Special edition: Selective p38 α inhibitors“.

9 Experimenteller Teil

9.1 Organische Synthese

9.1.1 Vorbemerkungen

Die zur Herstellung und Isolierung der Zielverbindungen und Intermediate verwendeten **Chemikalien** und **Lösungsmittel** wurden von den Firmen Acros Organics, Alfa Aesar, AppliChem, Carl Roth, Fluka, Maybridge, Merck, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

NMR-Spektren wurden auf den Spektrometern Bruker DRX 400 (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -Spektren), DRX 500 (500 MHz für ^1H - und 126 MHz für ^{13}C -Spektren), DRX 600 (600 MHz für ^1H - und 151 MHz für ^{13}C -Spektren), sowie Varian Mercury 400 (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -Spektren) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind jeweils in ppm angegeben und beziehen sich auf die internen Standards für die Lösungsmittel Deuteriochloroform (CDCl_3 , $\delta = 7.26$ ppm bzw. $\delta = 77.16$ ppm) und Deuterodimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$, $\delta = 2.50$ ppm bzw. $\delta = 39.52$ ppm). Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. In den ^1H NMR-Spektren auftretende Spinmultiplizitäten der Protonenkopplungen wurden wie folgt abgekürzt:

(s)	Singulett	(bs)	breites Singulett
(d)	Dublett	(dd)	Dublett von Dublett
(t)	Triplet	(td)	Triplet von Dublett
(q)	Quartett	(m)	Multiplet
(sep)	Septett		

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit dem Spektrometer LTQ Orbitrap der Firma Thermo Electron Corporation aufgenommen.

LC-MS-Spektren wurden auf den HPLC Systemen LCQ Advantage MAX (1200er Serie, Agilent) mit Eclipse XDB-C18-Säule (5 μm , 150 \times 1.6 mm, Phenomenex), sowie LCQ Advantage MAX (1100er Serie, Agilent) mit CC125/4 Nucleodur C18 Gravity Säule (3 μm , Machery Nagel) aufgenommen.

Die Auswertung von LC-MS- und HRMS-Spektren erfolgte mit Xcalibur™ (Thermo Electron Corporation, Version 1.4 SR1), die Auswertung von NMR-Spektren mit MestReNova (Mestrelab Research S.L., Version 6.0.3-5604).

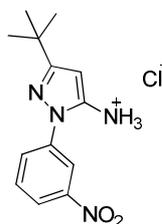
Die Aufbereitung von Rohprodukten per **präparativer HPLC** erfolgte mittels der Geräte LC-8A (Shimadzu) mit Nucleodur C18 Gravity Säule (5 μm , Machery Nagel) und VP50/21 Vorsäule (Machery Nagel), sowie einem Gerät aus der 1200er Serie der Firma Agilent mit Chromolith SemiPrep C-18e 100-10 mm Säule (Merck) bzw. mit VP125/21 Nucleodur C18 Gravity Säule (5 μm , Machery Nagel) und VP20/16 Nucleodur C18 Gravity Vorsäule (Machery Nagel).

Säulenchromatographie erfolgte an Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße 40-60 μm), analytische **Dünnschichtchromatographie** auf Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminium- oder Glasplatten der Firma Merck. Bei der Durchführung letzterer wurden die Produkte und Nebenprodukte mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$ bzw. 366 nm) oder durch Anfärbereagenzien (Anisaldehyd, Ninhydrin, Kaliumpermanganat oder Phosphomolybdänsäure) visualisiert.

Sämtliche Oxidations- sowie Hydrolyse-empfindlichen Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre in sorgfältig ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt.

9.1.2 Herstellung von Hybridinhibitoren und Fragmenten

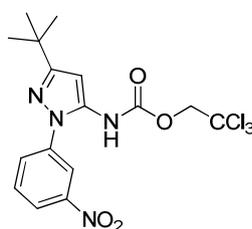
9.1.2.1 Darstellung von 3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin Hydrochlorid (7)



Einer Lösung aus *m*-Nitrophenylhydrazin Hydrochlorid (2.00 g, 10.6 mmol) und Pivaloyl-acetonitril (1.53 g, 11.9 mmol) in abs. EtOH (22 mL) wurde konzentrierte HCl (3 mL) zugegeben und diese für 12 h bei 90 °C gerührt. Das Präzipitat wurde abfiltriert, im Vakuum getrocknet und aus Hexan umkristallisiert. Es wurden 2.94 g (9.91 mmol, 94%) des gewünschten Produkts als weiße Kristalle erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.45 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.09 (m, 2H), 7.73 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.48 (bs, 2H), 5.47 (s, 1H), 1.23 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.12, 148.09, 147.96, 140.59, 130.48, 127.70, 119.59, 115.99, 88.22, 31.93, 30.03. HRMS (ESI-MS) berechnet: 261.13460 für $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 261.13456.

9.1.2.2 Darstellung von 2,2,2-Trichlorethyl (3-(*tert*-butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)carbamat (8)

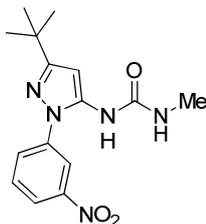


Zu einer Suspension aus **7** (2.94 g, 11.3 mmol) in EtOAc (20 mL) und H_2O (6 mL) wurde bei 0 °C NaOH (1.13 g, 28.3 mmol) gegeben und die resultierende Reaktionsmischung für 30 min gerührt. Darauf folgend wurde 2,2,2-Trichlorethylchlorformiat (2.28 mL, 17.0 mmol)

zugetropft. Nach weiteren 30 min wurde die Reaktionslösung auf RT erwärmt und für weitere 3 h umgesetzt. Der anschließenden Phasentrennung folgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (3 × 25 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (20% EtOAc/PE) lieferte 4.79 g (11.0 mmol, 97%) des gewünschten Produkts als braunes Harz.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.37 (s, 1H), 8.17 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.60 – 7.65 (m, 1H), 6.35 (s, 1H), 4.76 (s, 2H), 3.08 (s, 1H), 1.33 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.56, 148.76, 139.44, 134.81, 130.48, 130.00, 122.31, 119.29, 99.55, 94.84, 76.32, 75.14, 32.72, 30.28. HRMS (ESI-MS) berechnet: 435.03881 und 437.03586 für C₁₆H₁₈³⁵Cl₃N₄O₄ und C₁₆H₁₈³⁷Cl₃N₄O₄ [M + H⁺]. Gefunden: 435.03874 und 437.03519.

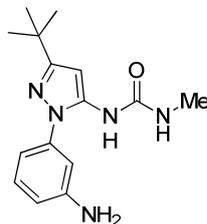
9.1.2.3 Darstellung von 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1H-pyrazol-5-yl)-3-methylharnstoff (4a)



Eine Suspension aus **8** (100 mg, 0.23 mmol), Methylamin Hydrochlorid (155 mg, 230 mmol) und DIPEA (393 μL) in DMSO wurde für 5 h bei RT umgesetzt. Nach Zugabe von ges. NaHCO₃-Lsg. wurde die wässrige Phase mit EtOAc (5 × 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (0.5% MeOH/DCM) lieferte 59 mg (0.19 mmol, 83%) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.39 (s, 1H), 8.32 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.19 (ddd, *J* = 8.2, 2.2, 0.8 Hz, 1H), 8.00 (ddd, *J* = 8.0, 1.9, 0.8 Hz, 1H), 7.78 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.40 – 6.33 (m, 1H), 6.29 (s, 1H), 2.58 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H), 1.28 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.75, 155.33, 148.03, 139.84, 138.45, 130.65, 129.21, 121.06, 117.46, 98.23, 32.13, 30.03, 26.41. HRMS (ESI-MS) berechnet: 318.15607 für C₁₅H₂₀N₅O₃ [M + H⁺]. Gefunden: 318.15611.

9.1.2.4 Darstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-(*tert*-butyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-methylharnstoff (4b)



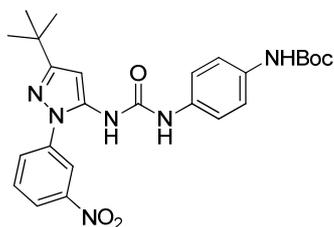
Eine Lösung aus **4a** (104 mg, 0.33 mmol) und Ammoniumformiat (124 mg, 1.97 mmol) in EtOH (7 mL) wurde mit 5% Pd/C (70 mg, 33 μ mol) versetzt und die Suspension für 1 h auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf RT und Filtration über Kieselgur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (2% MeOH/DCM) lieferte 67 mg (0.23 mmol, 70%) eines weißen Feststoffs.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.09 (s, 1H), 7.10 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.66 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.60 – 6.52 (m, 2H), 6.43 (q, $J = 4.1$ Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.36 (s, 2H), 2.61 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H), 1.25 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159.99, 154.75, 149.62, 139.31, 137.83, 129.32, 112.63, 111.21, 109.77, 94.01, 31.94, 30.27, 26.21. HRMS (ESI-MS) berechnet: 288.18189 für $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}$ [M + H $^+$]. Gefunden: 288.18188.

9.1.2.5 Allgemeine Arbeitsanweisung zur Darstellung von *N*-Boc-aminophenyl-3-(3-*tert*-butyl-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoffen (9, 10)

Eine Lösung aus *N*-Boc-phenylendiamin in abs. DMSO wurde mit DIPEA versetzt, für 5 min bei RT gerührt und nach Zugabe von **8** für 24 h bei 60 °C umgesetzt. Darauf folgend wurde das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt, mit ges. NaHCO_3 -Lsg. versetzt und mit EtOAc (3 \times 20 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum konzentriert und das resultierende Rohprodukt per Säulenchromatographie an Kieselgel aufbereitet.

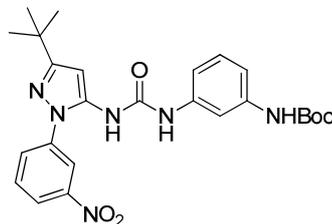
9.1.2.6 Darstellung von *tert*-Butyl (4-(3-(3-(*tert*-butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)phenyl)carbammat (**9**)



9 wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.5** unter Verwendung von *tert*-Butyl 4-aminophenylcarbammat (1.43 g, 6.88 mmol), DMSO (25 mL), DIPEA (2.36 mL, 13.8 mmol) und **8** (3.00 g, 6.88 mmol) hergestellt. Das Rohprodukt wurde durch Säulen-chromatographie an Kieselgel (20-50% EtOAc/PE) aufbereitet und lieferte 2.07 g (4.19 mmol, 61%) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.23 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.80 (s, 2H), 7.72 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.44 - 7.40 (m, 1H), 7.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.28 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 163.56, 151.93, 148.79, 139.40, 134.82, 130.51, 130.02, 122.36, 119.33, 99.55, 94.83, 76.35, 75.17, 60.73, 32.74, 30.29, 26.26, 21.24, 14.32. HRMS (ESI-MS): berechnet: 495.23504 für $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}^+]$. Gefunden: 495.23445.

9.1.2.7 Darstellung von *tert*-Butyl (3-(3-(3-(*tert*-butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)phenyl)carbamat (**10**)



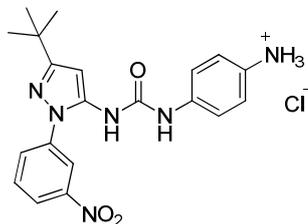
10 wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.5** unter Verwendung von *tert*-Butyl 3-aminophenylcarbamate (300 mg, 0.69 mmol), DMSO (3 mL), DIPEA (236 mL, 1.38 mmol) und **8** (144 mg, 0.69 mmol) hergestellt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (0-0.5% MeOH/DCM) aufbereitet und lieferte 276 mg (0.56 mmol, 81%) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.32 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.36 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.22 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 1H), 7.81 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.11 (dd, $J = 7.7, 4.5$ Hz, 2H), 7.00 – 6.95 (m, 1H), 6.42 (s, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.94, 152.70, 151.74, 148.14, 139.97, 139.61, 139.59, 137.80, 130.83, 129.57, 128.92, 121.42, 117.97, 112.28, 112.03, 108.07, 97.59, 79.01, 32.19, 30.07, 28.14. HRMS (ESI-MS): berechnet: 495.23504 für $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 495.23443.

9.1.2.8 Allgemeine Arbeitsanweisung zur Darstellung von Aminophenyl-3-(3-*tert*-butyl-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochloriden (**11**, **12**)

Verbindung **9** bzw. **10** wurde für ca. 45 min bei RT mit 4 M HCl in Dioxan behandelt und im Anschluss daran die flüchtigen Bestandteile des Reaktionsgemisches im Vakuum entfernt. Die generierten Produkte wurden ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

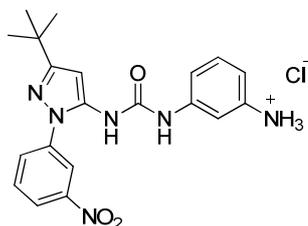
9.1.2.9 Darstellung von 1-(4-Aminophenyl)-3-(3-(*tert*-butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochlorid (**11**)



85 mg (197 μmol , 99%) **11** als beiger Feststoff wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.8** unter Verwendung von **9** (100 mg, 200 μmol) und 4 M HCl in Dioxan (3 mL) hergestellt.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.21 (s, 2H), 9.86 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.80 – 7.76 (m, 1H), 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.41 (s, 1H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.93, 152.27, 148.12, 139.56, 139.38, 137.54, 130.81, 129.44, 125.21, 123.84, 121.38, 118.88, 117.86, 98.24, 32.20, 30.05. HRMS (ESI-MS): berechnet: 395.18262 für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 395.18221.

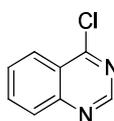
9.1.2.10 Darstellung von 1-(3-Aminophenyl)-3-(3-(*tert*-butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)harnstoff Hydrochlorid (**12**)



98 mg (228 μmol , 99%) **12** als beiger Feststoff wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.8** unter Verwendung von **10** (113 mg, 230 μmol) und 4 M HCl in Dioxan (5 mL) hergestellt.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.27 (s, 2H), 10.00 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.20 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H), 8.07 (dd, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 1H), 7.78 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.40 – 7.31 (m, 2H), 6.97 (dd, $J = 6.5, 2.1$ Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.97, 152.20, 148.15, 140.71, 139.58, 137.45, 132.05, 130.85, 130.17, 129.40, 121.41, 117.86, 117.43, 116.57, 112.52, 98.26, 32.22, 30.07. HRMS (ESI-MS): berechnet: 395.18262 für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 395.18182.

9.1.2.11 Darstellung von 4-Chlorchinazolin (82)



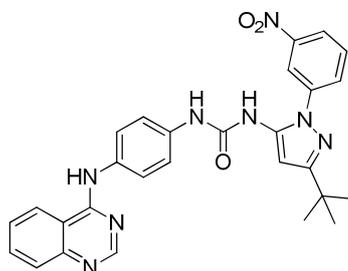
In einer sorgfältig ausgeheizten Glasapparatur unter Ar-Schutzatmosphäre wurde Chinazolin-4-ol (145 mg, 0.99 mmol) vorgelegt und sukzessive SOCl_2 (5 mL) sowie katalytische Mengen an DMF zugefügt. Die entstandene Suspension wurde für 2 h bei 80 °C unter Rückflusskühlung gerührt und anschließend im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde am Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufbereitung in den Folgereaktionen verwendet.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.31 – 9.25 (m, 1H), 8.20 (td, $J = 8.0, 0.9$ Hz, 1H), 8.04 – 7.92 (m, 2H), 7.75 – 7.69 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 159.09, 149.01, 148.96, 136.10, 128.95, 126.87, 126.78, 121.13. HRMS (ESI-MS): berechnet: 165.02140 für $\text{C}_8\text{H}_6\text{ClN}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: nicht detektierbar.

9.1.2.12 Allgemeine Arbeitsanweisung zur Darstellung von 1,3- und 1,4-verknüpften, Nitro-substituierten Hybridverbindungen (2b, 3a)

Eine Suspension aus **11** bzw. **12** und frisch hergestelltem 4-Chlorchinazolin (**82**) in *i*PrOH wurde für 3 h bei 75 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf RT abgekühlt, mit ges. NaHCO_3 -Lsg. versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (4 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Abschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

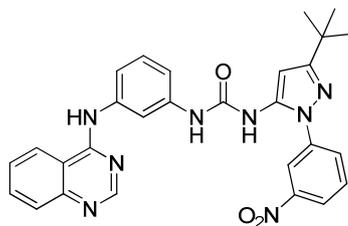
9.1.2.13 Darstellung von 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(chinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (2b)



2b wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.12** unter Verwendung von **11** (137 mg, 0.32 mmol), 4-Chlorchinazolin (116 mg, 0.70 mmol) und *i*PrOH (6 mL) hergestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel (2-4% MeOH/DCM) lieferte 80 mg (0.15 mmol, 47%) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.75 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.56 – 8.50 (m, 2H), 8.40 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.23 (ddd, $J = 8.3, 2.2, 0.7$ Hz, 1H), 8.11 – 8.04 (m, 1H), 7.84 (dt, $J = 14.9, 4.5$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.66 – 7.59 (m, 1H), 7.43 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.44 (s, 1H), 1.31 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.89, 157.73, 154.59, 152.07, 149.57, 148.12, 139.68, 137.80, 135.32, 133.59, 132.90, 130.81, 129.53, 127.73, 126.12, 123.28, 122.91, 121.37, 118.56, 117.85, 115.10, 98.02, 32.18, 30.06. HRMS (ESI-MS): berechnet: 523.22006 für $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 523.21936.

9.1.2.14 Darstellung von 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(3-(chinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (3a)



3a wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.12** unter Verwendung von **12** (134 mg, 0.31 mmol), 4-Chlorchinazolin (130 mg, 0.79 mmol) und *i*PrOH (6 mL)

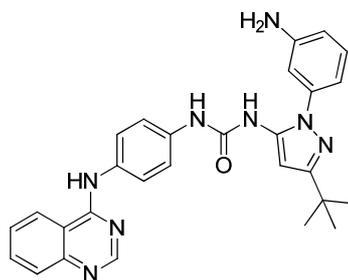
hergestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2% MeOH/DCM) lieferte 106 mg (0.20 mmol, 65%) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.79 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.59 (t, $J = 8.7$ Hz, 3H), 8.39 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1H), 8.07 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.89 – 7.76 (m, 3H), 7.67 – 7.60 (m, 1H), 7.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.31 – 7.20 (m, 2H), 6.44 (s, 1H), 1.30 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.92, 157.78, 154.42, 151.91, 149.62, 148.14, 139.64, 139.55, 139.41, 137.77, 133.04, 130.83, 129.57, 128.72, 127.77, 126.27, 123.08, 121.41, 117.95, 116.55, 115.19, 113.88, 112.44, 97.75, 32.19, 30.06. HRMS (ESI-MS): berechnet: 523.22006 für $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 523.21933.

9.1.2.15 Allgemeine Arbeitsanweisung zur Darstellung von 1,3- und 1,4-verknüpften, Amino-substituierten Hybridverbindungen (2d, 3b)

Eine Suspension aus **2b** bzw. **3a** und SnCl_2 in EtOH wurde für 1.5-3 h bei 70 °C umgesetzt. Nach Einengen der Reaktionsmischung im Vakuum wurde H_2O zugefügt und mit EtOAc (7 × 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum konzentriert und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

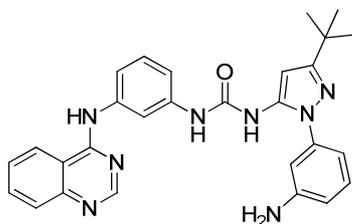
9.1.2.16 Darstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-(tert-butyl)-1H-pyrazol-5-yl)-3-(4-(chinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (2d)



2d wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.15** und unter Verwendung von **2b** (84 mg, 0.16 mmol), SnCl_2 (61 mg, 0.32 mmol) und EtOH (7 mL) hergestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4% MeOH/DCM) lieferte 47 mg (0.10 mmol, 63%) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.77 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.57 – 8.51 (m, 2H), 8.36 (s, 1H), 7.85 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.65 – 7.59 (m, 1H), 7.45 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.16 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.69 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.64 – 6.57 (m, 2H), 6.37 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 1.27 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160.20, 157.74, 154.57, 151.21, 149.79, 149.44, 139.05, 137.18, 135.57, 133.34, 132.95, 129.55, 127.63, 126.17, 123.37, 122.94, 118.12, 115.09, 112.95, 111.47, 110.01, 93.47, 32.00, 30.28. HRMS (ESI-MS): berechnet: 493.24588 für $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 439.24541.

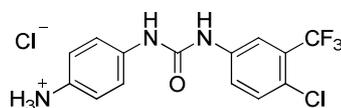
9.1.2.17 Darstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-(*tert*-butyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(3-(chinazolin-4-ylamino)phenyl)harnstoff (3b)



3b wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.2.15** und unter Verwendung von **3a** (145 mg, 0.28 mmol), SnCl_2 (156 mg, 0.82 mmol) und EtOH (10 mL) hergestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4% MeOH/DCM) lieferte 82 mg (0.17 mmol, 61%) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.80 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.61 – 8.57 (m, 2H), 8.39 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.87 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.16 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.69 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.63 – 6.58 (m, 2H), 6.37 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 1.26 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160.21, 157.78, 154.42, 151.10, 149.80, 149.60, 139.59, 139.57, 139.02, 137.13, 133.05, 129.58, 128.75, 127.75, 126.27, 123.09, 116.29, 115.20, 113.52, 112.97, 112.05, 111.50, 110.02, 93.34, 31.99, 30.27. HRMS (ESI-MS): berechnet: 493.24588 für $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 439.24543.

9.1.2.18 Darstellung von 1-(4-Aminophenyl)-3-(4-chlor-3-(trifluormethyl)phenyl)harnstoff Hydrochlorid (**14**)



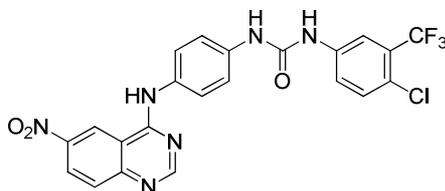
Zu einer Lösung von 1-Chlor-4-isocyanato-2-(trifluormethyl)benzol (200 mg, 0.9 mmol) in DCM (25 mL) wurde bei RT *tert*-Butyl-(4-aminophenyl)carbammat (187 mg, 0.9 mmol) gegeben und für 30 min gerührt. Das Präzipitat wurde abfiltriert und anschließend mit DCM (100 mL) gewaschen. 350 mg (0.81 mmol, 90%) des gewünschten Intermediats *tert*-Butyl-(4-(3-(4-chlor-3-(trifluormethyl)phenyl)ureido)phenyl)carbammat wurden als weißer Feststoff isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.23 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.67 – 7.53 (m, 2H), 7.34 (q, $J = 8.9$ Hz, 4H), 1.46 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.86, 152.46, 139.52, 134.38, 133.56, 131.98, 126.67 ($^2J_{\text{C-F}} = 30.7$ Hz), 122.94, 122.85 ($^3J_{\text{C-F}} = 273.1$ Hz), 122.05, 119.32, 118.70, 116.62 ($^1J_{\text{C-F}} = 6.0$ Hz), 78.82, 28.18. HRMS (ESI-MS): berechnet: 430.11398 und 432.11103 für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3$ und $\text{C}_{19}\text{H}_{20}^{37}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 430.11422 und 432.11113.

Das Zwischenprodukt (318 mg, 0.74 mmol) wurde durch Behandlung mit 4 M HCl in Dioxan (6 mL) für 8 h bei RT zu Verbindung **14** umgesetzt. Nach Evaporation des Lösungsmittels konnten 269 mg (0.735 mmol, 99%) eines beigen Feststoffs erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.14 (s, 2H), 9.95 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.65 – 7.55 (m, 4H), 7.32 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.53, 139.34, 132.07, 126.79 ($^2J_{\text{C-F}} = 30.5$ Hz), 125.28, 123.84, 122.83 ($^1J_{\text{C-F}} = 273.1$ Hz), 122.74, 122.31, 122.29, 119.08, 116.42 ($^3J_{\text{C-F}} = 5.6$ Hz). HRMS (ESI-MS): berechnet: 330.06155 und 332.25860 für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$ und $\text{C}_{14}\text{H}_{12}^{37}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 330.06146 und 332.05837.

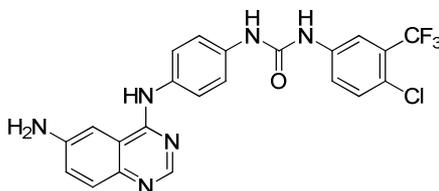
9.1.2.19 Darstellung von 1-(4-Chlor-3-(trifluormethyl)phenyl)-3-(4-((6-nitrochinazolin-4-yl)amino)phenyl)harnstoff (5a)



Zu einer Lösung von **14** (300 mg, 0.82 mmol) in *i*PrOH (10 mL) wurde frisch hergestelltes 4-Chlor-6-Nitrochinazolin (187 mg, 0.89 mmol) gegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 3 h bei 75 °C gerührt. Nach Filtration wurde das Präzipitat mit H₂O und geringen Mengen an *i*PrOH gewaschen. Im Anschluss wurde der Filterkuchen in DCM (100 mL) aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (5 × 50 mL), über Na₂SO₄ getrocknet und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde in EtOAc suspendiert und für 1 h unter Rückfluss (70 °C) gerührt. Nach Filtration der Suspension und Waschen mit EtOAc konnten 287 mg (0.57 mmol, 70%) des gewünschten Produkts als oranger Feststoff isoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.44 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.55 (dd, *J* = 9.1, 2.0 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.64 (q, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.78, 157.90, 153.16, 152.54, 144.47, 139.49, 136.01, 132.91, 132.07, 129.44, 126.79 (²*J*_{C-F} = 30.4 Hz), 123.75, 123.09, 122.93 (¹*J*_{C-F} = 273.0 Hz), 122.34, 122.33, 120.87, 118.85, 116.79 (³*J*_{C-F} = 5.7 Hz), 114.43. HRMS (ESI-MS): berechnet: 503.08408 für C₂₂H₁₅ClF₃N₆O₃ [M + H⁺]. Gefunden: 503.08341.

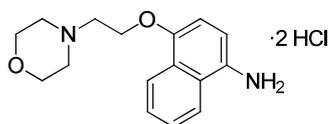
9.1.2.20 Darstellung von 1-(4-((6-Aminochinazolin-4-yl)amino)phenyl)-3-(4-chlor-3-(trifluormethyl)phenyl)harnstoff (5b)



Zu einer Lösung von **5a** (204 mg, 0.41 mmol) in EtOH (38 mL) wurde SnCl₂ (365 mg, 1.92 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 1 h bei 70 °C gerührt. Nach Einengen der Lösung im Vakuum wurde der verbleibende Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (10 × 40 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (1-10% MeOH/DCM), gefolgt von Umkristallisation aus DCM aufgereinigt. Der verbleibende Feststoff wurde darauffolgend in *i*PrOH gelöst, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Es wurden 30 mg (0.06 mmol, 15%) des gewünschten Produkts als gelbgrüner Feststoff erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.27 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.64 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.02, 152.43, 149.93, 147.08, 142.40, 139.47, 134.59, 134.38, 131.94, 128.52, 126.67 (²*J*_{C-F} = 30.5 Hz), 123.39, 122.91, 122.81 (¹*J*_{C-F} = 273.1 Hz), 122.51, 122.08, 122.06, 118.85, 116.62 (³*J*_{C-F} = 5.6 Hz), 101.12. HRMS (ESI-MS): berechnet: 473.10990 für C₂₂H₁₇ClF₃N₆O [M + H⁺]. Gefunden: 473.10945.

9.1.2.21 Darstellung von 4-(2-Morpholinoethoxy)naphthalen-1-amin Dihydrochlorid (**22**)



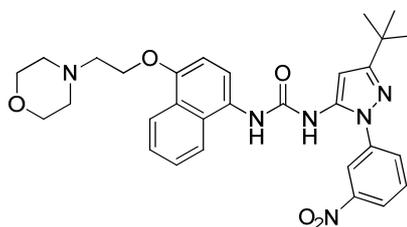
Eine Lösung aus *tert*-Butyl-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)carbammat (525 mg, 2.03 mmol) in MeCN (15 mL) wurde mit 4-(2-Chlorethyl)morpholin Hydrochlorid (465 mg, 1.53 mmol) und K₂CO₃ (1.24 g, 8.97 mmol) versetzt und die entstandene Suspension für 3 h unter Rühren auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum. Anschließend wurden H₂O und EtOAc (1:1, 50 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Säulenchromatographie an Kieselgel (80-90% EtOAc/PE) lieferte 500 mg (1.34 mmol, 66%) des gewünschten Intermediats (**21**) *tert*-Butyl 4-(2-morpholinoethoxy)naphthalen-1-yl)carbammat als weißen Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.94 (s, 1H), 8.23 – 8.13 (m, 1H), 7.98 – 7.86 (m, 1H), 7.63 – 7.45 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.26 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.62 – 3.56 (m, 4H), 2.85 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.58 – 2.52 (m, 4H), 1.47 (s, 9H).

21 (500 mg, 1.34 mmol) wurde durch Behandlung mit 4 M HCl in Dioxan (6 mL) für 1 h bei RT zu Verbindung **22** umgesetzt. Nach Evaporation des Lösungsmittels konnten 463 mg (1.34 mmol, quant.) eines weißen Feststoffs erhalten werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.78 (s, 2H), 8.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 11.3, 4.0 Hz, 1H), 7.69 – 7.61 (m, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.71 – 4.58 (m, 2H), 3.94 (d, *J* = 19.8 Hz, 4H), 3.75 – 3.69 (m, 2H), 3.56 (s, 1H), 3.54 (d, *J* = 18.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 152.76, 127.54, 127.45, 126.61, 125.12, 122.60, 122.03, 120.72, 104.66, 66.36, 63.20, 62.88, 54.72, 51.51. HRMS (ESI-MS): berechnet: 273.15975 für C₁₆H₂₁N₂O₂ [M + H⁺]. Gefunden: 273.15995.

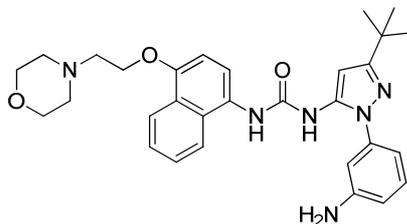
9.1.2.22 Darstellung von 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-morpholinoethoxy)naphthalen-1-yl)harnstoff (23)



Eine Lösung aus **22** (200 mg, 0.46 mmol) und DIPEA (315 μ L, 1.84 mmol) in DMSO (10 mL) wurde für 10 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von **8** (159 mg, 0.46 mmol) in DMSO (1 mL) wurde die Reaktionsmischung für 9 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde der auf RT abgekühlte Ansatz mit ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt und mit EtOAc (4 \times 25 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Säulenchromatographie an Kieselgel (0-2% MeOH/DCM) lieferte 232 mg (0.42 mmol, 91%) der gewünschten Verbindung als braunes Harz.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.77 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.44 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 8.17 (dd, *J* = 6.5, 3.1 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H), 7.88 – 7.79 (m, 2H), 7.53 (dd, *J* = 6.0, 3.6 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.25 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.62 – 3.55 (m, 4H), 2.84 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.54 (s, 4H), 1.30 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.82, 153.43, 151.40, 148.10, 139.92, 137.97, 130.78, 129.44, 129.13, 126.40, 126.35, 125.41, 125.24, 122.14, 121.26, 117.54, 107.16, 105.02, 98.70, 66.27, 57.02, 53.74, 53.67, 40.43, 32.20, 30.07. HRMS (ESI-MS): berechnet: 559.26634 für C₃₀H₃₅N₆O₅ [M + H⁺]. Gefunden: 559.26542.

9.1.2.23 Darstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-(*tert*-butyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-morpholinoethoxy)naphthalen-1-yl)harnstoff (19)

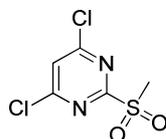


Einer Lösung aus **23** (268 mg, 0.48 mmol) in EtOH (6 mL) wurden NH_4HCOO (121 mg, 1.92 mmol) und 5% Pd/C (102 mg, 0.048 mmol) zugefügt und die entstandene Suspension für 90 min unter Rückfluss (90 °C Ölbadtemperatur) umgesetzt. Nach Filtration der Reaktionsmischung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand per HPLC (MeCN/ H_2O + 0.1% TFA) gereinigt. Anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel (4% MeOH/DCM) lieferte 169 mg (0.32 mmol, 66%) der Zielverbindung als rosa-weißen Feststoff.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.85 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.61 – 7.50 (m, 2H), 7.16 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.73 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.62 (dd, $J = 13.0, 5.0$ Hz, 2H), 6.35 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.26 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.61 – 3.57 (m, 4H), 2.86 (dd, $J = 12.7, 7.4$ Hz, 2H), 2.55 (bs, 4H), 1.26 (s, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 160.17, 152.34, 150.80, 149.78, 139.22, 137.43, 129.50, 128.26, 126.68, 126.36, 125.36, 125.20, 121.97, 121.92, 120.24, 112.88, 111.37, 109.95, 105.11, 93.75, 66.25, 57.04, 53.67, 40.13, 31.99, 30.28. HRMS (ESI-MS): berechnet: 529.29217 für $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 529.29161.

9.1.3 Synthese von TBK1-Inhibitoren

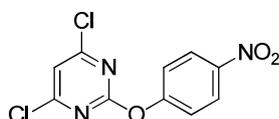
9.1.3.1 Darstellung von 4,6-Dichlor-2-(methylsulfonyl)pyrimidin (**69**)



Einer Lösung aus 4,6-Dichlor-2-(methylthio)pyrimidin (3.00 g, 15.4 mmol) in DCM (100 mL) wurde bei 0 °C portionsweise *m*CPBA (77%ig, 13.8 g, 61.5 mmol) zugefügt und die resultierende Suspension für 72 h bei RT gerührt. Nach mehrmaligem Waschen der Reaktionsmischung mit ges. Na₂S₂O₃- und NaHCO₃-Lsg. (2:1) und Extraktion der kombinierten wässrigen Phasen mit EtOAc (3 × 200 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (20-33% EtOAc/PE) lieferte 3.00 g (13.3 mmol, 86%) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.42 (s, 1H), 3.43 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.84, 162.66, 125.35, 39.23; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.84, 162.66, 125.35, 39.23; HRMS (ESI-MS): berechnet: 226.94433 für C₅H₅Cl₂N₂O₂S [M + H⁺]. Gefunden: nicht detektierbar.

9.1.3.2 Darstellung von 4,6-Dichlor-2-(4-nitrophenoxy)pyrimidin (**70a**)



Zu einer Lösung aus 4-Nitrophenol (673 mg, 4.84 mmol) in abs. THF (15 mL) wurde bei 0 °C NaH (60% Dispersion in Mineralöl, 193 mg, 13.4 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 30 min bei 0 °C umgesetzt, anschließend bei 0 °C zu einer Lösung aus **69** (1.00 g, 4.39 mmol) in THF (15 mL) getropft und die resultierende Reaktionsmischung für weitere 4 h umgesetzt. Nach Zugabe von EtOAc und ges. NaHCO₃-Lsg. erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (3 × 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über

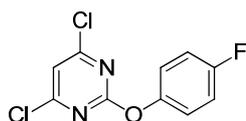
Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (10% EtOAc/PE) lieferte 565 mg (2.00 mmol, 45%) eines weißen Feststoffs.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.39 – 8.32 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.68 – 7.52 (m, 2H);
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.63, 162.58, 156.61, 145.08, 125.62, 122.67, 117.04.
HRMS (ESI-MS): berechnet: 285.97807 für C₁₀H₆Cl₂N₃O₃ [M + H⁺]. Gefunden: nicht detektierbar.

9.1.3.3 Allgemeine Arbeitsanweisung zur Darstellung von 2-Phenoxy-substituierten 4,6-Dichlorpyrimidinen (70b-e)

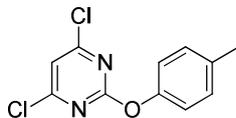
Einer Lösung aus **69** in *t*BuOH wurde Natriumacetat zugefügt und die Reaktionsmischung für 10 min bei 90 °C umgesetzt. Dem Ansatz wurde das entsprechende 4-substituierte Phenol zugesetzt und für weitere 30 min unter Rückfluss gerührt. Nach Zugabe von EtOAc und ges. NaHCO₃-Lsg. folgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (3 × 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum eingeeengt und das Rohprodukt ohne vorherige Reinigung in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt.

9.1.3.4 Darstellung von 4,6-Dichlor-2-(4-fluorphenoxy)pyrimidin (70b)



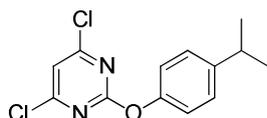
70b wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.3** und unter Verwendung von **69** (300 mg, 1.32 mmol), Natriumacetat (217 mg, 2.65 mmol) und 4-Fluorphenol (148 mg, 1.32 mmol) in *t*BuOH (10 mL) hergestellt. Es wurden 124 mg des Rohprodukts als weißer Feststoff erhalten.

9.1.3.5 Darstellung von 4,6-Dichlor-2-(*p*-tolylloxy)pyrimidin (70c)



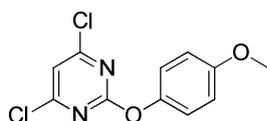
70c wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.3** und unter Verwendung von **69** (300 mg, 1.32 mmol), Natriumacetat (217 mg, 2.65 mmol) und *p*-Cresol (157 mg, 1.45 mmol) in *t*BuOH (10 mL) hergestellt. Es wurden 303 mg eines gelben Rohmaterials erhalten.

9.1.3.6 Darstellung von 4,6-Dichlor-2-(4-isopropylphenoxy)pyrimidin (70d)



70d wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.3** und unter Verwendung von **69** (300 mg, 1.32 mmol), Natriumacetat (217 mg, 2.65 mmol) und 4-Isopropylphenol (198 mg, 1.45 mmol) in *t*BuOH (10 mL) hergestellt. Es wurden 303 mg des Rohmaterials als gelber Feststoff erhalten.

9.1.3.7 Darstellung von 4,6-Dichlor-2-(4-methoxyphenoxy)pyrimidin (70e)



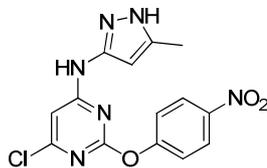
70e wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.3** und unter Verwendung von **69** (300 mg, 1.32 mmol), Natriumacetat (217 mg, 2.65 mmol) und 4-Methoxyphenol

(164 mg, 1.32 mmol) in ^tBuOH (10 mL) hergestellt. 124 mg des Rohprodukts wurden als weißer Feststoff erhalten.

9.1.3.8 Allgemeine Arbeitsanweisung zur Darstellung von 4-Pyrazolo-substituierten 6-Chlor-2-phenoxy-pyrimidinen (71a-e)

Eine Lösung aus 5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-amin und DIPEA in DMF wurde für 10 min bei 85 °C gerührt. Darauf folgend wurde das zu derivatisierende 2-Phenoxy-substituierte 4,6-Dichlorpyrimidin (**70a-e**) zugegeben und die entstehende Reaktionsmischung für weitere 12 h bei 85 °C umgesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit EtOAc bzw. DCM und ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt, mit EtOAc bzw. DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingengt. Säulenchromatographie an Kieselgel lieferte das gewünschte Produkt.

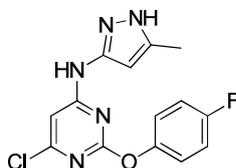
9.1.3.9 Darstellung von 6-Chlor-*N*-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-2-(4-nitrophenoxy)pyrimidin-4-amin (**71a**)



71a wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.8** und unter Verwendung von 5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-amin (338 mg, 3.48 mmol), DIPEA (646 μ L, 3.80 mmol), **70a** (906 mg, 3.17 mmol) und DMF (20 mL) hergestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel (50-75% EtOAc/PE) lieferte 767 mg (2.21 mmol, 70%) des gewünschten Produkts als mattgelben Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.03 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 8.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 2.00 (s, 3H). HRMS (ESI-MS): berechnet: 347.06539 und 349.06244 für C₁₄H₁₂³⁵ClN₆O₃ und C₁₄H₁₂³⁷ClN₆O₃ [M + H⁺]. Gefunden: 347.06551 und 349.06243.

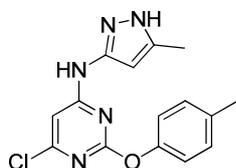
9.1.3.10 Darstellung von 6-Chlor-2-(4-fluorphenoxy)-N-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (71b)



71b wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.8** und unter Verwendung von 5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-amin (54 mg, 0.56 mmol), DIPEA (98 μ L, 0.58 mmol), **70b** (124 mg, 0.48 mmol) und DMF (10 mL) hergestellt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (50-75% EtOAc/PE) lieferte 119 mg (0.37 mmol, 28%, 2 Stufen) des gewünschten Produkts als matt-gelben Feststoff.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.99 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 7.31 – 7.24 (m, 4H), 6.51 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 2.07 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 173.27, 160.45, 158.62, 148.78, 124.00, 120.57, 116.10 ($^2J_{\text{C-F}} = 23.4$ Hz), 109.09, 99.24, 95.26, 83.27, 10.39. HRMS (ESI-MS): berechnet: 320.07089 und 322.06794 für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}^{35}\text{ClFN}_5\text{O}$ und $\text{C}_{14}\text{H}_{12}^{37}\text{ClFN}_5\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 320.07116 und 322.06801.

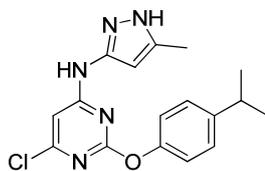
9.1.3.11 Darstellung von 6-Chlor-N-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-2-(*p*-tololyoxy)pyrimidin-4-amin (71c)



71 mg (0.22 mmol, 17%, 2 Stufen) **71c** als gelber Feststoff wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.8** unter Verwendung von 5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-amin (156 mg, 1.61 mmol), DIPEA (240 μ L, 1.41 mmol), **70c** (300 mg, Rohprodukt) und DMF (15 mL) sowie Säulenchromatographie an Kieselgel (50-75% EtOAc/PE) hergestellt.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.96 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.06 (s, 3H). HRMS (ESI-MS): berechnet: 316.09596 und 318.09301 für $\text{C}_{15}\text{H}_{15}^{35}\text{ClN}_5\text{O}$ und $\text{C}_{15}\text{H}_{15}^{37}\text{ClN}_5\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 316.09637 und 318.09322.

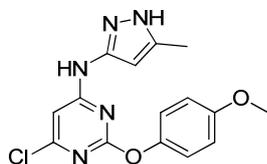
9.1.3.12 Darstellung von 6-Chlor-2-(4-isopropylphenoxy)-*N*-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (71d)



71d wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.8** und unter Verwendung von 5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-amin (119 mg, 1.20 mmol), DIPEA (216 μL , 1.23 mmol), **70d** (303 mg, Rohprodukt) und DMF (15 mL) hergestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel (50-75% EtOAc/PE) lieferte 61 mg (0.18 mmol, 14%, 2 Stufen) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.01 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.73 (s, 1H), 2.94 (sep, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.05 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.23 (s, 3H). HRMS (ESI-MS): berechnet: 344.12726 und 346.12431 für $\text{C}_{17}\text{H}_{19}^{35}\text{ClN}_5\text{O}$ und $\text{C}_{17}\text{H}_{19}^{37}\text{ClN}_5\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 344.12730 und 346.12425.

9.1.3.13 Darstellung von 6-Chlor-2-(4-methoxyphenoxy)-*N*-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (**71e**)



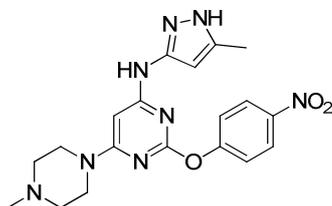
56 mg (0.17 mmol, 13%, 2 Stufen) **71e** als gelber Feststoff wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.8** unter Verwendung von 5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-amin (40 mg, 0.41 mmol), DIPEA (72 μ L, 0.42 mmol), **70e** (95 mg, 0.35 mmol) und DMF (10 mL) sowie Säulenchromatographie an Kieselgel (50-75% EtOAc/PE) hergestellt.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.97 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 7.17 – 7.09 (m, 2H), 7.00 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.47 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.04 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 162.31, 158.36, 156.65, 154.80, 146.10, 123.02, 114.52, 98.96, 96.01, 55.42, 35.80, 30.78, 10.42. HRMS (ESI-MS): berechnet: 332.09088 und 334.08793 für $\text{C}_{15}\text{H}_{15}^{35}\text{ClN}_5\text{O}_2$ und $\text{C}_{15}\text{H}_{15}^{37}\text{ClN}_5\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 332.09119 und 334.08811.

9.1.3.14 Allgemeine Arbeitsanweisung zur Darstellung von 2-Phenoxy-6-piperazino-4-pyrazolo-substituierten Pyrimidinen (**63**)

Das umzusetzende Intermediat (**71a-e**) wurde in 1-Methylpiperazin gelöst und die entstandene Reaktionslösung für 30 min bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde dem Ansatz ges. NaHCO_3 -Lsg. und EtOAc zugefügt und die wässrige Phase mit EtOAc (3-5 \times 50-100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (2-6% MeOH/DCM + 1% $\text{NH}_3(\text{aq})$) und/oder per HPLC (MeCN/ H_2O + 5 mM Ammoniumacetat).

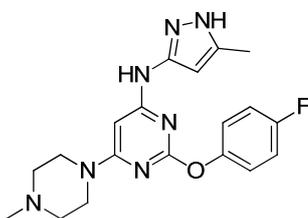
9.1.3.15 Darstellung von *N*-(5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-nitrophenoxy)pyrimidin-4-amin (**63i**)



Die Herstellung von **63i** erfolgte gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.14** und unter Verwendung von **71a** (452 mg, 1.30 mmol) und 1-Methylpiperazin (10 mL). 439 mg (1.07 mmol, 82%) des gewünschten Produkts konnten nach säulenchromatographischer Aufreinigung als hellgelber Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.83 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.36 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.43 (s, 4H), 2.34 (s, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.07 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.29, 161.42, 158.85, 148.81, 143.66, 138.49, 138.05, 125.15, 122.47, 94.97, 79.63, 54.03, 45.66, 43.70, 9.96. HRMS (ESI-MS): berechnet: 411.18876 für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 411.18887.

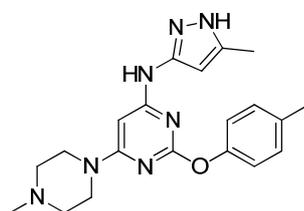
9.1.3.16 Darstellung von 2-(4-Fluorphenoxy)-*N*-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-amin (**63c**)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.14** wurde **63c** durch Umsetzung von **71b** (95 mg, 0.28 mmol) und 1-Methylpiperazin (15 mL) dargestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel und anschließende Aufreinigung per HPLC lieferten 90 mg (0.23 mmol, 82%) der gewünschten Zielverbindung als weißen Feststoff.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.77 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 2H), 7.20 – 7.15 (m, 2H), 6.21 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 3.45 – 3.37 (m, 4H), 2.38 – 2.30 (m, 4H), 2.19 (s, 3H), 2.08 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.17, 161.37, 158.11, 149.45, 148.91, 137.93, 129.80, 123.79 ($^3J_{\text{C-F}} = 7.5$ Hz), 115.70 ($^2J_{\text{C-F}} = 23.1$ Hz), 94.95, 78.95, 54.10, 45.72, 43.66, 10.19. HRMS (ESI-MS): berechnet: 384.19426 für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}^+]$. Gefunden: 384.19455.

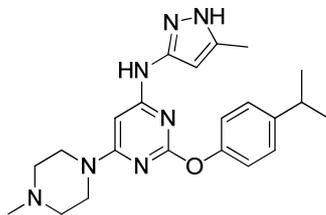
9.1.3.17 Darstellung von *N*-(5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(*p*-tolylloxy)pyrimidin-4-amin (63e)



Basierend auf der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.14** und unter Verwendung von **71c** (60 mg, 0.19 mmol) und 1-Methylpiperidin (10 mL) sowie Aufreinigung per Säulenchromatographie an Kieselgel und HPLC wurden 55 mg (0.14 mmol, 74%) des gewünschten Produkts als weißer Feststoff isoliert.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.75 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.01 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 6.19 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 3.44 – 3.38 (m, 4H), 2.36 – 2.32 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.07 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.41, 161.36, 151.12, 148.99, 133.27, 137.85, 129.58, 121.75, 95.15, 78.90, 69.95, 54.11, 45.71, 43.65, 20.40, 9.84. HRMS (ESI-MS): berechnet: 380.21933 für $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}^+]$. Gefunden: 388.21969.

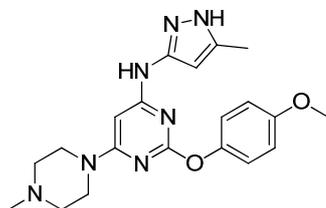
9.1.3.18 Darstellung von 2-(4-Isopropylphenoxy)-N-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-amin (63f)



Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.14** und unter Verwendung von **71d** (40 mg, 116 μmol) und 1-Methylpiperazin (10 mL) sowie Aufreinigung durch Säulenchromatographie an Kieselgel und HPLC wurden 40 mg (98 μmol , 84%) des gewünschten Zielmoleküls als weißer Feststoff hergestellt.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.75 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.07 – 7.00 (m, 2H), 6.19 (s, 1H), 5.66 (s, 1H), 3.46 – 3.38 (m, 4H), 2.92 (sep, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.39 – 2.29 (m, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.22 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.31, 161.38, 151.24, 148.86, 144.18, 137.80, 129.78, 126.88, 121.60, 94.48, 78.99, 54.14, 45.74, 43.68, 32.85, 24.04, 10.17. HRMS (ESI-MS): berechnet: 408.25064 für $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}^+]$. Gefunden: 408.25056.

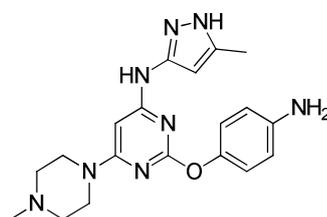
9.1.3.19 Darstellung von 2-(4-Methoxyphenoxy)-N-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-amin (63h)



Analog der allgemeinen Arbeitsanweisung **9.1.3.14** und unter Verwendung von **71e** (45 mg, 136 μmol) und 1-Methylpiperazin (5 mL) sowie Aufreinigung durch Säulenchromatographie an Kieselgel und HPLC wurden 44 mg (111 μmol , 82%) des gewünschten Produkts als weißer Feststoff erhalten.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.75 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 7.08 – 7.02 (m, 2H), 6.99 – 6.91 (m, 2H), 6.16 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.43 – 3.38 (m, 4H), 2.36 – 2.31 (m, 4H), 2.19 (s, 3H), 2.06 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.32, 161.35, 156.02, 149.02, 146.77, 137.83, 130.27, 122.94, 114.17, 94.86, 78.81, 55.35, 54.13, 45.75, 43.67, 9.87. HRMS (ESI-MS): berechnet: 396.21425 für $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 396.21406.

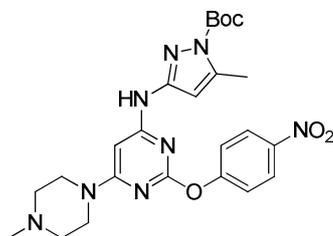
9.1.3.20 Darstellung von 2-(4-Aminophenoxy)-*N*-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-amin (63j)



Zu einer Lösung aus **63i** (50 mg, 0.13 mmol) in EtOH (8 mL) wurden NH_4HCOO (49 mg, 0.78 mmol) und 5% Pd/C (28 mg, 0.01 mmol) gegeben. Die Suspension wurde für 1 h bei 95 °C (Ölbadtemperatur) umgesetzt und nach anschließender Filtration der Reaktionsmischung über Kieselgur wurde das Filtrat im Vakuum eingengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (4% MeOH/DCM) lieferte 35 mg (0.09 mmol, 69%) der Zielverbindung als gelben Feststoff.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.70 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 6.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.29 – 6.04 (m, 1H), 5.71 (s, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.40 (s, 4H), 2.36 – 2.30 (m, 4H), 2.19 (s, 3H), 2.10 (s, 3H). HRMS (ESI-MS): berechnet: 381.21458 für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]. Gefunden: 381.21539.

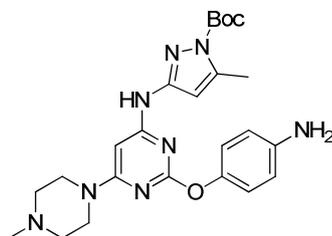
9.1.3.21 Darstellung von *tert*-Butyl 5-methyl-3-((6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(4-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (72)



Einer Lösung aus **63i** (500 mg, 1.22 mmol) in abs. MeOH (10 mL) und Et₃N (648 μ L, 4.65 mmol) wurde Boc₂O (1.1 mL, 4.79 mmol) zugegeben und die entstandene Reaktionsmischung für 12 h bei RT umgesetzt. Im Anschluss wurde die klare Lösung mit DCM (20 mL) und ges. NaHCO₃-Lsg. (20 mL) versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 \times 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3-6% MeOH/DCM) lieferte 412 mg (0.81 mmol, 66%) des gewünschten Produkts als rosa Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.92 (s, 1H), 8.31 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.48 – 7.41 (m, 2H), 6.66 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 3.47 (s, 4H), 2.35 (s, 4H), 2.31 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.54 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.37, 163.31, 160.64, 158.63, 150.34, 148.22, 143.87, 143.29, 125.24, 122.67, 102.48, 83.55, 81.19, 54.00, 45.61, 43.62, 27.56, 13.98. HRMS (ESI-MS): berechnet: 511.24119 für C₂₄H₃₁N₈O₅ [M + H⁺]. Gefunden: 511.24046.

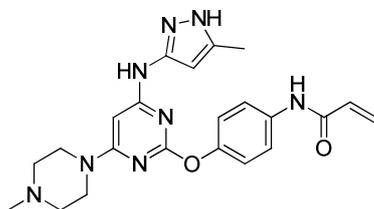
9.1.3.22 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((2-(4-aminophenoxy)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)amino)-5-methyl-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (**73**)



Zu einer Lösung von **72** (175 mg, 0.34 mmol) und Ammoniumformiat (132 mg, 2.09 mmol) in EtOH (10 mL) wurde 5%iges Pd/C (73.2 mg, 0.03 mmol) gegeben. Die Suspension wurde für 30 min unter Rückfluss bei 90 °C (Ölbadtemperatur) gerührt und der Katalysator im Anschluss über Kieselgur abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt, der Rückstand in DCM aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lsg. sowie Wasser gewaschen. Nach Trennung der Phasen wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographische Aufreinigung (2-4% MeOH/DCM + 1% NH_{3(aq)}) lieferte 133 mg (0.28 mmol, 82%) des gewünschten Produkts als gelb-braunen Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.81 (s, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.44 (s, 4H), 2.34 (s, 7H), 2.20 (s, 3H), 1.53 (s, 9H).
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.08, 164.40, 160.74, 150.65, 148.31, 145.62, 143.40, 143.08, 122.37, 114.16, 103.16, 83.39, 54.11, 48.58, 45.69, 43.58, 27.60, 14.14. HRMS (ESI-MS): berechnet: 481.26701 für C₂₄H₃₃N₈O₅ [M + H⁺]. Gefunden: 481.26676.

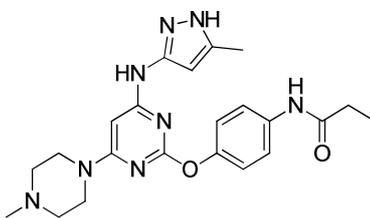
9.1.3.23 Darstellung von *N*-(4-((4-((5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)acrylamid (63a)



Eine Lösung aus **73** (200 mg, 0.42 mmol) in THF (5 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und mit DIPEA (646 µL, 3.80 mmol) versetzt. Dem Ansatz wurde eine Lösung aus Acryloylchlorid (762 µL, 0.94 mmol) in THF (20 mL) über einen Zeitraum von 30 min hinzugetropt und dieser nach vollständiger Zugabe für weitere 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden DCM (~50 mL) und ges. NaHCO₃-Lsg. (~50 mL) zugesetzt. Nach Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (2 × 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde erneut in DCM (1 mL) aufgenommen und bei RT für 2 h mit 25% TFA in DCM (15 mL) behandelt. Nach vorsichtiger Zugabe von ges. NaHCO₃-Lsg. (30 mL) wurde die wässrige Phase mit DCM (3 × 100 mL) extrahiert, die kombinierten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Durch Aufreinigung des Rohprodukts per Säulenchromatographie an Kieselgel (4-6% MeOH/DCM + 1% NH_{3(aq)}) konnten 60 mg (0.14 mmol, 33%) des gewünschten Produkts als weißer Feststoff isoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.74 (s, 1H), 10.17 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.44 (dd, *J* = 16.9, 10.0 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.76 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.44 – 3.39 (m, 4H), 2.34 (s, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.05 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 164.45, 164.24, 162.98, 161.40, 149.00, 138.72, 135.51, 131.86, 128.65, 126.70, 122.24, 120.11, 94.90, 78.93, 54.08, 45.67, 43.65, 10.13. HRMS (ESI-MS): berechnet: 435.22515 für C₂₂H₂₇N₈O₂ [M + H⁺]. Gefunden: 435.22457.

9.1.3.24 Darstellung von *N*-(4-((4-((5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)propionamid (**63b**)



63b (115 mg, 0.24 mmol) wurde in THF (5 mL) vorgelegt, bei 0 °C mit DIPEA (163 µL, 0.96 mmol) versetzt und dem Ansatz unter Rühren eine Lösung aus Propionylchlorid (84 µL, 0.85 mmol) in THF (20 mL) tropfenweise zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 30 min bei 0 °C umgesetzt und anschließend mit DCM (~50 mL) und ges. NaHCO₃-Lsg. (~50 mL) versetzt. Nach Extraktion mit DCM (2 × 50 mL) und Vereinigung der organischen Phasen, folgte die Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wurde in DCM (1 mL) aufgenommen und unter Rühren für 1 h mit 25% TFA in DCM (10 mL) behandelt. Nach Alkalisierung mit ges. NaHCO₃-Lsg. und Extraktion der wässrigen Phase mit DCM wurden die kombinierten organischen Phasen eingeengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (1-6% MeOH/DCM + 1% NH_{3(aq)}) und anschließender HPLC (MeCN/H₂O + 5 mM Ammoniumacetat) aufgereinigt, wodurch 61 mg (0.14 mmol, 58%) des gewünschten Produkts als weißer Feststoff erhalten wurden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.73 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.19 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 3.43 – 3.37 (m, 4H), 2.35 – 2.29 (m, 6H), 2.19 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.73, 164.47, 164.23, 161.38, 148.50, 137.44, 135.87, 122.07, 119.73, 114.41, 95.11, 78.87, 54.09, 45.70, 43.65, 29.48, 10.17, 9.75. HRMS (ESI-MS): berechnet: 437.24080 für C₂₂H₂₉N₈O₂ [M + H⁺]. Gefunden: 437.24023.

9.2 Biochemische Charakterisierung

9.2.1 Vorbemerkungen

Zur biochemischen Charakterisierung ausgewählter organischer Verbindungen, im Hinblick auf die Bestimmung ihrer IC_{50} -Werte gegenüber diversen Kinasen, wurde das kommerziell erhältliche Assaysystem KinEASE™ von Cisbio Bioassays genutzt. Weiterhin fand dieses System Anwendung bei der Durchmusterung fokussierter Substanzbibliotheken. Für die Messung der direkten, kovalenten Bindung niedermolekularer organischer Inhibitoren an Zielproteine wurde die Methode nach Klüter *et al.*²⁹ gewählt. Chemikalien und Reagenzien zur Vorbereitung von Puffer-, Protein- und Additivilösungen wurden von den Firmen Fisher Scientific, Carl Roth GmbH und Sigma-Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Proteine, die nicht laborintern exprimiert und isoliert wurden, wurden kommerziell über die Firmen Millipore GmbH, Proqinase GmbH und Invitrogen Corporation erworben (vgl. Tabelle 9.2.1).

Tabelle 9.2.1: Übersicht über kommerziell bezogene Proteinpräparationen.

Protein (aktiv)	Hersteller	Bestellnummer	Lotnummer(n)
Abl, T315I	Invitrogen Corporation	PV3866	39639B
Aurora A, wt	Millipore GmbH	14-511	1590319-B
KIT, V559D/T670I	Proqinase GmbH	1044-0000-1	002
KIT, wt	Proqinase GmbH	0979-0000-1	010
			D9SN044N
TBK1, wt	Millipore GmbH	14-628	D9SN044N-A
			D9SN044N-B
			D9SN044N-C

9.2.2 Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™)

9.2.2.1 Grundlagen

Das aktivitätsbasierte Testsystem beruht auf der Detektion des γ -Phosphatgruppentransfers von ATP, katalysiert durch die zu untersuchende Kinase, auf ein biotinyliertes, artifizielles Substratpeptid mit implementiertem Tyr bzw. Ser/Thr durch Förster-Resonanzenergietransfer. Dazu wird die Kinase mit unterschiedlichen Konzentrationen an Inhibitor präinkubiert und die Katalysereaktion anschließend durch Zugabe von ATP und Substrat gestartet. Nach der optimalen Reaktionszeit wird diese durch Zugabe einer Detektionslösung gestoppt. Eine Komponente dieser Lösung stellt EDTA dar, welches das für die Katalysereaktion essentielle Mg^{2+} komplexiert und somit aus der Reaktion entfernt. Nach abgeschlossener Kinasereaktion kann die relative Menge des Phosphotransfers auf das eingesetzte Peptid durch Bindung eines ebenfalls in der Stopp-Lsg. enthaltenen Streptavidin-gebundenen XL665-Fluorophors (FRET-Akzeptor) sowie eines pTyr- bzw. pSer/pThr-spezifischen Antikörpers, mit terminal verknüpftem Eu^{3+} -Kryptat (FRET-Donor), an das phosphorylierte Substrat ermittelt werden. Diese Bestimmung erfolgt über Messung der zeitaufgelösten Emission bei einer Wellenlänge von 665 nm bzw. 620 nm und einer Exzitationswellenlänge von 317 nm (vgl. Abbildung 9.1). Für die Bestimmung von IC_{50} -Werten oder Assayparametern wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt und die Resultate als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung angegeben.

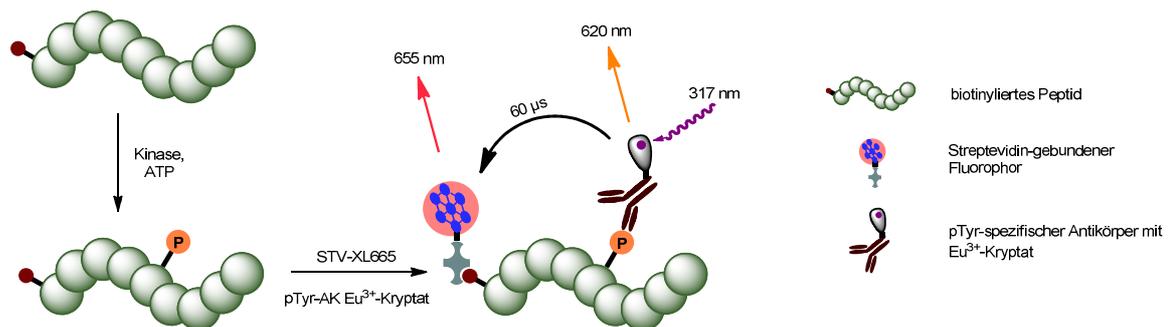


Abbildung 9.1: Grundlegendes Prinzip des aktivitätsbasierten Assaysystems KinEASE™.

9.2.2.2 Arbeitsanweisung zur Generierung von IC₅₀-Werten per HTRF®

Der Assay wurde in weißen Mikrotiterplatten (384 Kavitäten) mit einem Kavitätvolumen von 25 µL der Firma Greiner Bio One (#784075) durchgeführt und die resultierende Fluoreszenzemission mit Hilfe eines TECAN Infinite M1000 Mikrotiterplatten-Lesegeräts gemessen. Allgemeine Assayparameter in Korrelation zur jeweils verwendeten Kinase sind in Tabelle 3.2.1 aufgeführt. Zunächst wurden 5 µL der zu untersuchenden Proteinkinase in Kinasepuffer (MgCl₂, DTT, Triton X-100, 5 x HTRF-Puffer, H₂O) vorgelegt und anschließend mit 2.5 µL einer Inhibitorlösung inkubiert. Da die Inhibitoren als Stammlösung in DMSO vorlagen, betrug der finale Gehalt an DMSO im Testsystem 2%. Die Inkubationszeit von Kinase und Inhibitor richtete sich nach der Art der niedermolekularen Verbindungen (kovalent oder reversibel bindend) sowie der Stabilität der Kinase bei RT, und konnte somit in einem Bereich von 30-240 min variieren.

Tabelle 9.2.2: Additivkonzentrationen in Kinase- und Detektionspuffer für unterschiedliche Kinasen. Für die Untersuchung von potentiell kovalent bindenden Inhibitoren wurde kein DTT verwendet.

Protein	Assaypuffer			Detektionslösung	
	MgCl ₂	DTT	Triton X100	XL665 (nM)	XL665/Subst.
Abl, T315I^a	5 mM	1 mM	0.01%	150	1/2
Abl, wt^a				100	1/1
Ark1 as3cys	10 mM	1 mM	0.01%	75	1/4
Ark1 as3cys + Pic1				62.5	1/4
Ark1, wt				50	1/4
Ark1, wt + Pic1				25	1/4
Aurora A, mut				71.3	1/8
Aurora A, wt				225	1/2
Aurora A, mut + Acrylodan	162.5	1/4			
KIT, V559D/T670I	10 mM	1 mM	0.01%	74	1/4
KIT, wt				87.5	1/4
cSrc, DM	5 mM	1 mM	0.01%	125	1/2
cSrc, SM				100	1/1
TBK1	10 mM	1 mM	0.01%	250	1/4

^a Der Assaypuffer wurde nach Anweisung des Herstellers mit 50 nM des Additivs „SEB“ versetzt.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 2.5 µL einer ATP/Substrat-Mischung, wobei deren finale Konzentrationen im Bereich des ermittelten K_M -Wertes für die jeweils getestete Kinase lagen (siehe Kap. 9.2.2.4). Für die Untersuchung von Tyr-Kinasen wurde hierbei das von Cisbio erhältliche universale TK-Substrat verwendet, während für die Testung von Ser/Thr-Kinasen drei verschiedene Substrate (Substrat-1, -2 und -3) zur Verfügung standen, die im Einzelfall für die zu studierende Transferase anzupassen waren (vgl. Tabelle 9.2.5). Die Kinasereaktion dauerte für die in der Enzymkinetik (siehe Kap. 9.2.2.3) als ideal bestimmte Zeitspanne an und wurde im Anschluss daran durch Zugabe von 10 µL der Stopplösung (Detektionspuffer, STK- oder TK-Antikörper, STV-XL665) gestoppt. Das molare Verhältnis von Fluorophor zu Substrat konnte dabei je nach untersuchter Kinase die Quotienten 1/8, 1/4, 1/2 oder 1/1 einnehmen. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte nach 1 h Inkubationszeit. Dazu wurden die Probe-enthaltenden Kavitäten zur Detektion des resultierenden FRET bei einer Wellenlänge von 317 nm angeregt und die resultierende Emission bei 665 nm sowie 620 nm determiniert. Durch Quotientenbildung $Em_{665\text{ nm}}/Em_{620\text{ nm}}$ der Emissionswerte und graphischer Auftragung gegen die verwendeten Inhibitor-konzentrationen in logarithmischem Maßstab lieferte das Fitting mit der „Dosis-Wirkungs-Formel Nr. 200“

$$f(c_{I,0}) = T + \frac{B}{1 + \left(\frac{c_{I,0}}{IC_{50}}\right)^H} \quad (1)$$

$c_{I,0}$ = Inhibitor-konzentration (total)

T = obere Asymptote

B = untere Asymptote

H = Hill-Koeffizient

IC_{50} = halbmaximale inhibitorische Konzentration

in „*Xlfit for Excel*“ (IDBS) die entsprechenden Aktivitäts-/Inhibitionskurven und zugehörigen IC_{50} -Werte (Abbildung 9.2).

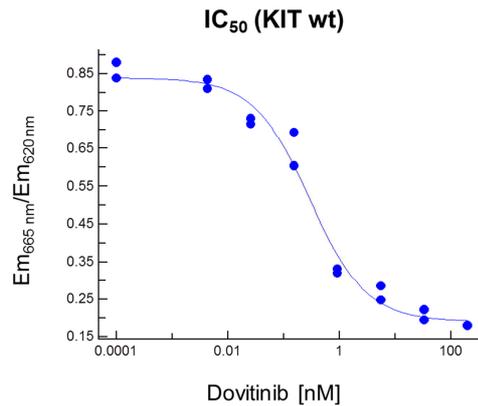


Abbildung 9.2: Dosis-Wirkungs-Kurve durch Auftragung der logarithmierten InhibitorKonzentration gegen die relative Aktivität ($Em_{665\text{ nm}}/Em_{620\text{ nm}}$) der untersuchten Kinase. Das Fitting erfolgte mit Hilfe von Xlfit (IDBS) und der Formel „Dosis-Wirkung Nr. 200“.

Pufferbestandteile:

5 x HTRF-Puffer: HEPES 250 mM (pH 7.0), NaN_3 0.1%, BSA 0.05%,
Orthovanadat 0.5 mM

Detektionspuffer: HEPES 50 mM (pH 7.0), BSA 0.1%, KF 0.8 M, EDTA 20 mM

Tabelle 9.2.3: Übersicht der Geräteeinstellungen TECAN Infinite M1000 – HTRF® KinEASE™.

Parameter	Wert
Messmethode	<i>Fluorescence Top Reading</i>
Exzitation/Bandweite	317 nm/20 nm
Emission1/Bandweite1	620 nm/10 nm
Emission2/Bandweite2	665 nm/10 nm
Flash Modus	100 Hz/50 Flashes
Gain	Optimal
Integrationszeit	500 μs
Verzögerung	60 μs
Settle time	10 ms
Z'-Position	25000 μm

9.2.2.3 Etablierung des HTRF-Systems – Enzymtitration & Enzymkinetik

Zur Etablierung des Assaysystems für eine spezifische Kinase wurde zunächst die Enzymaktivität bestimmt. Dazu wurden verschiedene Mengen des Proteins, in einer Konzentrationsreihe ausgehend von 100 ng/Kavität in 4-fachen Verdünnungsschritten, mit saturierenden Konzentrationen an ATP (100 μ M) und Substrat (1 μ M) für 30 min inkubiert. Die Kinasereaktion wurde dabei durch Vereinigung von 5 μ L Kinase und 5 μ L Substrat/ATP-Lösung gestartet und durch Zugabe von 10 μ L Stopplösung (Fluorophor/Substrat = 1/8) beendet. Eine graphische Auftragung der eruierten Daten gegen die logarithmierten Werte der verwendeten Proteinmengen, wie unter 9.2.2.2 beschrieben, resultierte im Idealfall in einer sigmoidalen Kurve mit zugehörigen Plateaus (Minimum, Maximum). Die optimale Proteinkonzentration ließ sich im linearen Teil des Steigungsbereichs bei einem Wert, welcher ca. 80% des Maximalquotienten betrug, manifestieren (vgl. Abbildung 9.3).

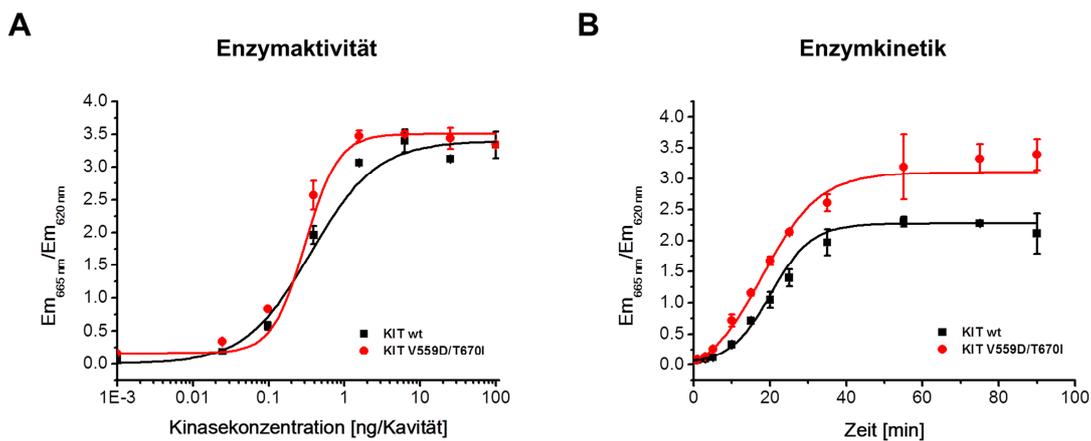


Abbildung 9.3: Bestimmung der optimalen A) Enzymmenge sowie B) Reaktionszeit.

Unter Verwendung der als ideal ermittelten Kinasemenge wurde im zweiten Etablierungsschritt die Kinetik der Substratphosphorylierung und somit die optimale Inkubationszeit von Kinase und Substrat/ATP bestimmt. Dazu wurde die Reaktion wie im ersten Schritt beschrieben unter Überschusskonzentrationen an ATP (100 μ M) und Substrat (1 μ M) durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Spanne von 0-120 min durch Zugabe der Stopplösung (Fluorophor/Substrat = 1/8) beendet. Die Auftragung der wie zuvor beschrieben ermittelten Quotienten (Em 665 nm/Em 620 nm) resultierte in einer ansteigenden Messkurve, welche die optimale Inkubationszeit im linearen Steilbereich bei einem Quotienten, der ca. 80% des Maximalwerts betrug, abbildete (vgl. Abbildung 9.3).

9.2.2.4 Etablierung des HTRF-Systems – ATP- & Substrat- K_M

Um das Verdrängungsgleichgewicht von ATP mit den zu untersuchenden, meist kompetitiven, Inhibitoren möglichst gering zu halten, wird im Assaysystem ein ATP-Gehalt verwendet, der im Bereich des K_M -Wertes liegt. Dadurch wird sichergestellt, dass der Assay stabile und solide Daten liefert, da der K_M die Konzentration des halbmaximalen katalytischen Umsatzes repräsentiert, sodass die zu untersuchende Transferase unter optimalen Umsatzbedingungen die Katalysereaktion vollzieht. Weiterhin wird die Konkurrenzreaktion zwischen Inhibitor und ATP minimiert, sodass die Effektivität des Inhibitors nicht artifiziell durch Competition herabgesetzt wird. Zur Bestimmung des ATP- K_M wurde eine Konzentrationsreihe ausgehend von 900 μM bzw. 300 μM ATP (Assaykonzentration) in Dreifachverdünungen erstellt, um zwölf verschiedene Datenpunkte zu erhalten, und eine finale Menge an entsprechendem Substrat von 1 μM eingestellt. Nach Zusammenfügen von 5 μL der so vorbereiteten Mischungen mit 5 μL Kinase (Konzentration wie zuvor bestimmt), Inkubation für die im Speziellen ermittelte Reaktionszeit und Beendigung der Reaktion mittels Stopplösung (10 μL , Fluorophor/Substrat = 1/8) erfolgte die Ermittlung und Auftragung der FRET-Daten gegen die eingesetzten Konzentrationen an ATP. Das Fitting der Datenpunkte erfolgte mit dem Programm Xlfit (IDBS) unter Verwendung der Formel „Michaelis-Menten Kinetik Nr. 250“

$$f(c) = \frac{V_{max} \cdot c^n}{c^n \cdot K_M^n} \quad (2)$$

c = Substrat-/ATP-Konzentration

V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

K_M = Michaelis-Konstante

n = Steigungsfaktor

und lieferte die entsprechenden K_M -Werte bei halbmaximaler Transferaseaktivität (vgl. Abbildung 9.4).

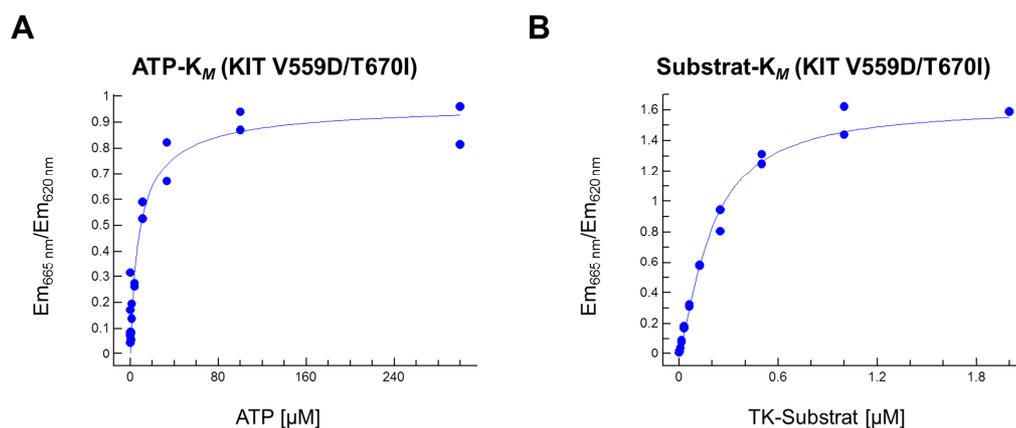


Abbildung 9.4: Beispielhafte Bestimmung des **A)** ATP- K_M und **B)** Substrat- K_M nach Michaelis-Menten für KIT V559D/T670I.

Analog zum ATP- wurde ebenfalls der Substrat- K_M (Abbildung 9.4) für jede getestete Kinase ermittelt. Die finalen Substratkonzentrationen wurden dabei ebenfalls in einer Verdünnungsreihe (12 Datenpunkte in Duplikaten) ausgehend von 4 μM bzw. 2 μM in Zweifachverdünnungen mit einem Gehalt von 100 μM ATP (final) erstellt. Darüber hinaus musste hierbei in der Stopplösung für jeden Messpunkt mit variiertem Substratkonzentration das molare Standardverhältnis von 1/8 zwischen STV-XL665 Fluorophor und eingesetztem Substrat eingestellt werden. Da die Menge des Fluorophors jedoch Einfluss auf die FRET-Messung nimmt, wurde für jede im Versuch verwendete Substratkonzentration eine Vergleichsmessung ohne Kinase durchgeführt und die ermittelten Hintergrundwerte von jeder Messung subtrahiert, um eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Fluorophorkonzentrationen zu vermeiden. Die zu vereinigenden Volumina (Kinase, Substrat/ATP, Stopplösung) sowie die Methode zur Auswertung der Datenpunkte entsprachen hierbei denen, welche auch bei der Bestimmung des ATP- K_M verwendet wurden.

Im Assaysystem selbst variierten die verwendeten Konzentrationen an ATP und Substrat im Bereich vom Ein- bis Zweifachen des validierten K_M , da in einigen Fällen stabile und reproduzierbare Primärdaten mit Referenzinhibitoren lediglich bei erhöhtem ATP-/Substrat- K_M ermittelt werden konnten.

9.2.2.5 Etablierung des HTRF-Systems – Gehalt an Fluorophor XL665

Abschließend wurde die Menge an Fluorophor im verwendeten System angepasst, sodass das resultierende Assayfenster, d.h. der Faktor zwischen minimaler und maximaler Aktivität bzw. der S/N-Nexus, bei der Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve möglichst maximal waren. Dazu wurden je vier Datenpunkte, davon zwei mit zugefügter Kinase für 100% Aktivität und zwei exklusive Kinase für 0% Aktivität (Hintergrund), für das Fluorophor/Substrat-Verhältnis (1/8, 1/4, 1/2, und 1/1) generiert. Die Konzentrationen an ATP und Substrat waren hierbei analog den zuvor ermittelten optimalen Mengen (Kapitel 9.2.2.4) zu verwenden.

Zum Start der Reaktion wurden 5 μL Kinase respektive Assaypuffer vorgelegt, mit je 5 μL Substrat/ATP-Mix versetzt, diese nach der optimalen Inkubationszeit durch Zugabe von 10 μL Stopplösung beendet und die Datenpunkte nach weiterer Inkubation für 1 h wie oben beschrieben (Kapitel 9.2.2.2) determiniert. Zur Bestimmung eines IC_{50} -Wertes wurde jenes Fluorophor/Substrat-Verhältnis verwendet, welches ein maximales S/N-Verhältnis aufwies.

Tabelle 9.2.4: Pipettierschema zur Durchführung der Etablierungsschritte.

Stufe	V_{Protein}	V_{Substrat}	V_{ATP}	V_{gesamt}	c_{Substrat}	c_{ATP}	V_{Stopp}	XL665/Subst.
Enzymtitration	5 μL	5 μL		10 μL	1 μM	100 μM	10 μL	1/8
Enzymkinetik	5 μL	5 μL		10 μL	1 μM	100 μM	10 μL	1/8
ATP-K_M	5 μL	2.5 μL	2.5 μL	10 μL	1 μM	<i>variabel</i>	10 μL	1/8
Substrat-K_M	5 μL	2.5 μL	2.5 μL	10 μL	<i>variabel</i>	100 μM	10 μL	1/8
Fluorophor	5 μL	5 μL		10 μL	<i>optimal</i>	<i>optimal</i>	10 μL	<i>variabel</i>

Die Durchführung aller Etablierungsschritte (Kapitel 9.2.2.3 - 9.2.2.5 und Tabelle 9.2.4) ist essentiell, um zu garantieren, dass die mit diesem System erzielten Resultate aufgrund robuster und reproduzierbarer Primärdaten erzeugt wurden.

9.2.2.6 Übersicht - Generierung von IC_{50} -Werten

Grundlage für die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven war die Verwendung aller zuvor als optimal bestimmten Assayparameter (vgl. Tabelle 9.2.5).

Tabelle 9.2.5: Verwendete Parameter zur Durchführung des KinEASE™ Assays (Cisbio Bioassays) für diverse Kinasen.

Protein	Fluorophor/ Substrat	Substrat	Kinase pro Kavität (ng)	ATP (μM)	Substrat (μM)	Rk-Zeit (min)
Abl, T315I	1/2	TK	0.33	6	0.3	120
Abl, wt	1/1	TK	7.5	30	0.1	60
Ark1 as3cys	1/4	STK2	20	20	0.3	16
Ark1 as3cys + Pic1	1/4	STK2	4	20	0.25	16
Ark1, wt	1/4	STK2	6	15	0.2	15
Ark1, wt + Pic1	1/4	STK2	2	40	0.1	15
Aurora A, mut	1/8	STK2	30	16	0.57	30
Aurora A, wt	1/2	STK2	3	25	0.45	18
Aurora A, mut + Acrylodan	1/4	STK2	100	12	0.65	25
KIT, V559D/T670I	1/4	TK	0.9	20	0.3	30
KIT, wt	1/4	TK	0.6	90	0.35	30
cSrc, DM	1/2	TK	0.7	1	0.25	20
cSrc, SM	1/1	TK	1.2	15	0.1	45
TBK1	1/4	STK3	10	30	1	110

Zur Determination von IC_{50} -Werten wurden zunächst Verdünnungsreihen (6- bzw. 8-fach Verdünnungen) der zu untersuchenden Inhibitoren in DMSO hergestellt. Diese wurden in Assaypuffer überführt und anschließend 2.5 μL der so vorbereiteten Lösungen unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen mit 5 μL an zu evaluierender Kinase vereinigt (finale DMSO-Konzentration: 2%). Nach einer Präinkubation von 30-240 min (je nach Stabilität der Kinase bei RT und gewünschter Untersuchungsmethode) erfolgte die Zugabe von 2.5 μL Substrat/ATP-Mix und Inkubation für die als optimal bestimmte Zeitspanne für die jeweilige Kinase. Abschließende Zugabe von 10 μL Stopplösung und Inkubation für 1 h sowie Auslesen der Datenpunkte mittels TECAN Infinite M1000 Mikrotiterplatten-Lesegerät lieferte die Primärdaten zur Generierung von Dosis-Wirkungs-Kurven.

Zur Ermittlung eines IC_{50} -wertes wurden mindestens drei voneinander unabhängige Messungen in Duplikaten durchgeführt.

9.2.3 Assaysysteme zur direkten Bindungsdetektion in Ark1

9.2.3.1 Grundlagen

Chinazolin- und Chinolingrundgerüste, welche mit elektronenarmen Gruppen wie Michael-Akzeptor-Systemen dekoriert sind, besitzen bei einer Anregungswellenlänge von ~ 390 nm eine schwache Fluoreszenzemission im Bereich von ~ 420 nm. Der Grund hierfür liegt im intrinsischen, photo-induzierten Elektronentransfer (PET) vom Fluorophor auf den elektronenarmen Rest.²¹⁸ Die Bindung eines mit diesen Eigenschaften ausgestatteten, kovalent modulierenden Inhibitors zu Zielproteinen durch Additionsreaktionen von spezifisch adressierten Cysteinen führt zu einem signifikanten Anstieg der Quantenausbeute der intrinsischen Fluoreszenz der Chinazolin- und Chinolinsysteme.^{28, 219} Der nukleophile Angriff der Thiol-Funktionalität eines Cysteins an den terminalen Michael-Akzeptor (hier: in 6-Position) führt zur Auflösung der Doppelbindung und damit einhergehender Aufhebung der Konjugation zum amidischen Carbonyl, wodurch ein Übergang der terminalen Kohlenstoffatome von sp^2 - zu sp^3 -hybridisierten Spezies erfolgt. Dieses Bindungsereignis sorgt dafür, dass kein intrinsischer PET mehr stattfindet, was durch Messung einer steigenden Fluoreszenzemission verfolgt werden kann (vgl. Abbildung 9.5).

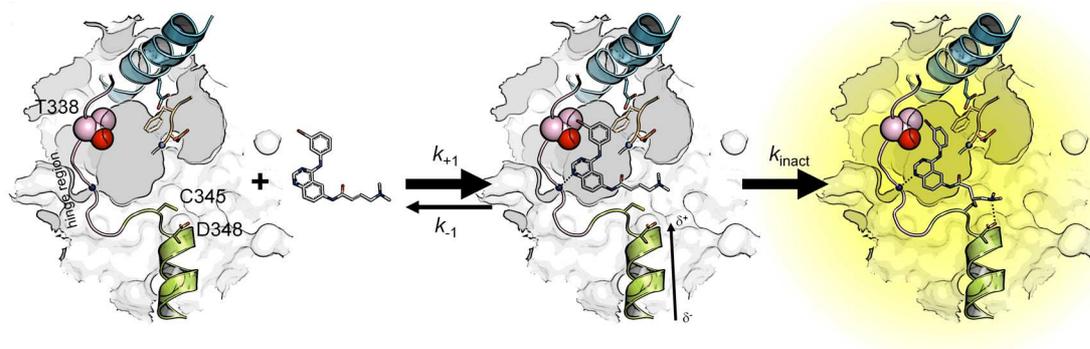


Abbildung 9.5: Prinzip der Detektion direkter kovalenter Bindungen von Inhibitoren zu deren Zielproteinen.²⁹ Freie Kinase und freier Inhibitor stehen zunächst im Gleichgewicht zur reversiblen Form des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Nach initialer, reversibler Interaktion zwischen Protein und Inhibitor erfolgt die Ausbildung einer kovalenten Bindung unter Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Inhibitors.

9.2.3.2 Direkter Bindungsassay in Küvetten

Emissionsspektren (380-580 nm), bei einer Exzitationswellenlänge von 368 nm, zur Detektion der Ausbildung einer direkten kovalenten Bindung diverser 4-substituierter 6-Amino-chinazoline (**24-27**) zu Ark1 wt und einer Mutationsvariante (L166A/E173C) wurden mit Hilfe eines JASCO FP-6500 Fluoreszenzspektrometers in 4.5 mL Quarzküvetten (vier klare Seiten, Carl Roth GmbH) gemessen. Dazu wurden zunächst 3 mL des Assaypuffers (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.005% Triton X-100) vorgelegt und 4.5 μ L einer 0.1 mM Inhibitorlösung in DMSO des zu untersuchenden Binders zugegeben, um eine finale Konzentration von 0.15 μ M zu erhalten. Eine Endkonzentration des zu evaluierenden Proteins von 0.1 μ M wurde durch die Zugabe des entsprechenden Volumens der vorliegenden Stammlösungen erreicht (vgl. Tabelle 9.2.6).^{xiii}

Tabelle 9.2.6: Ark1-Stammlösungen, -Verdünnungen und -Konzentrationen zur Ermittlung von Emissionsspektren in Quarzküvetten.

Protein	MW (kDa)	Stammlsg.	V (Protein)	V (Puffer)	c (final)
Ark1	42.41	1.43 mg/mL 33.7 μ M	8.9 μ L	3 mL	0.1 μ M
Ark1-as3-cys	42.30	1.51 mg/mL 35.7 μ M	8.4 μ L	3 mL	0.1 μ M

Zur Gewährleistung einer homogenen Messlösung wurde diese vor der Aufnahme jedes Emissionsspektrums für 30 sec gerührt (Magnetrührer, implementiert im Messgerät). Ein Referenzspektrum jeder Inhibitorzubereitung in Assaypuffer zum Zeitpunkt 0 min wurde vor der Zugabe des jeweiligen Proteins aufgenommen, die Endpunktbestimmung erfolgte nach Zugabe und Inkubation für 60 min, um die vollständige Äquilibration der Komponenten der vereinigten Lösungen zu gewährleisten. Die finale Konzentration an DMSO im Assaysystem betrug 0.15%. Weitere Messparameter wurden wie in der Literatur beschrieben verwendet (vgl. Tabelle 9.2.7).²⁹ Konkurrenzexperimente von **25** und **27** mit **24** erfolgten unter Anwendung der gleichen Parameter und zusätzlicher Präinkubation der zu untersuchenden Testsubstanz für 30 min. Die verlängerte Inkubationszeit führte zu einer allgemeinen Herabsetzung der detektierten RFUs im Assaysystem.

^{xiii} Die zu untersuchenden Ark1-Proteinstammlösungen stammen aus der kooperierenden Arbeitsgruppe um Dr. Silke Hauf aus dem Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen.

Tabelle 9.2.7: Übersicht der Geräteeinstellungen des JASCO FP-6500 Fluoreszenzspektrometers.

Parameter	Wert
Emission	380-580 nm
Exzitation	368 nm
Bandweite	3 nm
Resonanz	10 nm

9.2.3.3 Echtzeit-Detektion kovalenter Bindungsbildung in Mikrotiterplatten

Der Assay wurde in schwarzen Mikrotiterplatten (384-Kavitäten) mit einem Kavitätswolumen von 25 μL der Firma Greiner Bio-One GmbH (Art.-Nr. #784076) durchgeführt, wobei die zeitabhängige Fluoreszenzemission unter Verwendung eines TECAN Infinite® M1000 Mikrotiterplatten-Lesegeräts gemessen wurde. Die Exzitation der Probe enthaltenden Kavitäten erfolgte bei einer Wellenlänge von 368 nm (Blende = 5 nm), während die Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 420 nm (Blende = 20 nm) beobachtet wurde. Die Reaktion wurde durch Vereinigung gleicher Volumina (7 μL) der zu untersuchenden Proteinlösung und des Inhibitors (je 1 μM) gestartet und die Fluoreszenzintensität direkt im Anschluss in Zeitintervallen von 30 sec über einen Zeitraum von 1 h gemessen. Es erfolgte eine Vorverdünnung der Proteinstammlösungen, sowie der 0.1 mM DMSO-Inhibitorlösungen in Assaypuffer, zur Einstellung der gewünschten Konzentration von jeweils 1 μM (vgl. Tabelle 9.2.8).

Tabelle 9.2.8: Ark1-Stammlösungen, -Verdünnungen und -Konzentrationen zur Ermittlung zeitabhängiger Fluoreszenzemission in Mikrotiterplatten.

Protein	MW (kDa)	Stammlsg.	V (Protein)	V (Inhibitor)	c (final)
Ark1	42.41	42.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1 μM	7 μL	7 μL	0.5 μM
Ark1-as3-cys	42.30	42.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1 μM	7 μL	7 μL	0.5 μM

Kompetitionsexperimente mit ATP bzw. 1NM-PP1 als Kompetitoren der 4-substituierten 6-Aminochinazoline erfolgten durch Inkubation des Proteins (3.5 μL , 2 μM) mit 3.5 μL des entsprechenden, konkurrierenden Moleküls in unterschiedlichen Konzentrationen (ATP: 1 mM, 0.1 mM, 1NM-PP1: 1 μM , 2 μM) für 15 min vor Zugabe des zu untersuchenden Inhibitors (7 μL). In allen Fällen wurden Kinase- und Inhibitorlösungen im gleichen Assaypuffer,

wie unter Kapitel 9.2.3.2 für die Messung von Emissionsspektren in Quarzküvetten beschrieben, vorbereitet. Die Konzentration an DMSO im Assay variierte im Bereich von 0.5-1.5% für Konkurrenzexperimente, in sämtlichen übrigen Fällen betrug diese 0.5%. Die Geräteeinstellungen des Mikrotiterplatten-Lesegeräts wurden in Anlehnung an die verwendete Literatur²⁹ übernommen und gegebenenfalls angepasst (Tabelle 9.2.9).

Tabelle 9.2.9: Übersicht der Geräteeinstellungen am TECAN Infinite M1000 - Direkter Bindungsassay.

Parameter	Wert
Messmethode	<i>Fluorescence Top Reading</i>
Exzitation/Bandweite	368 nm/5 nm
Emission/Bandweite	420 nm/15 nm
Flash Modus	100 Hz/10 Flashes
Gain	110
Anzahl der Leseprozesse	5
Integrationszeit	2000 μ s
Verzögerung	0 μ s
Z'-Position	24470 μ M
Kinetik-Intervall	30 sec

9.2.4 Hochdurchsatzdurchmusterung fokussierter Substanzbibliotheken

Die Durchmusterung von Substanzbibliotheken mit einer Größe von \sim 1000 niedermolekularer organischer Verbindungen erfolgte sowohl in weißen Mikrotiterplatten (384 Kavitäten) der Firma Corning (#3673) als auch der Firma Greiner (#784075) mit einem Arbeitsvolumen von jeweils 20 μ L (Kavitätsvolumen: 25 μ L).

Die Untersuchung von Substanzbibliotheken auf neuartige Binder wurde für die Zielproteine Abl (wt und T315I), Aurora A (wt) und TBK1 (wt) durchgeführt, wobei die verwendeten Assayparameter den zuvor in der Etablierung des KinEASE™-Systems ermittelten Werten für die jeweilige Kinase (vgl. Tabelle 9.2.5) entsprachen. Da die transferierten Volumina der DMSO-Inhibitorlösungen bei den durchgeführten Hochdurchsatzdurchmusterungen im nL-Bereich lagen, wurden dem Kinasepuffer 2% DMSO zugefügt, um eine Vergleichbarkeit der Daten mit den abschließenden Validierungen per IC₅₀-Bestimmungen (s.u.) zu gewährleisten.

Für die Präinkubation der zu untersuchenden Transferase mit potentiellen Bindern wurden 8 μL der entsprechenden Proteinpräparation vorgelegt, mit $2 \times 6.6 \text{ nL}$ der 10 mM DMSO-Inhibitorstammlösungen versetzt, die verwendete Mikrotiterplatte für 30 sec bei 2000 rpm geschüttelt (Orbitalschüttler MixMate, eppendorf) und für 30 min bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Der Transfer der Stammlösungen in die Reaktionskavitäten erfolgte dabei mit einem 384er *Pin-Tool* Transfersystem.^{xiv} Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 2 μL des jeweils entsprechenden Substrat/ATP-Mix mit Hilfe eines automatischen Dispensiersystems (Multidrop Combi, Thermo Scientific). Nach erneuten 30 sec bei 2000 rpm und anschließender Inkubation für die optimale Reaktionszeit, erfolgte die Beendigung der Reaktion durch manuelle Zugabe von 10 μL Stopplösung. Die Eruiierung der Daten erfolgte analog zu Kapitel 9.2.2.2 durch Quotientenbildung $\text{Em } 665 \text{ nm} / \text{Em } 620 \text{ nm}$. Als Kontrollen für die Zuverlässigkeit des im Einzelfall durchgeführten Assays wurden der Referenzinhibitor Stauroporin als Positivkontrolle (0% Kinaseaktivität) sowie DMSO als Negativkontrolle (100% Aktivität) verwendet.

Für den mathematischen Ausdruck, um die Reliabilität als Zahlenwert darzustellen wurde die Formel

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (3)$$

σ_p = Standardabweichung (Positivkontrollen)

σ_n = Standardabweichung (Negativkontrollen)

μ_p = Mittelwert (Positivkontrollen)

μ_n = Mittelwert (Negativkontrollen)

herangezogen, wobei gilt: wenn $0.5 \leq Z' \leq 1.0$, so ist davon auszugehen, dass die ermittelten Werte solide und wenig fehlerbehaftet sind.²²⁰ Je größer dabei der Wert für Z' , desto robuster die Daten, die generiert wurden. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse weiter zu erhöhen, wurden aus Primärdurchmusterungen ausschließlich Daten mit $Z' \geq 0.6$ verwendet. Die Hochdurchsatzdurchmusterungen wurden in Einfachbestimmungen durchgeführt. Sämtliche Verbindungen, welche die Kinaseaktivität auf einen Wert von <20-40% (je nach Zielprotein und Anzahl an potenten Verbindungen) herabsetzten wurden als Trefferverbindungen definiert und durch einen Validierungsschritt (IC_{50} -Bestimmung, vgl. Kapitel 9.2.2.2) bestätigt oder verworfen.

^{xiv} Durchmusterungen mit Hilfe eines voll-automatisierten *Pin-Tool*-Pipettierroboters wurden in Kooperation mit der Lead Discovery Center GmbH, Dortmund durchgeführt.

9.2.5 Charakterisierung in Krebszelllinien

9.2.5.1 K562 Zelllinie^{xv}

Bcr-Abl exprimierende CML Zellen (K562) wurden wie von Sos *et al.* beschrieben in Duplikaten auf Zellkulturplatten (6-Kavitäten) kultiviert.²²¹ Nach Zellaufzucht für 24 h folgte die Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor der Wahl für 96 h. Repräsentative Bilder wurden durch Transmissions-Lichtmikroskopie angefertigt und die Zellen anschließend mit Trypanblau eingefärbt, um die Lebendzellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer zu ermitteln. Die determinierte Anzahl an Zellen setzt sich aus vier unabhängigen Auszählungen zusammen, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung des Mittelwerts für jede Behandlung illustrieren.

9.2.5.2 GIST Zelllinien^{xvi}

Die für die Untersuchungen erforderlichen Zelllinien GIST-T1 und GIST-48B wurden gemäß Henze *et al.*²²² charakterisiert, etabliert und für alle weiteren Experimente eingesetzt.

GIST-T1

Zelllinie abstammend von humanem, unbehandeltem, metastasierenden GIST, welche eine 57 bp Deletion im *KIT* Exon 11 trägt und somit eine Empfindlichkeit gegenüber dem kommerziellen Kinaseinhibitor Imatinib aufweist.²²³

GIST-T1 T670I

Auf Basis der GIST-T1-Linie generierte Zelllinie mit zusätzlicher Türstehermutation T670I und damit einhergehender Resistenz zu Imatinib. Die Zellen wurden von Prof. Dr. Brian Rubin (*Department of Molecular Genetics, Lerner Research Institute* sowie *Department of Anatomic Pathology* und *Taussing Cancer Center, Cleveland Clinic*; Cleveland, OH 44195) zur Verfügung gestellt.

^{xv} Experimente in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Funktionelle Krebsgenomik“ um Prof. Dr. Roman Thomas am MPI für neurologische Forschung in Köln

^{xvi} Durchgeführt in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. med. Sebastian Bauer am Westdeutschen Tumorzentrum des Universitätsklinikums in Essen

GIST-48B

KIT-negative Zelllinie, die trotz der Präsenz einer aktivierenden *KIT* Mutante auf genetischer Ebene (primäre, homozygote *KIT* Exon 11 *Missense*-Mutation (V560D) sowie sekundäre, heterozygote *KIT* Exon 17 Mutation (D820A)) das zugehörige KIT-Transkript sowie Protein in nicht feststellbaren Mengen exprimiert.²²⁴

Viabilitätsexperimente wurden mit Hilfe des colorimetrischen Sulforhodamin B Assays durchgeführt.²²⁵ Dazu wurden 15,000 bis 30,000 Zellen der zu untersuchenden Zelllinien pro Kavität in einer 96er Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Falcon, Lincoln, NJ) ausplattiert und für einen Tag in Serum-enthaltendem Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung (72 h) mit potentiellen KIT-Inhibitoren sowie Imatinib bzw. Ponatinib als Referenzinhibitoren und DMSO als Kontrolle. Die Sulforhodamin B Absorption wurde an einem Genion Luminometer (Tecan) ermittelt und die Daten mit Bezug auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. Alle Datenpunkte wurden in Triplikaten oder Quadruplikaten für jede Platte bestimmt und mindestens einmal repliziert.

Für die Western Blot Analyse wurden Proteinlysate aus Zelllinien-Monoschichten nach Standardprotokoll hergestellt.²²⁶ Elektrophorese und Immunoblotting wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.²²⁷ Veränderungen in Proteinexpressions- und Phosphorylierungsleveln wurden durch Chemolumineszenz mit Hilfe eines FIJI LAS3000 Systems und der Science Lab 2001 ImageGauge 4.0 Software visualisiert und quantifiziert. Die verwendeten Antikörper gegen pKIT Y703, pAkt S473 und p44/42 MAPK T202/Y204 stammten von der Firma Cell Signaling.

9.3 Strukturbiologische Untersuchungen

9.3.1 Vorbemerkungen

Die zur Züchtung von Proteinkomplekxkristallen verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit Reagenzien hergestellt, die über die Firmen AppliChem, Fluka, Sigma-Aldrich und Carl Roth GmbH bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet wurden. Die Kristalle wurden in Kristallisationsplatten (EasyXtal, 24 Kavitäten) der Firma QIAGEN im hängenden Tropfen gezüchtet.

9.3.2 Strukturauflösung und Strukturbestimmung

Diffractionsdaten wurden am Synchrotron des Paul Scherrer Instituts in Villingen (SLS, Schweiz) mit der Röntgenquelle PX10SA bis zu einer Auflösung von 2.1 Å unter Verwendung von Röntgenstrahlen einer Wellenlänge von ~ 1 Å aufgenommen. Alternativ wurde der Röntgengenerator Bruker AXS Microstar des Max-Planck Instituts in Dortmund zur Aufnahme von Diffractionsdaten bis zu einer Auflösung von 3.1 Å (Wellenlänge ~ 1.54 Å) genutzt. Die Prozessierung und Skalierung der Datensätze erfolgte mit XDS²²⁸ bzw. XSCALE.²²⁸

Die Strukturauflösung der cSrc- bzw. p38 α -Komplexstrukturen wurde durch molekularen Ersatz mit Hilfe des Programms PHASER und unter Verwendung der bereits publizierten Templatstrukturen 2OIQ²²⁹ sowie 3QUD²¹⁵ durchgeführt. Im Falle von cSrc waren zwei, bei p38 α ein Molekül in der asymmetrischen Einheit vorzufinden. Das Modell wurde zunächst durch simuliertes Tempnern mit CNS²³⁰ verfeinert, um systematische Fehler durch molekularen Ersatz zu minimieren. Manuelle Modifizierung der Moleküle innerhalb der asymmetrischen Einheit erfolgte mit COOT,²³¹ die finale Verfeinerung mit REFMAC5.²³² Inhibitor-Topologiedateien wurden auf dem Dundee PRODRG2 Server²³³ generiert. Die Validierung der verfeinerten Strukturen erfolgte mit PROCHECK.²³⁴ Detaillierte Daten für Verfeinerung und Ramachandran-Statistiken sind unter Kapitel 9.3.4 zu finden.

9.3.3 Kristallisation

9.3.3.1 cSrc wt

Fragmente und Inhibitoren wurden mit cSrc wt kokristallisiert, indem zunächst 1000 μM DMSO-Inhibitorlösung mit 200 μM cSrc wt (6.1 mg/mL in 50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% Glycerol (v/v)) auf Eis für 1 h präinkubiert wurden. Anschließend wurden Kristalle unter Verwendung der Dampfdiffusionsmethode im hängenden tropfen gezüchtet. Dazu wurde die Protein-Inhibitor-Lösung zunächst für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und je 1 μL des Überstands mit 1 μL der entsprechenden Reservoirlösung (0-30 mM NaCl, pH 7.0, 9-20% Ethylenglycol) vereinigt. Die innerhalb von ca. 3 Tagen gewachsenen Kristalle (flache Plättchen) wurden nach Überführung in eine cryogene Lösung, bestehend aus 30% (v/v) Glycerol in Reservoir, für 2-3 sec in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für Diffraktionsexperimente verwendet.

9.3.3.2 p38 α

Protein-Inhibitor-Komplexe wurden durch Vereinigung von 30 μL p38 α (10 mg/mL in 20 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerol) mit 0.3 μL (100 mM in DMSO) und anschließender Inkubation für 1-2 h auf Eis erzeugt. Die Proben wurden für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um präzipitierten Überschuss des Inhibitors sowie Proteins zu entfernen. Zur Generierung von Proteinkristallen wurden 1.5 μL Protein-Inhibitorlösung mit je 0.5 μL Reservoirlösung (100 mM MES, pH 5.6-6.2, 20-30% PEG4000, 50 mM *n*-Octyl- β -Glucopyranosid) vereinigt und im hängenden Tropfen bei 20 °C inkubiert (Dampfdiffusionsmethode). Die Kristalle wurden mit einem cryogenen Schutz bestehend aus 20% PEG400 in Reservoir ausgestattet, bevor diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für Beugungsexperimente im Röntgenstrahl verwendet wurden.

9.3.4 Übersicht - Kristallstrukturen und Verfeinerungsparameter

Tabelle 9.3.1: Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken für die Komplexstrukturen cSrc_2d, 2g und 2h.^{a, xvii}

	cSrc_2d (3TZ9)	cSrc_2g (3TZ7)	cSrc_2h (3TZ8)
Datensammlung			
Raumgruppe	P1	P1	P1
Einheitszelle			
<i>a, b, c</i> (Å)	42.02, 63.42, 74.20	42.55, 64.28, 75.40	42.00, 63.58, 74.51
α, β, γ (°)	79.60, 87.89, 89.98	79.28, 87.38, 90.20	79.08, 87.69, 89.88
Auflösung (Å)	45.0-3.10 (3.20-3.10) ^a	40.0-3.30 (3.40-3.30) ^a	50.0-2.70 (2.80-2.70) ^a
<i>R</i> _{sym} bzw. <i>R</i> _{merge} (%)	8.2 (49.6)	6.3 (17.1)	4.8 (16.8)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	9.6 (4.0)	15.2 (5.6)	14.9 (5.1)
Vollständigkeit (%)	91.8 (93.7)	95.8 (95.6)	96.2 (90.3)
Redundanz	1.8 (1.8)	2.2 (2.2)	2.3 (2.2)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	42.0-3.10	28.6-3.30	42.0-2.70
Anzahl an Reflexen	12538	11296	20008
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	21.1/28.3	18.3/24.3	19.8/25.8
Anzahl an Atomen			
Protein	4194	4190	4195
Ligand/Ion	74	92	98
Wasser	---	---	80
<i>B</i> -Faktoren			
Protein	54.5	21.0	28.0
Ligand/Ion	54.4	20.9	28.0
Wasser	59.9	26.4	30.9
Wasser	---	---	22.9
RMS Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.012	0.009	0.008
Bindungswinkel (°)	1.363	1.190	1.136
Struktur (PDB-Eintrag)			
Wellenlänge (Å)	cSrc_2d (3TZ9) 1.003900	cSrc_2g (3TZ7) 1.54170	cSrc_2h (3TZ8) 0.977032
Temperatur	90K	100K	90K
Röntgenquelle	SLS X10SA	Bruker AXS Microstar	SLS X10SA
Ramachandran-Auftragung:			
Seitenketten in			
bevorzugten Regionen	86.9%	88.1%	90.6%
zusätzlich erlaubten Regionen	12.2%	11.5%	9.0%
generell erlaubten Regionen	0.7%	0.5%	0.4%
unerlaubten Regionen	0.2%	0.0%	0.0%

^a Für alle cSrc-Komplexstrukturen wurden Diffraktionsdaten eines Einzelkristalls genutzt, um die Struktur zu lösen. Werte in Klammern repräsentieren die Auflösung für die höchste Schale.

^{xvii} Die Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung zur Anfertigung der Komplexkristallstrukturen cSrc_2d, 2g und 2h wurde von Dr. Christian Grütter durchgeführt.

Tabelle 9.3.2: Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken für die Komplexstrukturen cSrc_76 und _77.^a

	cSrc_76 (4FIC)	cSrc_77
Datensammlung		
Raumgruppe	P1	P1
Einheitszelle		
<i>a, b, c</i> (Å)	42.03, 63.01, 73.56	42.21, 63.24, 74.76
α, β, γ (°)	79.63, 88.12, 90.17	101.35, 90.44, 90.09
Auflösung (Å)	50.0-2.5 (2.60-2.50) ^a	50.0-2.1 (2.20-2.10) ^a
<i>R</i> _{sym} bzw. <i>R</i> _{merge} (%)	6.1 (34.7)	9.1 (36.6)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	14.2 (4.1)	11.9 (4.0)
Vollständigkeit (%)	97.8 (97.1)	96.1 (95.4)
Redundanz	3.5 (3.6)	1.9 (1.9)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	43.4-2.50	43.3
Anzahl an Reflexen	25142	42544
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	19.8/24.4	19.7/23.9
Anzahl an Atomen		
Protein	3913	4257
Ligand/Ion	32	68
Wasser	97	236
<i>B</i> -Faktoren		
Protein	41.9	37.4
Ligand/Ion	42.0	37.5
Wasser	45.1	41.3
Wasser	37.3	34.6
RMS Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.013	0.010
Bindungswinkel (°)	1.473	1.142
Struktur (PDB-Eintrag)		
Wellenlänge (Å)	cSrc_76 (4FIC) 0.979400	cSrc_77 0.978600
Temperatur	90K	90K
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA
Ramachandran-Auftragung:		
Seitenketten in		
bevorzugten Regionen	87.9%	90.2%
zusätzlich erlaubten Regionen	11.4%	9.3%
generell erlaubten Regionen	0.7%	0.4%
unerlaubten Regionen	0.0%	0.0%

^a Für alle cSrc-Komplexstrukturen wurden Diffraktionsdaten eines Einzelkristalls genutzt, um die Struktur zu lösen. Werte in Klammern repräsentieren die Auflösung für die höchste Schale.

Tabelle 9.3.3: Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken für die Komplexstrukturen p38 α _80 und _81.^a

	p38 α _81 (3UVR)	p38 α _80
Datensammlung		
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle		
<i>a, b, c</i> (Å)	62.86, 68.25, 73.70	64.62, 72.95, 76.92
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Auflösung (Å)	50.0-2.10 (2.20-2.10) ^a	50.0-2.10 (2.20-2.10) ^a
<i>R</i> _{sym} bzw. <i>R</i> _{merge} (%)	9.1 (38.6)	2.9 (30.6)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	17.7 (5.2)	25.8 (5.2)
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.8)	98.4 (97.7)
Redundanz	5.3 (5.1)	4.2 (4.3)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	47.8-2.10	48.4-2.10
Anzahl an Reflexen	19044	21490
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	20.4 / 24.5	22.1 / 27.9
Anzahl an Atomen		
Protein	2662	2744
Ligand/Ion	79	82
Wasser	118	43
<i>B</i> -Faktoren		
Protein	21.8	49.0
Ligand/Ion	19.4	52.7
Wasser	21.3	41.4
RMS Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.011	0.012
Bindungswinkel (°)	1.452	1.488
Struktur (PDB-Eintrag)		
Wellenlänge (Å)	p38 α _81 (3UVR) 0.978600	p38 α _80 0.978600
Temperatur	90K	90K
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA
Ramachandran-Auftragung:		
Seitenketten in		
bevorzugten Regionen	88.2%	86.5%
zusätzlich erlaubten Regionen	10.8%	12.5%
generell erlaubten Regionen	1.0%	1.0%
unerlaubten Regionen	0.0%	0.0%

^a Für alle p38 α -Komplexstrukturen wurden Diffraktionsdaten eines Einzelkristalls genutzt, um die Struktur zu lösen. Werte in Klammern repräsentieren die Auflösung für die höchste Schale.

10 Literaturverzeichnis

1. Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; Richters, A.; Tückmantel, S.; Simard, J. R.; Rauh, D. Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Archiv der Pharmazie* **2010**, 343, 193-206.
2. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-34.
3. Burnett, G.; Kennedy, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *The Journal of biological chemistry* **1954**, 211, 969-80.
4. Mulder, G. J. Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen. *Journal für Praktische Chemie* **1839**, 16, 129-152.
5. Stehelin, D.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M.; Vogt, P. K. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **1976**, 260, 170-3.
6. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/>
7. Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Mett, H.; Meyer, T.; Müller, M.; Druker, B. J.; Lydon, N. B. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* **1996**, 56, 100-4.
8. Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **1969**, 222, 385-6.
9. Gilman, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *American journal of surgery* **1963**, 105, 574-8.
10. Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **1991**, 253, 414-20.
11. Michalczyk, A.; Klüter, S.; Rode, H. B.; Simard, J. R.; Grütter, C.; Rabiller, M.; Rauh, D. Structural insights into how irreversible inhibitors can overcome drug resistance in EGFR. *Bioorg Med Chem* **2008**, 16, 3482-8.
12. Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Jänne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **2005**, 352, 786-92.
13. Huse, M.; Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **2002**, 109, 275-82.
14. Backes, A. C.; Zech, B.; Felber, B.; Klebl, B.; Müller, G. Small-molecule inhibitors binding to protein kinase. Part II: the novel pharmacophore approach of type II and type III inhibition. *Expert opinion on drug discovery* **2008**, 3, 1427-1449.

15. Backes, A. C.; Zech, B.; Felber, B.; Klebl, B.; Müller, G. Small-molecule inhibitors binding to protein kinases. Part I: exceptions from the traditional pharmacophore approach of type I inhibition. *Expert Opin. Drug Discovery* **2008**, *3*, 1409-1425.
16. Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D. R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F.; Sowadski, J. M. 2.2 A refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1993**, *49*, 362-5.
17. Gschwind, A.; Fischer, O. M.; Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 361-70.
18. Steinberg, M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Ther* **2007**, *29*, 2289-308.
19. Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 730-9.
20. Getlik, M.; Grütter, C.; Simard, J. R.; Klüter, S.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Robubi, A.; Rauh, D. Hybrid compound design to overcome the gatekeeper T338M mutation in cSrc. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, 3915-26.
21. Liu, Y.; Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 358-64.
22. Schneider, R.; Becker, C.; Simard, J. R.; Getlik, M.; Bohlke, N.; Janning, P.; Rauh, D. Direct binding assay for the detection of type IV allosteric inhibitors of Abl. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 9138-41.
23. Deng, X.; Okram, B.; Ding, Q.; Zhang, J.; Choi, Y.; Adrián, F. J.; Wojciechowski, A.; Zhang, G.; Che, J.; Bursulaya, B.; Cowan-Jacob, S. W.; Rummel, G.; Sim, T.; Gray, N. S. Expanding the diversity of allosteric bcr-abl inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 6934-46.
24. Yang, J.; Campobasso, N.; Biju, M. P.; Fisher, K.; Pan, X. Q.; Cottom, J.; Galbraith, S.; Ho, T.; Zhang, H.; Hong, X.; Ward, P.; Hofmann, G.; Siegfried, B.; Zappacosta, F.; Washio, Y.; Cao, P.; Qu, J.; Bertrand, S.; Wang, D. Y.; Head, M. S.; Li, H.; Moores, S.; Lai, Z.; Johanson, K.; Burton, G.; Erickson-Miller, C.; Simpson, G.; Tummino, P.; Copeland, R. A.; Oliff, A. Discovery and characterization of a cell-permeable, small-molecule c-Abl kinase activator that binds to the myristoyl binding site. *Chemistry & biology* **2011**, *18*, 177-86.
25. Kantarjian, H.; Giles, F.; Wunderle, L.; Bhalla, K.; O'Brien, S.; Wassmann, B.; Tanaka, C.; Manley, P.; Rae, P.; Mietlowski, W.; Bochinski, K.; Hochhaus, A.; Griffin, J. D.; Hoelzer, D.; Albitar, M.; Dugan, M.; Cortes, J.; Alland, L.; Ottmann, O. G. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* **2006**, *354*, 2542-51.
26. O'Hare, T.; Walters, D. K.; Stoffregen, E. P.; Jia, T.; Manley, P. W.; Mestan, J.; Cowan-Jacob, S. W.; Lee, F. Y.; Heinrich, M. C.; Deininger, M. W.; Druker, B. J. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* **2005**, *65*, 4500-5.

27. Zhang, J.; Adrián, F. J.; Jahnke, W.; Cowan-Jacob, S. W.; Li, A. G.; Iacob, R. E.; Sim, T.; Powers, J.; Dierks, C.; Sun, F.; Guo, G. R.; Ding, Q.; Okram, B.; Choi, Y.; Wojciechowski, A.; Deng, X.; Liu, G.; Fendrich, G.; Strauss, A.; Vajpai, N.; Grzesiek, S.; Tuntland, T.; Liu, Y.; Bursulaya, B.; Azam, M.; Manley, P. W.; Engen, J. R.; Daley, G. Q.; Warmuth, M.; Gray, N. S. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* **2010**, *463*, 501-6.
28. Sos, M. L.; Rode, H. B.; Heynck, S.; Peifer, M.; Fischer, F.; Klüter, S.; Pawar, V. G.; Reuter, C.; Heuckmann, J. M.; Weiss, J.; Ruddigkeit, L.; Rabiller, M.; Koker, M.; Simard, J. R.; Getlik, M.; Yuza, Y.; Chen, T. H.; Greulich, H.; Thomas, R. K.; Rauh, D. Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation. *Cancer Res* **2010**, *70*, 868-74.
29. Klüter, S.; Simard, J. R.; Rode, H. B.; Grütter, C.; Pawar, V.; Raaijmakers, H. C.; Barf, T. A.; Rabiller, M.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D. Characterization of irreversible kinase inhibitors by directly detecting covalent bond formation: a tool for dissecting kinase drug resistance. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2010**, *11*, 2557-66.
30. Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 307-17.
31. Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 28-39.
32. Barf, T.; Kaptein, A. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 6243-62.
33. Carmi, C.; Mor, M.; Petronini, P. G.; Alfieri, R. R. Clinical perspectives for irreversible tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Biochemical pharmacology* **2012**, *84*, 1388-99.
34. Morphy, R. Selectively nonselective kinase inhibition: striking the right balance. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 1413-37.
35. Levitzki, A.; Mishani, E. Tyrphostins and other tyrosine kinase inhibitors. *Annual review of biochemistry* **2006**, *75*, 93-109.
36. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 2985-2993.
37. Fischer, E. Synthesen in der Zuckergruppe II. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 3189-3232.
38. Copeland, R. A. Conformational adaptation in drug-target interactions and residence time. *Future medicinal chemistry* **2011**, *3*, 1491-501.
39. Knapp, S.; Arruda, P.; Blagg, J.; Burley, S.; Drewry, D. H.; Edwards, A.; Fabbro, D.; Gillespie, P.; Gray, N. S.; Kuster, B.; Lackey, K. E.; Mazzafera, P.; Tomkinson, N. C.; Willson, T. M.; Workman, P.; Zuercher, W. J. A public-private partnership to unlock the untargeted kinome. *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 3-6.

40. Bebbington, D.; Binch, H.; Charrier, J. D.; Everitt, S.; Fraysse, D.; Golec, J.; Kay, D.; Knegtel, R.; Mak, C.; Mazzei, F.; Miller, A.; Mortimore, M.; O'Donnell, M.; Patel, S.; Pierard, F.; Pinder, J.; Pollard, J.; Ramaya, S.; Robinson, D.; Rutherford, A.; Studley, J.; Westcott, J. The discovery of the potent aurora inhibitor MK-0457 (VX-680). *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 3586-92.
41. Green, M. R.; Woolery, J. E.; Mahadevan, D. Update on Aurora Kinase Targeted Therapeutics in Oncology. *Expert opinion on drug discovery* **2011**, *6*, 291-307.
42. Weinstein, I. B.; Joe, A. K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **2006**, *3*, 448-57.
43. Collins, F. S.; Barker, A. D. Mapping the cancer genome. Pinpointing the genes involved in cancer will help chart a new course across the complex landscape of human malignancies. *Scientific American* **2007**, *296*, 50-7.
44. Drmanac, R.; Sparks, A. B.; Callow, M. J.; Halpern, A. L.; Burns, N. L.; Kermani, B. G.; Carnevali, P.; Nazarenko, I.; Nilsen, G. B.; Yeung, G.; Dahl, F.; Fernandez, A.; Staker, B.; Pant, K. P.; Baccash, J.; Borcherding, A. P.; Brownley, A.; Cedeno, R.; Chen, L.; Chernikoff, D.; Cheung, A.; Chirita, R.; Curson, B.; Ebert, J. C.; Hacker, C. R.; Hartlage, R.; Hauser, B.; Huang, S.; Jiang, Y.; Karpinchyk, V.; Koenig, M.; Kong, C.; Landers, T.; Le, C.; Liu, J.; McBride, C. E.; Morenzoni, M.; Morey, R. E.; Mutch, K.; Perazich, H.; Perry, K.; Peters, B. A.; Peterson, J.; Pethiyagoda, C. L.; Pothuraju, K.; Richter, C.; Rosenbaum, A. M.; Roy, S.; Shafto, J.; Sharanhovich, U.; Shannon, K. W.; Sheppy, C. G.; Sun, M.; Thakuria, J. V.; Tran, A.; Vu, D.; Zaranek, A. W.; Wu, X.; Drmanac, S.; Oliphant, A. R.; Banyai, W. C.; Martin, B.; Ballinger, D. G.; Church, G. M.; Reid, C. A. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* **2010**, *327*, 78-81.
45. Dingermann, T.; Zündorf, I.; Steinhilber, D. Personalized tumor therapy. *PHARMAKON* **2013**, *1*, 40-47.
46. Mok, T. S.; Wu, Y. L.; Thongprasert, S.; Yang, C. H.; Chu, D. T.; Saijo, N.; Sunpaweravong, P.; Han, B.; Margono, B.; Ichinose, Y.; Nishiwaki, Y.; Ohe, Y.; Yang, J. J.; Chewaskulyong, B.; Jiang, H.; Duffield, E. L.; Watkins, C. L.; Armour, A. A.; Fukuoka, M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* **2009**, *361*, 947-57.
47. Maemondo, M.; Inoue, A.; Kobayashi, K.; Sugawara, S.; Oizumi, S.; Isobe, H.; Gemma, A.; Harada, M.; Yoshizawa, H.; Kinoshita, I.; Fujita, Y.; Okinaga, S.; Hirano, H.; Yoshimori, K.; Harada, T.; Ogura, T.; Ando, M.; Miyazawa, H.; Tanaka, T.; Saijo, Y.; Hagiwara, K.; Morita, S.; Nukiwa, T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* **2010**, *362*, 2380-8.
48. Mayer-Wrangowski, S.; Rauh, D. Symbiose aus Chemie und Medizin — zielgerichtet gegen Krebs. *Biospektrum* **2012**, *18*, 376-379.

49. Rosell, R.; Carcereny, E.; Gervais, R.; Vergnenegre, A.; Massuti, B.; Felip, E.; Palmero, R.; Garcia-Gomez, R.; Pallares, C.; Sanchez, J. M.; Porta, R.; Cobo, M.; Garrido, P.; Longo, F.; Moran, T.; Insa, A.; De Marinis, F.; Corre, R.; Bover, I.; Illiano, A.; Dansin, E.; de Castro, J.; Milella, M.; Reguart, N.; Altavilla, G.; Jimenez, U.; Provencio, M.; Moreno, M. A.; Terrasa, J.; Muñoz-Langa, J.; Valdivia, J.; Isla, D.; Domine, M.; Molinier, O.; Mazieres, J.; Baize, N.; Garcia-Campelo, R.; Robinet, G.; Rodriguez-Abreu, D.; Lopez-Vivanco, G.; Gebbia, V.; Ferrera-Delgado, L.; Bombaron, P.; Bernabe, R.; Bearz, A.; Artal, A.; Cortesi, E.; Rolfo, C.; Sanchez-Ronco, M.; Drozdowskyj, A.; Queralt, C.; de Aguirre, I.; Ramirez, J. L.; Sanchez, J. J.; Molina, M. A.; Taron, M.; Paz-Ares, L. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology* **2012**, *13*, 239-46.
50. Druker, B. J.; Guilhot, F.; O'Brien, S. G.; Gathmann, I.; Kantarjian, H.; Gattermann, N.; Deininger, M. W.; Silver, R. T.; Goldman, J. M.; Stone, R. M.; Cervantes, F.; Hochhaus, A.; Powell, B. L.; Gabrilove, J. L.; Rousselot, P.; Reiffers, J.; Cornelissen, J. J.; Hughes, T.; Agis, H.; Fischer, T.; Verhoef, G.; Shepherd, J.; Saglio, G.; Gratwohl, A.; Nielsen, J. L.; Radich, J. P.; Simonsson, B.; Taylor, K.; Baccarani, M.; So, C.; Letvak, L.; Larson, R. A. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **2006**, *355*, 2408-17.
51. Barbie, D. A.; Tamayo, P.; Boehm, J. S.; Kim, S. Y.; Moody, S. E.; Dunn, I. F.; Schinzel, A. C.; Sandy, P.; Meylan, E.; Scholl, C.; Fröhling, S.; Chan, E. M.; Sos, M. L.; Michel, K.; Mermel, C.; Silver, S. J.; Weir, B. A.; Reiling, J. H.; Sheng, Q.; Gupta, P. B.; Wadlow, R. C.; Le, H.; Hoersch, S.; Wittner, B. S.; Ramaswamy, S.; Livingston, D. M.; Sabatini, D. M.; Meyerson, M.; Thomas, R. K.; Lander, E. S.; Mesirov, J. P.; Root, D. E.; Gilliland, D. G.; Jacks, T.; Hahn, W. C. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* **2009**, *462*, 108-12.
52. Goncalves, A.; Bürckstümmer, T.; Dixit, E.; Scheicher, R.; Górna, M. W.; Karayel, E.; Sugar, C.; Stukalov, A.; Berg, T.; Kralovics, R.; Planyavsky, M.; Bennett, K. L.; Colinge, J.; Superti-Furga, G. Functional dissection of the TBK1 molecular network. *PloS one* **2011**, *6*, e23971.
53. Davis, M. I.; Hunt, J. P.; Herrgard, S.; Ciceri, P.; Wodicka, L. M.; Pallares, G.; Hocker, M.; Treiber, D. K.; Zarrinkar, P. P. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology* **2011**, *29*, 1046-51.
54. Fabian, M. A.; Biggs, W. H., 3rd; Treiber, D. K.; Atteridge, C. E.; Azimioara, M. D.; Benedetti, M. G.; Carter, T. A.; Ciceri, P.; Edeen, P. T.; Floyd, M.; Ford, J. M.; Galvin, M.; Gerlach, J. L.; Grotzfeld, R. M.; Herrgard, S.; Insko, D. E.; Insko, M. A.; Lai, A. G.; Lelias, J. M.; Mehta, S. A.; Milanov, Z. V.; Velasco, A. M.; Wodicka, L. M.; Patel, H. K.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature biotechnology* **2005**, *23*, 329-36.
55. Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology* **2008**, *26*, 127-32.
56. Klebe, G. *Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2nd ed.; Spektrum Akademischer Verlag: **2009**.

57. Apperley, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *The lancet oncology* **2007**, 8, 1018-29.
58. O'Hare, T.; Shakespeare, W. C.; Zhu, X.; Eide, C. A.; Rivera, V. M.; Wang, F.; Adrian, L. T.; Zhou, T.; Huang, W. S.; Xu, Q.; Metcalf, C. A., 3rd; Tyner, J. W.; Loriaux, M. M.; Corbin, A. S.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Keats, J. A.; Wang, Y.; Sundaramoorthi, R.; Thomas, M.; Zhou, D.; Snodgrass, J.; Commodore, L.; Sawyer, T. K.; Dalgarno, D. C.; Deininger, M. W.; Druker, B. J.; Clackson, T. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* **2009**, 16, 401-12.
59. U.S. National Library of Medicine. <http://www.clinicaltrials.gov/>
60. Lurje, G.; Lenz, H. J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* **2009**, 77, 400-10.
61. Moreno-Aspitia, A.; Dueck, A. C.; Ghanem-Cañete, I.; Patel, T.; Dakhil, S.; Johnson, D.; Franco, S.; Kahanic, S.; Colon-Otero, G.; Tenner, K. S.; Rodeheffer, R.; McCullough, A. E.; Jenkins, R. B.; Palmieri, F. M.; Northfelt, D.; Perez, E. A. RC0639: phase II study of paclitaxel, trastuzumab, and lapatinib as adjuvant therapy for early stage HER2-positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **2013**, 138, 427-35.
62. Wainberg, Z. A.; Anghel, A.; Desai, A. J.; Ayala, R.; Luo, T.; Safran, B.; Fejzo, M. S.; Hecht, J. R.; Slamon, D. J.; Finn, R. S. Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **2010**, 16, 1509-19.
63. Jabbour, E.; Cortes, J.; Kantarjian, H. Long-term outcomes in the second-line treatment of chronic myeloid leukemia: a review of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* **2011**, 117, 897-906.
64. Gajiwala, K. S.; Wu, J. C.; Christensen, J.; Deshmukh, G. D.; Diehl, W.; DiNitto, J. P.; English, J. M.; Greig, M. J.; He, Y. A.; Jacques, S. L.; Lunney, E. A.; McTigue, M.; Molina, D.; Quenzer, T.; Wells, P. A.; Yu, X.; Zhang, Y.; Zou, A.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G.; Zhang, H. M.; Demetri, G. D. KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106, 1542-7.
65. Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Demetri, G. D.; Blanke, C. D.; von Mehren, M.; Joensuu, H.; McGreevey, L. S.; Chen, C. J.; Van den Abbeele, A. D.; Druker, B. J.; Kiese, B.; Eisenberg, B.; Roberts, P. J.; Singer, S.; Fletcher, C. D.; Silberman, S.; Dimitrijevic, S.; Fletcher, J. A. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **2003**, 21, 4342-9.
66. Shah, N. P.; Nicoll, J. M.; Nagar, B.; Gorre, M. E.; Paquette, R. L.; Kuriyan, J.; Sawyers, C. L. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2002**, 2, 117-25.
67. Griswold, I. J.; MacPartlin, M.; Bumm, T.; Goss, V. L.; O'Hare, T.; Lee, K. A.; Corbin, A. S.; Stoffregen, E. P.; Smith, C.; Johnson, K.; Moseson, E. M.; Wood, L. J.; Polakiewicz, R. D.; Druker, B. J.; Deininger, M. W. Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol* **2006**, 26, 6082-93.

68. Shah, N. P.; Sawyers, C. L. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* **2003**, *22*, 7389-95.
69. Willis, S. G.; Lange, T.; Demehri, S.; Otto, S.; Crossman, L.; Niederwieser, D.; Stoffregen, E. P.; McWeeney, S.; Kovacs, I.; Park, B.; Druker, B. J.; Deininger, M. W. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* **2005**, *106*, 2128-37.
70. Gibbons, D. L.; Prichard, S.; Kantarjian, H.; Cortes, J.; Quintas-Cardama, A. The rise and fall of gatekeeper mutations? The BCR-ABL1 T315I paradigm. *Cancer* **2011**.
71. Eide, C. A.; Adrian, L. T.; Tyner, J. W.; Mac Partlin, M.; Anderson, D. J.; Wise, S. C.; Smith, B. D.; Petillo, P. A.; Flynn, D. L.; Deininger, M. W.; O'Hare, T.; Druker, B. J. The ABL Switch Control Inhibitor DCC-2036 Is Active against the Chronic Myeloid Leukemia Mutant BCR-ABL T315I and Exhibits a Narrow Resistance Profile. *Cancer Res* **2011**, *71*, 3189-95.
72. Antonescu, C. R. The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *J Pathol* **2011**, *223*, 251-61.
73. Wang, W. L.; Conley, A.; Reynoso, D.; Nolden, L.; Lazar, A. J.; George, S.; Trent, J. C. Mechanisms of resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* **2010**, *67* Suppl 1, S15-24.
74. Jänne, P. A.; Gray, N.; Settleman, J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 709-23.
75. Thomas, M.; Huang, W. S.; Wen, D.; Zhu, X.; Wang, Y.; Metcalf, C. A.; Liu, S.; Chen, I.; Romero, J.; Zou, D.; Sundaramoorthi, R.; Li, F.; Qi, J.; Cai, L.; Zhou, T.; Commodore, L.; Xu, Q.; Keats, J.; Wang, F.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Snodgrass, J. T.; Broudy, M. I.; Russian, K.; Iulucci, J.; Rivera, V. M.; Sawyer, T. K.; Dalgarno, D. C.; Clackson, T.; Shakespeare, W. C. Discovery of 5-(arenethynyl) hetero-monocyclic derivatives as potent inhibitors of BCR-ABL including the T315I gatekeeper mutant. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**.
76. Santos, F. P.; Quintas-Cardama, A. New drugs for chronic myelogenous leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* **2011**, *6*, 96-103.
77. Sun, L.; Liang, C.; Shirazian, S.; Zhou, Y.; Miller, T.; Cui, J.; Fukuda, J. Y.; Chu, J. Y.; Nematalla, A.; Wang, X.; Chen, H.; Sistla, A.; Luu, T. C.; Tang, F.; Wei, J.; Tang, C. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, *46*, 1116-9.
78. Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R. A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 835-44.
79. Hunter, C. A.; Singh, J.; Thornton, J. M. Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J Mol Biol* **1991**, *218*, 837-46.

80. Barker, A. J.; Gibson, K. H.; Grundy, W.; Godfrey, A. A.; Barlow, J. J.; Healy, M. P.; Woodburn, J. R.; Ashton, S. E.; Curry, B. J.; Scarlett, L.; Henthorn, L.; Richards, L. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, 11, 1911-4.
81. Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **1996**, 2, 561-6.
82. Lozzio, C. B.; Lozzio, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **1975**, 45, 321-34.
83. Copeland, R. A.; Basavapathruni, A.; Moyer, M.; Scott, M. P. Impact of enzyme concentration and residence time on apparent activity recovery in jump dilution analysis. *Analytical biochemistry* **2011**, 416, 206-10.
84. Williams, D. P.; Park, B. K. Idiosyncratic toxicity: the role of toxicophores and bioactivation. *Drug discovery today* **2003**, 8, 1044-50.
85. Norman, R. A.; Toader, D.; Ferguson, A. D. Structural approaches to obtain kinase selectivity. *Trends in pharmacological sciences* **2012**, 33, 273-8.
86. Anastassiadis, T.; Deacon, S. W.; Devarajan, K.; Ma, H.; Peterson, J. R. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology* **2011**, 29, 1039-45.
87. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S.; Alessi, D. R.; Cohen, P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *The Biochemical journal* **2007**, 408, 297-315.
88. Godl, K.; Wissing, J.; Kurtenbach, A.; Habenberger, P.; Blencke, S.; Gutbrod, H.; Salassidis, K.; Stein-Gerlach, M.; Missio, A.; Cotten, M.; Daub, H. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, 15434-9.
89. Brehmer, D.; Greff, Z.; Godl, K.; Blencke, S.; Kurtenbach, A.; Weber, M.; Müller, S.; Klebl, B.; Cotten, M.; Kéri, G.; Wissing, J.; Daub, H. Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res* **2005**, 65, 379-82.
90. Sharma, K.; Weber, C.; Bairlein, M.; Greff, Z.; Kéri, G.; Cox, J.; Olsen, J. V.; Daub, H. Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts. *Nature methods* **2009**, 6, 741-4.
91. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, 40, 2004-2021.
92. Shi, H.; Zhang, C. J.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q. Cell-based proteome profiling of potential dasatinib targets by use of affinity-based probes. *J Am Chem Soc* **2012**, 134, 3001-14.
93. Gomperts, B. D.; Tatham, P. E. R.; Kramer, I. M. *Signal transduction*. Academic Press: San Diego, Calif., 2002; p xiv, 424 p.

94. Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2002**, *1*, 376-86.
95. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology* **1973**, *22*, 3099-108.
96. Urich, R.; Wishart, G.; Kiczun, M.; Richters, A.; Tidten-Luksch, N.; Rauh, D.; Sherborne, B.; Wyatt, P. G.; Brenk, R. De Novo Design of Protein Kinase Inhibitors by in Silico Identification of Hinge Region-Binding Fragments. *ACS chemical biology* **2013**, *8*, 1044-52.
97. Rickert, P.; Seghezzi, W.; Shanahan, F.; Cho, H.; Lees, E. Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* **1996**, *12*, 2631-40.
98. Carafoli, F.; Mayer, M. C.; Shiraishi, K.; Pecheva, M. A.; Chan, L. Y.; Nan, R.; Leitinger, B.; Hohenester, E. Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure* **2012**, *20*, 688-97.
99. Mayer, R. J.; Callahan, J. F. p38 MAP kinase inhibitors: A future therapy for inflammatory diseases. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* **2006**, *3*, 49-54.
100. Gao, X. N.; Lin, J.; Li, Y. H.; Gao, L.; Wang, X. R.; Wang, W.; Kang, H. Y.; Yan, G. T.; Wang, L. L.; Yu, L. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **2011**, *30*, 3416-28.
101. Hsieh, T. C.; Wu, J. M. Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *Biofactors* **2010**, *36*, 360-9.
102. Sun, B.; Hoshino, J.; Jermihov, K.; Marler, L.; Pezzuto, J. M.; Mesecar, A. D.; Cushman, M. Design, synthesis, and biological evaluation of resveratrol analogues as aromatase and quinone reductase 2 inhibitors for chemoprevention of cancer. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 5352-66.
103. Michaelis, S.; Marais, A.; Schrey, A. K.; Graebner, O. Y.; Schaudt, C.; Sefkow, M.; Kroll, F.; Dreger, M.; Glinski, M.; Koester, H.; Metternich, R.; Fischer, J. J. Dabigatran and dabigatran ethyl ester: potent inhibitors of ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase (NQO2). *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 3934-44.
104. Bishop, A. C.; Shah, K.; Liu, Y.; Witucki, L.; Kung, C.; Shokat, K. M. Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Current biology : CB* **1998**, *8*, 257-66.
105. Shah, K.; Liu, Y.; Deirmengian, C.; Shokat, K. M. Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 3565-70.

106. Alaimo, P. J.; Shogren-Knaak, M. A.; Shokat, K. M. Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways. *Current opinion in chemical biology* **2001**, *5*, 360-7.
107. Blair, J. A.; Rauh, D.; Kung, C.; Yun, C. H.; Fan, Q. W.; Rode, H.; Zhang, C.; Eck, M. J.; Weiss, W. A.; Shokat, K. M. Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 229-38.
108. Vader, G.; Lens, S. M. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1786*, 60-72.
109. Marumoto, T.; Zhang, D.; Saya, H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 42-50.
110. Ruchaud, S.; Carmena, M.; Earnshaw, W. C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2007**, *8*, 798-812.
111. Xu, X.; Wang, X.; Xiao, Z.; Li, Y.; Wang, Y. Two TPX2-dependent switches control the activity of Aurora A. *PloS one* **2011**, *6*, e16757.
112. Martin, M. P.; Zhu, J. Y.; Lawrence, H. R.; Pireddu, R.; Luo, Y.; Alam, R.; Ozcan, S.; Sebti, S. M.; Lawrence, N. J.; Schönbrunn, E. A novel mechanism by which small molecule inhibitors induce the DFG flip in Aurora A. *ACS chemical biology* **2012**, *7*, 698-706.
113. Carmena, M.; Earnshaw, W. C. The cellular geography of aurora kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2003**, *4*, 842-54.
114. Klein, U. R.; Nigg, E. A.; Gruneberg, U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Molecular biology of the cell* **2006**, *17*, 2547-58.
115. Lens, S. M.; Rodriguez, J. A.; Vader, G.; Span, S. W.; Giaccone, G.; Medema, R. H. Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Molecular biology of the cell* **2006**, *17*, 1897-909.
116. Levenson, J. D.; Huang, H. K.; Forsburg, S. L.; Hunter, T. The *Schizosaccharomyces pombe* aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis. *Molecular biology of the cell* **2002**, *13*, 1132-43.
117. Petersen, J.; Paris, J.; Willer, M.; Philippe, M.; Hagan, I. M. The *S. pombe* aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *Journal of cell science* **2001**, *114*, 4371-84.
118. Koch, A.; Rode, H. B.; Richters, A.; Rauh, D.; Hauf, S. A chemical genetic approach for covalent inhibition of analogue-sensitive aurora kinase. *ACS chemical biology* **2012**, *7*, 723-31.
119. Bishop, A. C.; Ubersax, J. A.; Petsch, D. T.; Matheos, D. P.; Gray, N. S.; Blethrow, J.; Shimizu, E.; Tsien, J. Z.; Schultz, P. G.; Rose, M. D.; Wood, J. L.; Morgan, D. O.; Shokat, K. M. A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **2000**, *407*, 395-401.

120. Papa, F. R.; Zhang, C.; Shokat, K.; Walter, P. Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science* **2003**, 302, 1533-7.
121. Bischoff, J. R.; Anderson, L.; Zhu, Y.; Mossie, K.; Ng, L.; Souza, B.; Schryver, B.; Flanagan, P.; Clairvoyant, F.; Ginther, C.; Chan, C. S.; Novotny, M.; Slamon, D. J.; Plowman, G. D. A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO journal* **1998**, 17, 3052-65.
122. Sen, S.; Zhou, H.; White, R. A. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **1997**, 14, 2195-200.
123. Gritsko, T. M.; Coppola, D.; Paciga, J. E.; Yang, L.; Sun, M.; Shelley, S. A.; Fiorica, J. V.; Nicosia, S. V.; Cheng, J. Q. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **2003**, 9, 1420-6.
124. Katayama, H.; Ota, T.; Jisaki, F.; Ueda, Y.; Tanaka, T.; Odashima, S.; Suzuki, F.; Terada, Y.; Tatsuka, M. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *Journal of the National Cancer Institute* **1999**, 91, 1160-2.
125. Li, D.; Zhu, J.; Firozi, P. F.; Abbruzzese, J. L.; Evans, D. B.; Cleary, K.; Friess, H.; Sen, S. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **2003**, 9, 991-7.
126. Sen, S.; Zhou, H.; Zhang, R. D.; Yoon, D. S.; Vakar-Lopez, F.; Ito, S.; Jiang, F.; Johnston, D.; Grossman, H. B.; Ruifrok, A. C.; Katz, R. L.; Brinkley, W.; Czerniak, B. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **2002**, 94, 1320-9.
127. Harrington, E. A.; Bebbington, D.; Moore, J.; Rasmussen, R. K.; Ajose-Adeogun, A. O.; Nakayama, T.; Graham, J. A.; Demur, C.; Hercend, T.; Diu-Hercend, A.; Su, M.; Golec, J. M.; Miller, K. M. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* **2004**, 10, 262-7.
128. Fancelli, D.; Moll, J.; Varasi, M.; Bravo, R.; Artico, R.; Berta, D.; Bindi, S.; Cameron, A.; Candiani, I.; Cappella, P.; Carpinelli, P.; Croci, W.; Forte, B.; Giorgini, M. L.; Klapwijk, J.; Marsiglio, A.; Pesenti, E.; Rocchetti, M.; Roletto, F.; Severino, D.; Soncini, C.; Storici, P.; Tonani, R.; Zugnoni, P.; Vianello, P. 1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazoles: identification of a potent Aurora kinase inhibitor with a favorable antitumor kinase inhibition profile. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, 49, 7247-51.
129. Carpinelli, P.; Ceruti, R.; Giorgini, M. L.; Cappella, P.; Gianellini, L.; Croci, V.; Degrassi, A.; Texido, G.; Rocchetti, M.; Vianello, P.; Rusconi, L.; Storici, P.; Zugnoni, P.; Arrigoni, C.; Soncini, C.; Alli, C.; Patton, V.; Marsiglio, A.; Ballinari, D.; Pesenti, E.; Fancelli, D.; Moll, J. PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Molecular cancer therapeutics* **2007**, 6, 3158-68.
130. Fletcher, G. C.; Brokx, R. D.; Denny, T. A.; Hembrough, T. A.; Plum, S. M.; Fogler, W. E.; Sidor, C. F.; Bray, M. R. ENMD-2076 is an orally active kinase inhibitor with antiangiogenic and antiproliferative mechanisms of action. *Molecular cancer therapeutics* **2011**, 10, 126-37.

131. Tentler, J. J.; Bradshaw-Pierce, E. L.; Serkova, N. J.; Hasebroock, K. M.; Pitts, T. M.; Diamond, J. R.; Fletcher, G. C.; Bray, M. R.; Eckhardt, S. G. Assessment of the in vivo antitumor effects of ENMD-2076, a novel multitargeted kinase inhibitor, against primary and cell line-derived human colorectal cancer xenograft models. *Clin Cancer Res* **2010**, *16*, 2989-98.
132. Shimomura, T.; Hasako, S.; Nakatsuru, Y.; Mita, T.; Ichikawa, K.; Kodera, T.; Sakai, T.; Nambu, T.; Miyamoto, M.; Takahashi, I.; Miki, S.; Kawanishi, N.; Ohkubo, M.; Kotani, H.; Iwasawa, Y. MK-5108, a highly selective Aurora-A kinase inhibitor, shows antitumor activity alone and in combination with docetaxel. *Molecular cancer therapeutics* **2010**, *9*, 157-66.
133. Nomura, D. K.; Dix, M. M.; Cravatt, B. F. Activity-based protein profiling for biochemical pathway discovery in cancer. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 630-8.
134. Simard, J. R.; Klüter, S.; Grütter, C.; Getlik, M.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Rauh, D. A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 394-6.
135. Ditchfield, C.; Johnson, V. L.; Tighe, A.; Ellston, R.; Haworth, C.; Johnson, T.; Mortlock, A.; Keen, N.; Taylor, S. S. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology* **2003**, *161*, 267-80.
136. Lounkine, E.; Wawer, M.; Wassermann, A. M.; Bajorath, J. SARANEA: a freely available program to mine structure-activity and structure-selectivity relationship information in compound data sets. *Journal of chemical information and modeling* **2010**, *50*, 68-78.
137. Soncini, C.; Carpinelli, P.; Gianellini, L.; Fancelli, D.; Vianello, P.; Rusconi, L.; Storici, P.; Zugnoni, P.; Pesenti, E.; Croci, V.; Ceruti, R.; Giorgini, M. L.; Cappella, P.; Ballinari, D.; Sola, F.; Varasi, M.; Bravo, R.; Moll, J. PHA-680632, a novel Aurora kinase inhibitor with potent antitumoral activity. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 4080-9.
138. Huang, S.; Connolly, P. J.; Lin, R.; Emanuel, S.; Middleton, S. A. Synthesis and evaluation of N-acyl sulfonamides as potential prodrugs of cyclin-dependent kinase inhibitor JNJ-7706621. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 3639-41.
139. Emanuel, S.; Rugg, C. A.; Gruninger, R. H.; Lin, R.; Fuentes-Pesquera, A.; Connolly, P. J.; Wetter, S. K.; Hollister, B.; Kruger, W. W.; Napier, C.; Jolliffe, L.; Middleton, S. A. The in vitro and in vivo effects of JNJ-7706621: a dual inhibitor of cyclin-dependent kinases and aurora kinases. *Cancer Res* **2005**, *65*, 9038-46.
140. Mjalli, A. M. M.; Grella, B. S.; Subramanian, G.; Arimilli, M. N.; Gopaldaswamy, R.; Andrews, R. C.; Davis, S.; Guo, X.; Zhu, J. Preparation of benzazole derivatives as Aurora kinase inhibitors. WO2007095124A2, 2007.
141. Romanelli, A.; Gianella-Borradori, A.; Raymond, E.; Serova, M.; Faivre, S. Antitumor combinations of (1R,2R,3S,4S)-N4-(3-aminocarbonylbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl)-5-fluoro-N2-[(3-methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)]phenyl-2,4-pyrimidinediamine and signaling inhibitors. WO2009050143A1, 2009.

142. Bramson, H. N.; Corona, J.; Davis, S. T.; Dickerson, S. H.; Edelstein, M.; Frye, S. V.; Gampe, R. T., Jr.; Harris, P. A.; Hassell, A.; Holmes, W. D.; Hunter, R. N.; Lackey, K. E.; Lovejoy, B.; Luzzio, M. J.; Montana, V.; Rocque, W. J.; Rusnak, D.; Shewchuk, L.; Veal, J. M.; Walker, D. H.; Kuyper, L. F. Oxindole-based inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2): design, synthesis, enzymatic activities, and X-ray crystallographic analysis. *Journal of medicinal chemistry* **2001**, *44*, 4339-58.
143. Bavetsias, V.; Large, J. M.; Sun, C.; Bouloc, N.; Kosmopoulou, M.; Matteucci, M.; Wilsher, N. E.; Martins, V.; Reynisson, J.; Atrash, B.; Faisal, A.; Urban, F.; Valenti, M.; de Haven Brandon, A.; Box, G.; Raynaud, F. I.; Workman, P.; Eccles, S. A.; Bayliss, R.; Blagg, J.; Linardopoulos, S.; McDonald, E. Imidazo[4,5-b]pyridine derivatives as inhibitors of Aurora kinases: lead optimization studies toward the identification of an orally bioavailable preclinical development candidate. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 5213-28.
144. Sakai, A.; Kato, M.; Fukasawa, M.; Ishiguro, M.; Furuya, E.; Sakakibara, R. Cloning of cDNA encoding for a novel isozyme of fructose 6-phosphate, 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from human placenta. *Journal of biochemistry* **1996**, *119*, 506-11.
145. Bystroem, S.; Hedgecock, C.; Homan, E.; Lundbaeck, T.; Martinsson, J.; Sari, M.; Faernegaardh, K.; Joensson, M. Preparation of (hetero)aryl sulfonamides for treating inflammation and cancer. WO2012035171A2, 2012.
146. Koul, A.; Klebl, B.; Mueller, G.; Missio, A.; Schwab, W.; Hafenbradl, D.; Neumann, L.; Sommer, M.-N.; Mueller, S.; Hoppe, E.; Freisleben, A.; Backes, A.; Hartung, C.; Felber, B.; Zech, B.; Engkvist, O.; Keri, G.; Oerfi, L.; Banhegyi, P.; Greff, Z.; Horvath, Z.; Varga, Z.; Marko, P.; Pato, J.; Szabadkai, I.; Szekelyhidi, Z.; Waczek, F. Preparation of heterobicyclic fused thieno-pyran compounds as antibacterial, antiviral, antitumor, and pharmaceutically active agents. WO2005023818A2, 2005.
147. Cai, X.; Qian, C.; Gould, S.; Zhai, H. Preparation of pyridine derivatives as Raf kinase inhibitors. WO2008115263A2, 2008.
148. Klebl, B.; Baumann, M.; Hoppe, E.; Brehmer, D.; Daub, H.; Keri, G.; Varga, Z.; Marosfalvi, J.; Oerfi, L. Preparation of pyrimidine derivatives as phosphatase and kinase inhibitors for treating a variety of diseases. WO2006021458A2, 2006.
149. Ullrich, A.; Knyazev, P.; Zhang, Y.; Keri, G.; Oerfi, L.; Szabadkai, I. Preparation of quinoline derivatives as AXL kinase inhibitors. WO2009127417A1, 2009.
150. Murthi, K.; Casaubon, R.; Kluge, A. F.; Smith, C. Preparation of pyrido[2,3-d]pyrimidines as kinase inhibitors. WO2008047307A1, 2008.
151. Hirth, K. P.; Mann, E.; Shawyer, L. K.; Ullrich, A.; Szekely, I.; Bajor, T.; Haimichael, J.; Orfi, L.; Levitzki, A.; Gazit, A.; Tang, P. C.; Lammers, R. Synthesis and activity of heteroaryl compounds as inhibitors of platelet derived growth factor related disorders such as cancers. US6331555B1, 2001.
152. Borbély, G.; Szabadkai, I.; Horváth, Z.; Markó, P.; Varga, Z.; Breza, N.; Baska, F.; Vántus, T.; Huszár, M.; Geiszt, M.; Hunyady, L.; Buday, L.; Orfi, L.; Kéri, G. Small-molecule inhibitors of NADPH oxidase 4. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 6758-62.

153. Pichlmair, A.; Reis e Sousa, C. Innate recognition of viruses. *Immunity* **2007**, *27*, 370-83.
154. Clément, J. F.; Bibeau-Poirier, A.; Gravel, S. P.; Grandvaux, N.; Bonneil, E.; Thibault, P.; Meloche, S.; Servant, M. J. Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *Journal of virology* **2008**, *82*, 3984-96.
155. Kawai, T.; Akira, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* **2007**, *13*, 460-9.
156. Häcker, H.; Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2006**, 2006, re13.
157. Ou, Y. H.; Torres, M.; Ram, R.; Formstecher, E.; Roland, C.; Cheng, T.; Brekken, R.; Wurz, R.; Tasker, A.; Polverino, T.; Tan, S. L.; White, M. A. TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation. *Molecular cell* **2011**, *41*, 458-70.
158. Ma, X.; Helgason, E.; Phung, Q. T.; Quan, C. L.; Iyer, R. S.; Lee, M. W.; Bowman, K. K.; Starovasnik, M. A.; Dueber, E. C. Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 9378-83.
159. Fitzgerald, K. A.; McWhirter, S. M.; Faia, K. L.; Rowe, D. C.; Latz, E.; Golenbock, D. T.; Coyle, A. J.; Liao, S. M.; Maniatis, T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology* **2003**, *4*, 491-6.
160. McWhirter, S. M.; Fitzgerald, K. A.; Rosains, J.; Rowe, D. C.; Golenbock, D. T.; Maniatis, T. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 233-8.
161. Pomerantz, J. L.; Baltimore, D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *The EMBO journal* **1999**, *18*, 6694-704.
162. Tojima, Y.; Fujimoto, A.; Delhase, M.; Chen, Y.; Hatakeyama, S.; Nakayama, K.; Kaneko, Y.; Nimura, Y.; Motoyama, N.; Ikeda, K.; Karin, M.; Nakanishi, M. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* **2000**, *404*, 778-82.
163. Peters, R. T.; Maniatis, T. A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochimica et biophysica acta* **2001**, *1471*, M57-62.
164. Sharma, S.; tenOever, B. R.; Grandvaux, N.; Zhou, G. P.; Lin, R.; Hiscott, J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **2003**, *300*, 1148-51.
165. Saitoh, Y.; Martínez Bruyn, V. J.; Uota, S.; Hasegawa, A.; Yamamoto, N.; Imoto, I.; Inazawa, J.; Yamaoka, S. Overexpression of NF-kappaB inducing kinase underlies constitutive NF-kappaB activation in lung cancer cells. *Lung Cancer* **2010**, *70*, 263-70.

166. Rigaut, G.; Shevchenko, A.; Rutz, B.; Wilm, M.; Mann, M.; Séraphin, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* **1999**, *17*, 1030-2.
167. Chau, T. L.; Gioia, R.; Gatot, J. S.; Patrascu, F.; Carpentier, I.; Chapelle, J. P.; O'Neill, L.; Beyaert, R.; Piette, J.; Chariot, A. Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated? *Trends in biochemical sciences* **2008**, *33*, 171-80.
168. Larabi, A.; Devos, J. M.; Ng, S. L.; Nanao, M. H.; Round, A.; Maniatis, T.; Panne, D. Crystal Structure and Mechanism of Activation of TANK-Binding Kinase 1. *Cell reports* **2013**, *3*, 734-46.
169. Tu, D.; Zhu, Z.; Zhou, A. Y.; Yun, C. H.; Lee, K. E.; Toms, A. V.; Li, Y.; Dunn, G. P.; Chan, E.; Thai, T.; Yang, S.; Ficarro, S. B.; Marto, J. A.; Jeon, H.; Hahn, W. C.; Barbie, D. A.; Eck, M. J. Structure and Ubiquitination-Dependent Activation of TANK-Binding Kinase 1. *Cell reports* **2013**, *3*, 747-58.
170. Ikeda, F.; Hecker, C. M.; Rozenknop, A.; Nordmeier, R. D.; Rogov, V.; Hofmann, K.; Akira, S.; Dötsch, V.; Dikic, I. Involvement of the ubiquitin-like domain of TBK1/IKK-i kinases in regulation of IFN-inducible genes. *The EMBO journal* **2007**, *26*, 3451-62.
171. Newman, A. C.; Scholefield, C. L.; Kemp, A. J.; Newman, M.; McIver, E. G.; Kamal, A.; Wilkinson, S. TBK1 Kinase Addiction in Lung Cancer Cells Is Mediated via Autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and Non-Canonical NF-kappaB Signalling. *PloS one* **2012**, *7*, e50672.
172. Clément, J. F.; Meloche, S.; Servant, M. J. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell research* **2008**, *18*, 889-99.
173. Chien, Y.; Kim, S.; Bumeister, R.; Loo, Y. M.; Kwon, S. W.; Johnson, C. L.; Balakireva, M. G.; Romeo, Y.; Kopelovich, L.; Gale, M., Jr.; Yeaman, C.; Camonis, J. H.; Zhao, Y.; White, M. A. RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* **2006**, *127*, 157-70.
174. McIver, E. G.; Bryans, J.; Birchall, K.; Chugh, J.; Drake, T.; Lewis, S. J.; Osborne, J.; Smiljanic-Hurley, E.; Tsang, W.; Kamal, A.; Levy, A.; Newman, M.; Taylor, D.; Arthur, J. S.; Clark, K.; Cohen, P. Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of pyrimidines as potent inhibitors of TBK1/IKKepsilon kinases. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 7169-73.
175. Clark, K.; Plater, L.; Peggie, M.; Cohen, P. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IkappaB kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284*, 14136-46.
176. Feldman, R. I.; Wu, J. M.; Polokoff, M. A.; Kochanny, M. J.; Dinter, H.; Zhu, D.; Biroc, S. L.; Alicke, B.; Bryant, J.; Yuan, S.; Buckman, B. O.; Lentz, D.; Ferrer, M.; Whitlow, M.; Adler, M.; Finster, S.; Chang, Z.; Arnaiz, D. O. Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 19867-74.

177. Wang, T.; Block, M. A.; Cowen, S.; Davies, A. M.; Devereaux, E.; Gingipalli, L.; Johannes, J.; Larsen, N. A.; Su, Q.; Tucker, J. A.; Whitston, D.; Wu, J.; Zhang, H. J.; Zinda, M.; Chuaqui, C. Discovery of azabenzimidazole derivatives as potent, selective inhibitors of TBK1/IKKepsilon kinases. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 2063-9.
178. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **1990**, *215*, 403-10.
179. Information, N. C. f. B. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
180. Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195-201.
181. Kiefer, F.; Arnold, K.; Kunzli, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic acids research* **2009**, *37*, D387-92.
182. Xiao, X.-Y.; Patel, D. V.; Ward, J. S.; Bray, M. R.; Agoston, G. E.; Treston, A. M. Preparation of substituted pyrazole compounds as protein kinase inhibitors. WO2007041358A2, 2007.
183. Zhao, B.; Smallwood, A.; Yang, J.; Koretke, K.; Nurse, K.; Calamari, A.; Kirkpatrick, R. B.; Lai, Z. Modulation of kinase-inhibitor interactions by auxiliary protein binding: crystallography studies on Aurora A interactions with VX-680 and with TPX2. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2008**, *17*, 1791-7.
184. Lerner, C.; Ruf, A.; Gramlich, V.; Masjost, B.; Zürcher, G.; Jakob-Roetne, R.; Borroni, E.; Diederich, F. X-ray Crystal Structure of a Bisubstrate Inhibitor Bound to the Enzyme Catechol-O-methyltransferase: A Dramatic Effect of Inhibitor Preorganization on Binding Affinity We thank F. Hoffmann-La Roche for generous support of this work. We are grateful to P. Malherbe for the cloning of COMT, P. Caspers for the expression of COMT, A. Cesura for enzyme purification, B. Wipf for fermentation, and H. W. Lahm for sequencing. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 4040-4042.
185. Fedorov, O.; Müller, S.; Knapp, S. The (un)targeted cancer kinome. *Nat Chem Biol* **2010**, *6*, 166-169.
186. Liao, J. J. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50*, 409-24.
187. Akritopoulou-Zanze, I.; Hajduk, P. J. Kinase-targeted libraries: the design and synthesis of novel, potent, and selective kinase inhibitors. *Drug discovery today* **2009**, *14*, 291-7.
188. Kettle, J. G.; Ward, R. A. Toward the comprehensive systematic enumeration and synthesis of novel kinase inhibitors based on a 4-anilinoquinazoline binding mode. *Journal of chemical information and modeling* **2010**, *50*, 525-33.
189. Baldwin, I.; Bamborough, P.; Haslam, C. G.; Hunjan, S. S.; Longstaff, T.; Mooney, C. J.; Patel, S.; Quinn, J.; Somers, D. O. Kinase array design, back to front: biaryl amides. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 5285-9.

190. Stahura, F. L.; Xue, L.; Godden, J. W.; Bajorath, J. Molecular scaffold-based design and comparison of combinatorial libraries focused on the ATP-binding site of protein kinases. *Journal of molecular graphics & modelling* **1999**, *17*, 1-9, 51-2.
191. Prien, O. Target-family-oriented focused libraries for kinases--conceptual design aspects and commercial availability. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2005**, *6*, 500-5.
192. Brenk, R.; Schipani, A.; James, D.; Krasowski, A.; Gilbert, I. H.; Frearson, J.; Wyatt, P. G. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 435-44.
193. Decornez, H.; Gulyás-Forró, A.; Papp, A.; Szabo, M.; Sármay, G.; Hajdú, I.; Cseh, S.; Dormán, G.; Kitchen, D. B. Design, selection, and evaluation of a general kinase-focused library. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1273-8.
194. Bamborough, P.; Brown, M. J.; Christopher, J. A.; Chung, C. W.; Mellor, G. W. Selectivity of kinase inhibitor fragments. *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54*, 5131-43.
195. Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-Lazikani, B.; Overington, J. P. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic acids research* **2012**, *40*, D1100-7.
196. Dar, A. C.; Lopez, M. S.; Shokat, K. M. Small molecule recognition of c-Src via the Imatinib-binding conformation. *Chemistry & biology* **2008**, *15*, 1015-22.
197. Zask, A.; Verheijen, J. C.; Curran, K.; Kaplan, J.; Richard, D. J.; Nowak, P.; Malwitz, D. J.; Brooijmans, N.; Bard, J.; Svenson, K.; Lucas, J.; Toral-Barza, L.; Zhang, W. G.; Hollander, I.; Gibbons, J. J.; Abraham, R. T.; Ayrál-Kaloustian, S.; Mansour, T. S.; Yu, K. ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin: design and synthesis of highly potent and selective pyrazolopyrimidines. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, 5013-6.
198. Apsel, B.; Blair, J. A.; Gonzalez, B.; Nazif, T. M.; Feldman, M. E.; Aizenstein, B.; Hoffman, R.; Williams, R. L.; Shokat, K. M.; Knight, Z. A. Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 691-9.
199. Martz, K. E.; Dorn, A.; Baur, B.; Schattel, V.; Goettert, M. I.; Mayer-Wrangowski, S. C.; Rauh, D.; Laufer, S. A. Targeting the hinge glycine flip and the activation loop: novel approach to potent p38alpha inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 7862-74.
200. Dalrymple, S. A. p38 mitogen activated protein kinase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* **2002**, *19*, 295-9.
201. Dinarello, C. A. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Current opinion in immunology* **1991**, *3*, 941-8.
202. Feldmann, M.; Brennan, F. M.; Maini, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology* **1996**, *14*, 397-440.

203. Wagner, E. F.; Nebreda, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **2009**, 9, 537-549.
204. Badger, A. M.; Bradbeer, J. N.; Votta, B.; Lee, J. C.; Adams, J. L.; Griswold, D. E. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1996**, 279, 1453-61.
205. Lee, J. C.; Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D.; McNulty, D.; Blumenthal, M. J.; Heys, J. R.; Landvatter, S. W.; et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **1994**, 372, 739-46.
206. Regan, J.; Capolino, A.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Hickey, E.; Kroe, R. R.; Madwed, J.; Moriak, M.; Nelson, R.; Pargellis, C. A.; Swinamer, A.; Torcellini, C.; Tsang, M.; Moss, N. Structure-activity relationships of the p38alpha MAP kinase inhibitor 1-(5-tert-butyl-2-p-tolyl-2H-pyrazol-3-yl)-3-[4-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)naphthalen-1-yl]urea (BIRB 796). *Journal of medicinal chemistry* **2003**, 46, 4676-86.
207. Fischer, S.; Koeberle, S. C.; Laufer, S. A. p38alpha mitogen-activated protein kinase inhibitors, a patent review (2005-2011). *Expert opinion on therapeutic patents* **2011**, 21, 1843-66.
208. Xing, L.; Shieh, H. S.; Selness, S. R.; Devraj, R. V.; Walker, J. K.; Devadas, B.; Hope, H. R.; Compton, R. P.; Schindler, J. F.; Hirsch, J. L.; Benson, A. G.; Kurumbail, R. G.; Stegeman, R. A.; Williams, J. M.; Broadus, R. M.; Walden, Z.; Monahan, J. B. Structural bioinformatics-based prediction of exceptional selectivity of p38 MAP kinase inhibitor PH-797804. *Biochemistry* **2009**, 48, 6402-11.
209. Liu, C.; Lin, J.; Wroblewski, S. T.; Lin, S.; Hynes, J.; Wu, H.; Dyckman, A. J.; Li, T.; Wityak, J.; Gillooly, K. M.; Pitt, S.; Shen, D. R.; Zhang, R. F.; McIntyre, K. W.; Salter-Cid, L.; Shuster, D. J.; Zhang, H.; Marathe, P. H.; Doweiko, A. M.; Sack, J. S.; Kiefer, S. E.; Kish, K. F.; Newitt, J. A.; McKinnon, M.; Dodd, J. H.; Barrish, J. C.; Schieven, G. L.; Leftheris, K. Discovery of 4-(5-(cyclopropylcarbonyl)-2-methylphenylamino)-5-methyl-N-propylpyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazine-6-carboxamide (BMS-582949), a clinical p38alpha MAP kinase inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, 53, 6629-39.
210. Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 717-26.
211. Koeberle, S. C.; Romir, J.; Fischer, S.; Koeberle, A.; Schattel, V.; Albrecht, W.; Grütter, C.; Werz, O.; Rauh, D.; Stehle, T.; Laufer, S. A. Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nat Chem Biol* **2012**, 8, 141-3.
212. Fischer, S.; Wentsch, H. K.; Mayer-Wrangowski, S. C.; Zimmermann, M.; Bauer, S. M.; Storch, K.; Niess, R.; Koeberle, S. C.; Grütter, C.; Boeckler, F. M.; Rauh, D.; Laufer, S. A. Dibenzosuberones as p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors with Low ATP Competitiveness and Outstanding Whole Blood Activity. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, 56, 241-53.

213. Fitzgerald, C. E.; Patel, S. B.; Becker, J. W.; Cameron, P. M.; Zaller, D.; Pikounis, V. B.; O'Keefe, S. J.; Scapin, G. Structural basis for p38alpha MAP kinase quinazolinone and pyridol-pyrimidine inhibitor specificity. *Nature structural biology* **2003**, *10*, 764-9.
214. Lee, M. R.; Dominguez, C. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. *Current medicinal chemistry* **2005**, *12*, 2979-94.
215. Koeberle, S. C.; Fischer, S.; Schollmeyer, D.; Schattel, V.; Grütter, C.; Rauh, D.; Laufer, S. A. Design, synthesis, and biological evaluation of novel disubstituted dibenzosuberones as highly potent and selective inhibitors of p38 mitogen activated protein kinase. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 5868-77.
216. Simard, J. R.; Grütter, C.; Pawar, V.; Aust, B.; Wolf, A.; Rabiller, M.; Wulfert, S.; Robubi, A.; Klüter, S.; Ottmann, C.; Rauh, D. High-throughput screening to identify inhibitors which stabilize inactive kinase conformations in p38alpha. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 18478-88.
217. Pargellis, C.; Tong, L.; Churchill, L.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Grob, P. M.; Hickey, E. R.; Moss, N.; Pav, S.; Regan, J. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nature structural biology* **2002**, *9*, 268-72.
218. De Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T. Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) reagents for thiols. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5077-5080.
219. Friedman, M.; Cavins, J. F.; Wall, J. S. Relative nucleophilic reactivities of amino groups and mercaptide ions in addition reactions with α,β -unsaturated compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3672-82.
220. Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* **1999**, *4*, 67-73.
221. Sos, M. L.; Michel, K.; Zander, T.; Weiss, J.; Frommolt, P.; Peifer, M.; Li, D.; Ullrich, R.; Koker, M.; Fischer, F.; Shimamura, T.; Rauh, D.; Mermel, C.; Fischer, S.; Stuckrath, I.; Heynck, S.; Beroukhim, R.; Lin, W.; Winckler, W.; Shah, K.; LaFramboise, T.; Moriarty, W. F.; Hanna, M.; Tolosi, L.; Rahnenfuhrer, J.; Verhaak, R.; Chiang, D.; Getz, G.; Hellmich, M.; Wolf, J.; Girard, L.; Peyton, M.; Weir, B. A.; Chen, T. H.; Greulich, H.; Barretina, J.; Shapiro, G. I.; Garraway, L. A.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Meyerson, M.; Wong, K. K.; Thomas, R. K. Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* **2009**, *119*, 1727-40.
222. Henze, J.; Mühlenberg, T.; Simon, S.; Grabellus, F.; Rubin, B.; Taeger, G.; Schuler, M.; Treckmann, J.; Debiec-Rychter, M.; Taguchi, T.; Fletcher, J. A.; Bauer, S. p53 modulation as a therapeutic strategy in gastrointestinal stromal tumors. *PloS one* **2012**, *7*, e37776.
223. Nakatani, H.; Kobayashi, M.; Jin, T.; Taguchi, T.; Sugimoto, T.; Nakano, T.; Hamada, S.; Araki, K. STI571 (Glivec) inhibits the interaction between c-KIT and heat shock protein 90 of the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1. *Cancer science* **2005**, *96*, 116-9.

224. Mühlenberg, T.; Zhang, Y.; Wagner, A. J.; Grabellus, F.; Bradner, J.; Taeger, G.; Lang, H.; Taguchi, T.; Schuler, M.; Fletcher, J. A.; Bauer, S. Inhibitors of deacetylases suppress oncogenic KIT signaling, acetylate HSP90, and induce apoptosis in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* **2009**, *69*, 6941-50.
225. Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols* **2006**, *1*, 1112-6.
226. Duensing, A.; Medeiros, F.; McConarty, B.; Joseph, N. E.; Panigrahy, D.; Singer, S.; Fletcher, C. D.; Demetri, G. D.; Fletcher, J. A. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* **2004**, *23*, 3999-4006.
227. Rubin, B. P.; Singer, S.; Tsao, C.; Duensing, A.; Lux, M. L.; Ruiz, R.; Hibbard, M. K.; Chen, C. J.; Xiao, S.; Tuveson, D. A.; Demetri, G. D.; Fletcher, C. D.; Fletcher, J. A. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* **2001**, *61*, 8118-21.
228. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **1993**, *26*, 795-800.
229. Seeliger, M. A.; Nagar, B.; Frank, F.; Cao, X.; Henderson, M. N.; Kuriyan, J. c-Src binds to the cancer drug imatinib with an inactive Abl/c-Kit conformation and a distributed thermodynamic penalty. *Structure* **2007**, *15*, 299-311.
230. Brünger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; DeLano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J. S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1998**, *54*, 905-21.
231. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-32.
232. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1997**, *53*, 240-55.
233. Schüttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 1355-63.
234. Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283-291.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für die breit gefächerte und interessante Aufgabenstellung danken, die mir während der Zeit der Dissertation die Anwendung einer großen Anzahl unterschiedlichster wissenschaftlicher Methoden ermöglichte und mich immer wieder forderte. Auch Prof. Dr. Herbert Waldmann möchte ich meinen Dank für die Übernahme des Koreferats sowie der Möglichkeit Ressourcen seines Arbeitskreises zu nutzen aussprechen.

Retrospektiv betrachtet haben viele meiner Laborkollegen während der Zeit der Promotion einen bleibenden Eindruck hinterlassen, so dass ich auf die zurückgelegten Jahre der Promotion stets mit Freude zurückblicke. Angefangen mit Matthäus Getlik, der mir zu Beginn der Arbeit immer wieder wissenschaftlichen Input gab, aber auch außerhalb des Labors ein guter Freund war und auch heute noch ist. Jeffrey Simard und Haridas Rode konnten mich ebenfalls in hilfreichen Gesprächen oft voranbringen und waren neben der wissenschaftlichen Arbeit auch immer für gesellige Abende zu haben. Meinen aktuellen Laborkollegen und denen, die schon weiter gezogen sind, sei ebenfalls gedankt für die allzeit gute Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei Zhizhou Fang, der nahezu zeitgleich mit der Promotion begann und mich auf vielen Wegen begleitete, sei es zu Konferenzen, Vorträgen oder einfach nur auf dem Weg in die Mensa. Ihm sowie Björn Over, Hanna Bruss und Svenja Mayer-Wrangowski möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen hilfreichen Kommentare danken.

Ein weiterer Dank gilt den Organisatoren *International Max-Planck Research School* Christa Hornemann, Dr. Waltraud Hofmann-Goody sowie dem Repräsentanten Prof. Dr. Martin Engelhard. Die Veranstaltungen der IMPRS gaben mir auf wissenschaftlicher Seite immer einen Einblick in Themengebiete, die mich „über den Tellerrand hinaus“ blicken ließen. Auch für die finanzielle Förderung zur Teilnahme an Konferenzen möchte ich mich bedanken.

Für die Unterstützung und den Zuspruch über all die Jahre der Promotion möchte ich mich bei meiner Freundin Verena bedanken, die mir auch in schweren Zeiten, die zweifellos jeder Wissenschaftler durchmacht, immer ein starker Rückhalt war. Zu guter Letzt geht der größte Dank an meine Eltern und meine Familie ohne deren Unterstützung das Studium wohl nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

André Richters

Dortmund, Mai 2013