

Design, Synthese und massenspektrometrische Analyse kovalenter und kovalent- reversibler Kinaseinhibitoren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie und chemischen Biologie der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Steven Smith

aus Darmstadt (Hessen)

Dortmund 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
 2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer
-

Vergiss nicht, die Macht wird mit dir sein; immer.

-Obi-Wan Kenobi

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. D. Rauh in der Zeit vom 02.09.2013 bis 06.10.2017 im Fachbereich Medizinische Chemie und chemische Biologie in der Fakultät Chemie und chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Steven Smith, Marina Keul, Julian Engel, Debjit Basu, Simone Eppmann & Daniel Rauh. Characterization of Covalent-Reversible EGFR Inhibitors. *ACS Omega*, **2017**, *2*, 1563–1575.

Julian Engel*, **Steven Smith***, Jonas Lategahn, Hannah L. Tumbrink, Lisa Goebel, Christian Becker, Elisabeth Hennes, Marina Keul, Anke Unger, Heiko Müller, Matthias Baumann, Carsten Schultz-Fademrecht, Georgia Günther, Jan G. Hengstler & Daniel Rauh. Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in EGFR. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60* (18), 7725-7744.

Niklas Uhlenbrock*, **Steven Smith***, Jörn Weisner, Rebekka Scheinpflug, Rajesh Gontla, Laura Depta & Daniel Rauh. Covalent-Allosteric Inhibitors in Complex with Akt. In Vorbereitung.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden die Bachelorarbeiten von Frau Lisa Goebel (2014) und Frau Elisabeth Hennes (2014), sowie die Masterarbeit von Herrn Niklas Uhlenbrock (2015). Ergebnisse, die übernommen wurden sind entsprechend gekennzeichnet.

* geteilte Erstautorschaft

Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh für die interessante Aufgabenstellung, die durchweg gute Betreuung während meiner Dissertation und die Bereitstellung der nötigen Ressourcen danken. Herrn Prof. Dr. Daniel Summerer möchte ich für die Übernahme des Koreferats meinen Dank aussprechen.

Meinen aktuellen sowie allen ehemaligen Kollegen aus der AG Rauh danke ich für die stets gute Zusammenarbeit und auch für die schöne Zeit abseits des Laboralltags. Egal ob in den Kaffeeräumen, Laboren, Büros oder den Stadien und Kneipen in und um Dortmund; es war mir eine Freude Zeit mit Euch zu verbringen. Vielen Dank: Becker, André, Svenja, Jonas, Julia, Eberhardt, Luke, Julian, Rajesh, Debjit, Anagram L. Dutt, Mike, Niklas, Marius, Lena, Helnana, Bianca, Matthias, Lisa, Marina, Jörn, Patrik, Jasmin, Philip, Roberta und Ina. Ein besonderer Dank geht hierbei auch an unsere ‚Helfer im Hintergrund‘, egal ob im Labor durch Simone Eppmann und Andreas Arndt oder im Büro durch Martina Reibner, Petra Alhorn und seit Kurzem Ulrich Schoppe und Maria Sergani – ohne eure Unterstützung wäre unsere Arbeit nicht möglich.

Meinen ehemaligen Studenten Elisabeth Hennes, Lisa Goebel, Niklas Uhlenbrock und Laura Depta danke ich für die Arbeit die sie auf den verschiedensten Projekten geleistet haben.

Für die Erhebung der biochemischen und zellulären Daten gilt mein besonderer Dank Marina, Jörn, Ina, Simone, Jonas und Anagram. Weiterhin gilt mein Dank Dr. Petra Janning und Jens Warmers bei der Hilfe zu allen Fragen rund um MS-Messungen und LC-MS-Geräte.

André Richters und Svenja Mayer-Wrangowski möchte ich hier nochmal für die kritische Durchsicht meiner Arbeit in ihrer Gänze danken. Jörn, Jonas und Marina danke ich für die hilfreichen Anmerkungen zu einzelnen Abschnitten.

Tobi, Topha, Simm, Mark und Tretzel danke ich viel zu wenig, dass sie schon seit so vielen Jahren meine engsten Freunde sind.

Für ihr Verständnis, ihre bedingungslose Unterstützung und vor allem ihrer Liebe danke ich von ganzem Herzen meiner Freundin Denise. Ich kann dir gar nicht genug danken, dass du immer hinter mir stehst.

Meiner Familie, egal ob Heyer, Zöller, Simpson oder Kowalczyk – danke für alles. Der größte Dank gilt hierbei meinen Eltern, Richard und Hilde, ohne Eure Unterstützung und Euren Rückhalt wäre das alles nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
Kurzfassung	ix
Abstract	xi
1. Einleitung	1
1.1 Posttranslationale Proteinmodifikation	1
1.2 Kovalente Modifikationen von Proteinen durch Inhibitoren in der Medizinischen Chemie... 4	
1.2.1 Bedenken bei der Verwendung kovalent-modifizierender Inhibitoren	8
1.2.2 Messbare Parameter zur Charakterisierung kovalenter Inhibitoren.....	10
1.2.3 Entwicklung und Optimierung kovalenter Inhibitoren	13
1.3 Kovalent-reversible Inhibitoren	16
1.3.1 Charakterisierung der Bindungszustände kovalent-reversiblen Inhibitoren.....	17
1.4 Massenspektrometrie	18
2. Zielsetzung	23
3. Ergebnisse	25
3.1 EGFR-Inhibitoren	25
3.1.1 Aufbau EGFR und zielgerichtete Wirkstofftherapie	25
3.1.2 Strukturbasiertes Design der Zielverbindungen.....	29
3.1.3 Synthese der Wirkstoffbibliothek	33
3.1.4 Biochemische Charakterisierung der kovalenten EGFR-Inhibitoren.....	40
3.1.5 Auswahl und Synthese der kovalent-reversiblen EGFR-Inhibitoren.....	44
3.1.6 Biochemische Charakterisierung der kovalent-reversiblen EGFR-Inhibitoren	46
3.1.7 Zelluläre Charakterisierung einer Auswahl von EGFR-Inhibitoren.....	53
3.1.8 Profilierung von 24d.....	56
3.1.9 Methodenentwicklung MS	58
3.2 Akt-Inhibitoren	63

3.2.1	Besonderheiten des Aufbaus von Akt	63
3.2.2	Design und Synthese neuartiger allosterischer PH-Domänen abhängiger Akt-Inhibitoren	67
3.2.3	Biochemische Charakterisierung neuartiger Pyrrolo-[2,3- <i>d</i>]-pyrimidin Akt-Inhibitoren	84
3.2.4	Naphthyridon-basierte Inhibitoren	87
3.2.5	Biochemische Charakterisierung der 1,6-Naphthyridon-basierten Akt-Inhibitoren	104
3.2.6	Zelluläre Charakterisierung der 1,6-Naphthyridon-basierten Akt-Inhibitoren.....	107
4.	Zusammenfassung und Ausblick	111
5.	Experimenteller Teil.....	115
5.1	Allgemeine Anmerkungen	115
5.2	Massenspektrometrie zum Nachweise kovalent-reversibler Modifikation	116
5.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	117
5.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 1: Suzuki-Kreuzkupplung	117
5.3.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2: TFA Boc-Entschützung von Aminen.....	117
5.3.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3: Amidkupplung mit Acryolyl- oder Propionylchlorid	118
5.3.4	Allgemeine Arbeitsvorschrift 4: Amidkupplung mit 2-Cyanoessigsäure.....	118
5.3.5	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5: Kondensation mit Cyclopropancarboxaldehyd	118
5.3.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift 6: Amidkupplung mit Benzoesäurederivaten	118
5.3.7	Allgemeine Arbeitsvorschrift 7: HCl Boc-Entschützung von Aminen	119
5.3.8	Allgemeine Arbeitsvorschrift 8: LEUCKART-WALLACH Kupplung	119
5.3.9	Allgemeine Arbeitsvorschrift 9: Reduktion von Nitro- zu Aminverbindungen.....	119
5.4	Synthesen	120
	Literaturverzeichnis	179
	Eidesstattliche Versicherung	195
	Anhang	I
	Lebenslauf	III

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abl	<i>abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ACN	Acetonitril
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BOC	<i>tertiär</i> -Butyloxycarbonyl
BOM	Benzyloxymethylacetal
BTK	Bruton's Tyrosinkinase
BuLi	Butyllithium
bzw.	beziehungsweise
c	Stoffmengenkonzentration
CAI	kovalent-allosterische Inhibitoren
CRI	<i>covalent-reversible Inhibitor</i>
d	Tage
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxynukleinsäure
e.g.	<i>exempli gratia</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
eq.	Äquivalent/e

ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
EWG	<i>electron withdrawing group</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HCV	Hepatitis C Virus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPV	humane Papillomaviren
HTRF	<i>homogenous time-resolved fluorescence</i>
Hz	Hertz
iFLiK	<i>interface-Fluorescent Labels in Kinases</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
kcal	Kilokalorien
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
LM	Lösemittel
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	mol/L
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol

MetAP2	Methioninaminopeptidase-2
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PH	Pleckstrin Homologie
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
PTM	posttranslationale Proteinmodifikation
PYMPO	1-(3-(Succinimidylloxycarbonyl)benzyl)-4-(5-(4-Methoxyphenyl)oxazol-2-yl)-pyridiniumbromid
R	Rest
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed-phase</i>
rt	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
sek	Sekunde
SAR	Struktur-Aktivitätsbeziehung
SQCL	Plattenepithelkarzinom
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid

<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	<i>time of flight</i>
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
u. a.	unter anderem
VE	voll entsalzt
vgl.	vergleiche
vs.	versus
W	Watt
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
δ	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

Kurzfassung

In der zielgerichteten Krebstherapie stellt die erworbene Resistenz gegen Wirkstoffe eine der grundlegenden Herausforderungen dar. So können Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, hervorgerufen durch eine Punktmutation (L858R) in EGFR, oft erfolgreich durch die reversiblen Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib behandelt werden. Mit fortlaufender Behandlung zeigen die Patienten jedoch meist eine dramatische Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes. Dieser Rückfall wird durch eine erworbene Punktmutation der Türsteheraminosäure (T790M) in EGFR hervorgerufen und ist zum Großteil auf den erhöhten Dissoziationsgrad der reversiblen Inhibitoren zurückzuführen. Um diesen Prozess zu umgehen, wurden neue Grundgerüste zur Inhibition dieser EGFR-Mutante entwickelt, die sich durch eine maximale Verweildauer im aktiven Zentrum des Proteins auszeichnen. Kovalente EGFR-Inhibitoren, ausgestattet mit einem Michael-Akzeptor, adressieren ein spezifisches Cystein (Cys797) am Ende der α Helix-D am Rande der ATP-Bindetasche und zeichnen sich durch eine minimale Dissoziationsrate aus. Inhibitoren wie WZ4002 und Osimertinib zeigten bereits ein großes Potential diese Wirkstoffresistenz (EGFR^{T790M}) durch kovalente Inhibition zu umgehen. Nach sehr erfolgreichen klinischen Studien mit einem minimalen Nebenwirkungsprofil, erhielt Osimertinib unter dem Handelsnamen Tagrisso 2015 die Marktzulassung der FDA.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten EGFR-Inhibitoren basierend auf dem bereits im Arbeitskreis etablierten Aminopyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidin-Grundgerüst synthetisiert werden, um ein präziseres Bild der Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Substanzklasse zu gewinnen. Durch die Synthese und biochemische Evaluierung von zehn neuartigen, kovalenten EGFR Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass eine Substitution mit raumgreifenden Gruppen in der 3-Position des Grundgerüsts für eine potente Inhibition von EGFR^{L858R/T790M} sowie eine ausreichende Selektivität gegenüber dem EGFR^{WT} notwendig ist.

Durch Derivatisierung des Michael-Akzeptors wird es möglich Inhibitoren zu entwickeln, welche einen kovalent-reversiblen Bindungsmodus aufweisen. Diese kovalent-reversiblen Inhibitoren (CRI) zeichnen sich durch eine schnelle Addition an nukleophile Gruppen (z. B. Thiole) aus. Die dabei entstehende kovalente Bindung löst sich jedoch unter proteolytischen Bedingungen. Durch gezielte Auswahl der Derivatisierung am Michael-Akzeptor lassen sich maßgeschneiderte Modulationen der Verweilzeit der Inhibitoren am Protein erreichen. Zurzeit befindet sich die Entwicklung von CRIs in der Wirkstoffforschung noch in ihren Anfängen. Erste Ergebnisse zeigen aber vielversprechende Lösungsansätze für die mit kovalenten Inhibitoren assoziierten Probleme der Toxizität und promiskuitiver Bindung. Durch Modifikation der oben beschriebenen Pyrazolopyrimidine wurden kovalent-reversible Inhibitoren synthetisiert, um diese für die genauere Charakterisierung des kinetischen Mechanismus der CRIs zu nutzen. Des Weiteren wurde das Potential für die Inhibition

der EGFR^{T790M}-Mutation untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Entwicklung eines schnellen MS-basierten Experiments gelegt, welches die kovalent-reversible Bindung dieser Verbindungsklasse illustrieren kann. Die Entwicklung und Etablierung dieses experimentellen Aufbaus konnte erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CRIs durch klassische kovalente Inhibitoren während des MS-Experiments verdrängt werden konnten, was wiederum als ein Nachweis für die reversiblen Bindungseigenschaften der im Protein gebundenen CRIs diente. Durch diese Beobachtungen konnte die bisherigen Hypothesen zu den Bindungseigenschaften und Reversibilität von CRIs in Proteinen erweitert werden.

Die Ser/Thr-Kinase Akt (auch Proteinkinase B/PKB) konnte als ein zentraler Knotenpunkt in einigen Signaltransduktionskaskaden identifiziert werden. Die nachgeschalteten Signalwege spielen eine wichtige Rolle in den verschiedensten Zellfunktionen, wie z. B. Proliferation, Zellwachstum und Apoptose. Des Weiteren konnte eine Fehlregulation oder Überexpression von Akt in einer Vielzahl von Krebsarten nachgewiesen werden. Neben der stark konservierten Kinasedomäne besitzt Akt eine zusätzliche PH-Domäne. Diese nur schwach konservierte Domäne spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität von Akt. Durch eine flexible Scharnierregion ist es Akt möglich zwei distinkte Konformationen einzunehmen. In der geschlossenen Konformation blockiert die PH-Domäne die ATP-Bindungstasche der Kinasedomäne, sodass Akt in einem inaktiven Zustand vorliegt. Durch die Entwicklung von Inhibitoren, die in diese Interdomänen-Region binden, ist es möglich Akt in der inaktiven Konformation zu fixieren und ausgesprochen selektive Akt-Inhibitoren zu entwickeln. In früheren Veröffentlichungen wurde eine neue Klasse von kovalenten Inhibitoren entwickelt, welche selektiv Cystein-Reste (Cys296 und Cys310) in der inaktiven Konformation adressieren. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Optimierung der etablierten Syntheseroute durchgeführt. Im Besonderen für die Ringschlussreaktion des bityklischen Grundgerüsts und der reduktive Aminierung zur Verknüpfung der beiden Molekülhälften wurde nach Verbesserungen gesucht. Es war uns möglich die FRIEDLÄNDER Cycloaddition zu optimieren, indem die Entschützung der Boc-Schutzgruppe nach TOM *in situ* im stark basischen Milieu während der Ringschlussreaktion durchgeführt wurde. Durch eine Änderung der Reaktionsbedingungen der reduktiven Aminierung zu klassischen LEUCKART-WALLACH-Bedingungen konnte auch hier eine deutliche Optimierung dieses kritischen Reaktionsschritts erreicht werden. Durch jene Änderungen in der Syntheseroute wurde es möglich, eine fokussierte Bibliothek an kovalenten Akt-Inhibitoren herzustellen, welche eine genauere Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehung erlaubt.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit neuartige Akt-Inhibitoren synthetisiert, welche auf einer in einer Durchmusterung mehrerer kommerziell erworbener Substanzbibliotheken gefundenen Grundstruktur basiert. Die Resynthese dieser Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidine konnte erfolgreich durchgeführt werden und erlaubte eine weiterführende biochemische Charakterisierung.

Abstract

Acquired drug resistance is a major bottleneck in targeted cancer therapies. Cancer patients that suffer from non-small cell lung cancer (NSCLC) caused by a point mutation (L858R) in EGFR (epidermal growth factor receptor), exhibit a dramatic relapse, which is caused by secondary drug resistance mutations. The first-line treatment with erlotinib and gefitinib proves ineffective because of the newly acquired gatekeeper mutation (T790M), which increases the off-rate of the conventional reversible inhibitors. Therefore the development of new drug scaffolds with a minimal off-rate and a maximal drug-target residence time are of utmost importance. Covalent EGFR inhibitors are often equipped with Michael-acceptors that target a unique cysteine (Cys797) located at the lip of the ATP binding site. Some of these inhibitors including WZ4002 and osimertinib have shown great potential in overcoming drug resistance in EGFR^{T790M}. In fact, osimertinib showed excellent results in clinical trials as well as a reduced on-target toxicity and was therefore approved by the FDA. Building on previously developed inhibitors, we set out to elucidate the more complete SAR of the pyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidine derivatives. We were able to develop ten novel covalent EGFR inhibitors that showed inhibitory activity in accordance with our hypothesis that bulky substituents at the 3-Position are necessary for a good activity and selectivity profile.

Within the spectrum of kinase inhibitors, covalent-reversible inhibitors (CRI) represent another class of interesting inhibitors that can be optimized for extended drug-target residence time. For CRIs it was shown that the fast addition of thiols to electron-deficient olefins leads to a covalent bond that can break reversibly under proteolytic conditions. Although CRIs are considered tool compounds at this point, they might very well develop into innovative therapeutics to overcome some of the problems associated with conventional covalent inhibitors, such as toxicity or off-target activity.

To study this novel binding mode we used the previously described pyrazolopyrimidine based core motif, which was extensively studied in our group. We aim towards a better understanding of the kinetic mechanisms of CRIs and to investigate their potential in targeting EGFR^{T790M} in *in vitro* systems. We set out to design, synthesize and test compounds that can address Cys797 in drug resistant EGFR^{T790M} with an electron-deficient olefin. In the scope of the project we focused on the development of an efficient way to investigate the covalent and reversible properties of the CRIs in one universally applicable experiment. We were able to show that it is possible to displace CRIs with a classical covalent inhibitor in MS-Experiments and therefore proving the reversible property of the covalent-reversible inhibitors.

The Ser/Thr Kinase Akt (Protein Kinase B/PKB) is identified as a central switch in cellular signal transduction pathways. Its downstream signaling is liable for e.g. cell proliferation, cell growth and

apoptosis. Considering the crucial role of Akt, its dysregulation or overexpression is found in various cancers, such as breast, NSC-/SQCL- or gastric cancer.

The kinase domain of Akt shares a high structural homology over the whole kinome. A flexible, regulatory domain called pleckstrin homology or PH domain is found at the N-terminus. This domain is poorly conserved and has no considerable homology in other proteins. This region plays a pivotal role in the activation mechanism of Akt. Due to the flexibility of the linker region, Akt can adopt an open or closed conformation. In the closed conformation the ATP-binding pocket is completely blocked and the kinase resides in an inactive state. In recent years a novel class of inhibitors has been developed and characterized, which specifically target the interdomain linker region in Akt and locks it in the inactive conformation. This special inhibition mode holds a high potential for selective drugs that are able to specifically modulate the kinase. Our group was able to establish a novel class of covalent allosteric kinase inhibitors (CAIs) that lock Akt in its inactive conformation.

Starting from an established synthetic route, we set out to optimize the key steps to increase the overall yields and streamline the reaction. Namely, the FRIEDLAENDER reaction to generate the bicyclic core motif of the desired naphthyridones as well as the following reductive amination. To optimize the reaction we took advantage of the possibility to switch from acidic to basic conditions in the cyclocondensation, without a considerable decrease in yields. Additionally, we adapted a Deprotection of the primary Boc under basic conditions as reported by TOM. Now it was possible to generate the primary amine *in situ* during the base catalyzed cyclocondensation. Another key step in the original synthesis was the sodium triacetoxyborohydride mediated reductive amination. By switching to classical LEUCKART-WALLACH reaction conditions, it was possible to increase yields and make the coupling more reliable for a broad range of secondary amines. This enabled us to build up a set of compounds to investigate the SAR.

In an extensive screening of various libraries a variety of small molecules were found that were able to bind in the interdomain area of Akt. To verify these initial hits we set out to resynthesize a focused library of trisubstituted pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidine derivatives. We were able to synthesize and evaluate a set of 14 inhibitors, which were able to bind in the interdomain are of Akt, but couldn't demonstrate a valuable inhibitory effect on full-length Akt.

In conclusion, we successfully streamlined the complex strategy for the synthesis of naphthyridone based CAIs and were able to build up a set of compounds that will lead to a better understanding of the function of the unique inhibition mode of Akt. Additionally, we were able to generate a focused library of pyrrolopyrimidine based probes that need further optimization and development to serve as valuable Akt inhibitors.

1. Einleitung

Proteine sind äußerst vielseitige Makromoleküle, welche die verschiedensten Funktionen in biologischen Prozessen erfüllen. Ob als Transporter, Speicher für andere Moleküle wie Sauerstoff, der Immunabwehr, als Botenstoffe und noch vieles mehr; Proteine sind essentiell für biologische Prozesse.¹ Während der Proteinbiosynthese wird die genetische Information der DNS oder RNS in Proteine übersetzt (Translation). Jedoch ist die große Vielfalt von Proteinen nicht ausschließlich über die genetische Information zu erklären. Kovalente Modifikationen die nach der Translation stattfinden, auch Posttranslationale Modifikation (PTM) genannt, machen einen Großteil der Vielfältigkeit des Proteoms aus. Unter physiologischen Bedingungen wurden bisher bereits über 300 verschiedene PTMs beschrieben²⁻³, diese Vielzahl von Modifikationen führt im Umkehrschluss zu Tausenden, wenn nicht Millionen möglichen Variationen von Proteinen in biologischen Systemen.⁴

1.1 Posttranslationale Proteinmodifikation

Bis zu 5 % des Genoms von Eukaryoten kodiert Enzyme, die im Zusammenhang mit der Durchführung von PTMs stehen.²⁻³ Durch die Modifikation eines Proteins ist eine Vielzahl an funktionellen Veränderungen möglich. Diese reichen von einer Veränderung der enzymatischen Aktivität oder Änderung der zellulären Lokalisation.⁴ Zudem sind PTMs ein integraler Bestandteil der zellulären Signaltransduktion. Die Modifikation erfolgt hauptsächlich an spezifischen Seitenketten sowie am N- oder C-Terminus des Proteinrückgrats.^{1-2,4-6} Die fünf häufigsten PTMs sind Acylierung, Alkylierung, Glykosylierung, Phosphorylierung und Oxidation.^{3-4,7-10}

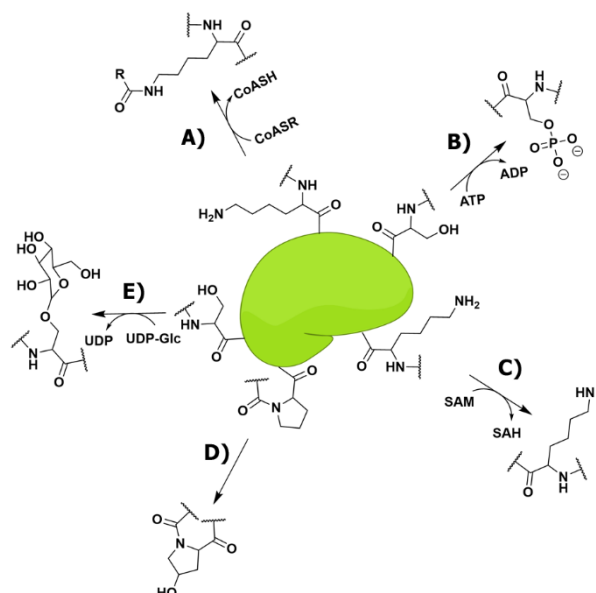


Abbildung 1 Übersicht der fünf häufigsten Arten der kovalenten Modifikation an Proteinseitenketten: Acylierung (A), Phosphorylierung (B) Alkylierung (C), Oxidation (D) und Glykosylierung (E).

Eine besondere Stellung im Zellzyklus nimmt hierbei die PTM von Lysin-Seitenketten mit Ubiquitin über eine Isopeptidbindung ein (Abbildung 2B).¹ Die Ubiquitinierung dient in biologischen Systemen als Abbausignal. Proteine die diese Markierung tragen, werden durch das Proteasom in kleine Peptidfragmente zerlegt und für den neuerlichen Aufbau von Proteinen zur Verfügung gestellt. Ist dieses System gestört, kann es vermehrt zur Entstehung von Tumoren kommen. Beispielsweise entsteht das durch humane Papillomaviren (HPV) ausgelöste Zervixkarzinom durch die Expression von HPV-spezifischen Enzymen, welche den Tumorsuppressor p53 ubiquitinieren und dadurch für den Prozess der zelleigenen Degradation markieren. Die erhöhte Ubiquitinierung des Tumorsuppressors führt zu einem gesteigerten Abbau von p53 und erhöht das Risiko der Tumorentstehung.¹

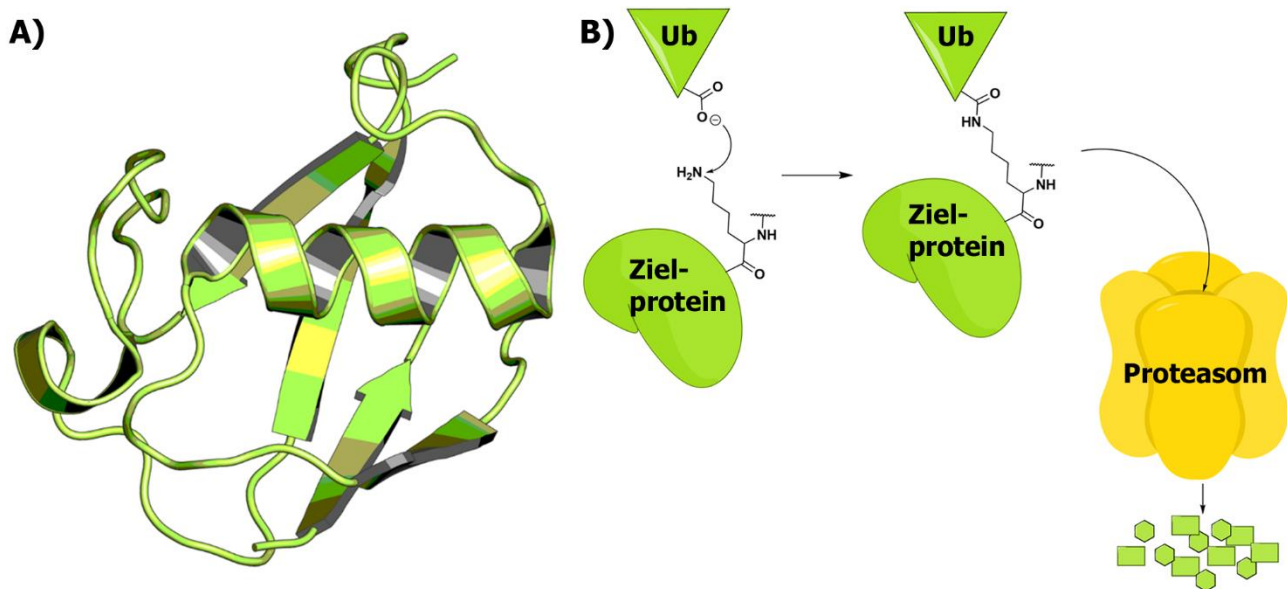


Abbildung 2A) Kristallstruktur von Ubiquitin (PDB: 5xk5), bestehend aus 76 Aminosäuren.¹¹ **B)** Schematische Repräsentation der Markierung eines zum Abbau bestimmten Zielproteins durch Ubiquitin (Ub). Proteine die in dieser Weise mit Ub markiert sind (meist durch mehrfach Ubiquitinierung) werden im Proteasom in ihre Peptidfragmente zerlegt.

Bei der Glykosylierung von Proteinen unterscheidet man drei verschiedene Verknüpfungsarten. Während *N*- und *O*-Glykosylierung in Eukaryoten häufig zu finden ist, spielt die *C*-Glykosylierung hier nur eine untergeordnete Rolle (Abbildung 3).^{1,12} Der intrazelluläre Transport von Proteinen vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat hin zur Zelloberfläche wird vornehmlich über verschiedene Grade der Glykosylierung gesteuert.⁴ Hierbei wird nach der Proteinbiosynthese im ER durch einen komplexen Zyklus von Glykosylierung und Deglykosylierung die korrekte Faltung der Proteine gewährleistet.¹³⁻¹⁴ Während des Deglykosylierung-Reglykosylierungs-Prozesses wird das Protein mit Hilfe von Chaperonen mehrmals gefaltet und entfaltet. Erst nach mehreren Durchläufen dieses Kontrollmechanismus und der korrekten Faltung und Glykosylierung des jeweiligen Proteins, wird im ER die Weiterleitung ins Cytosol vorgenommen.⁴

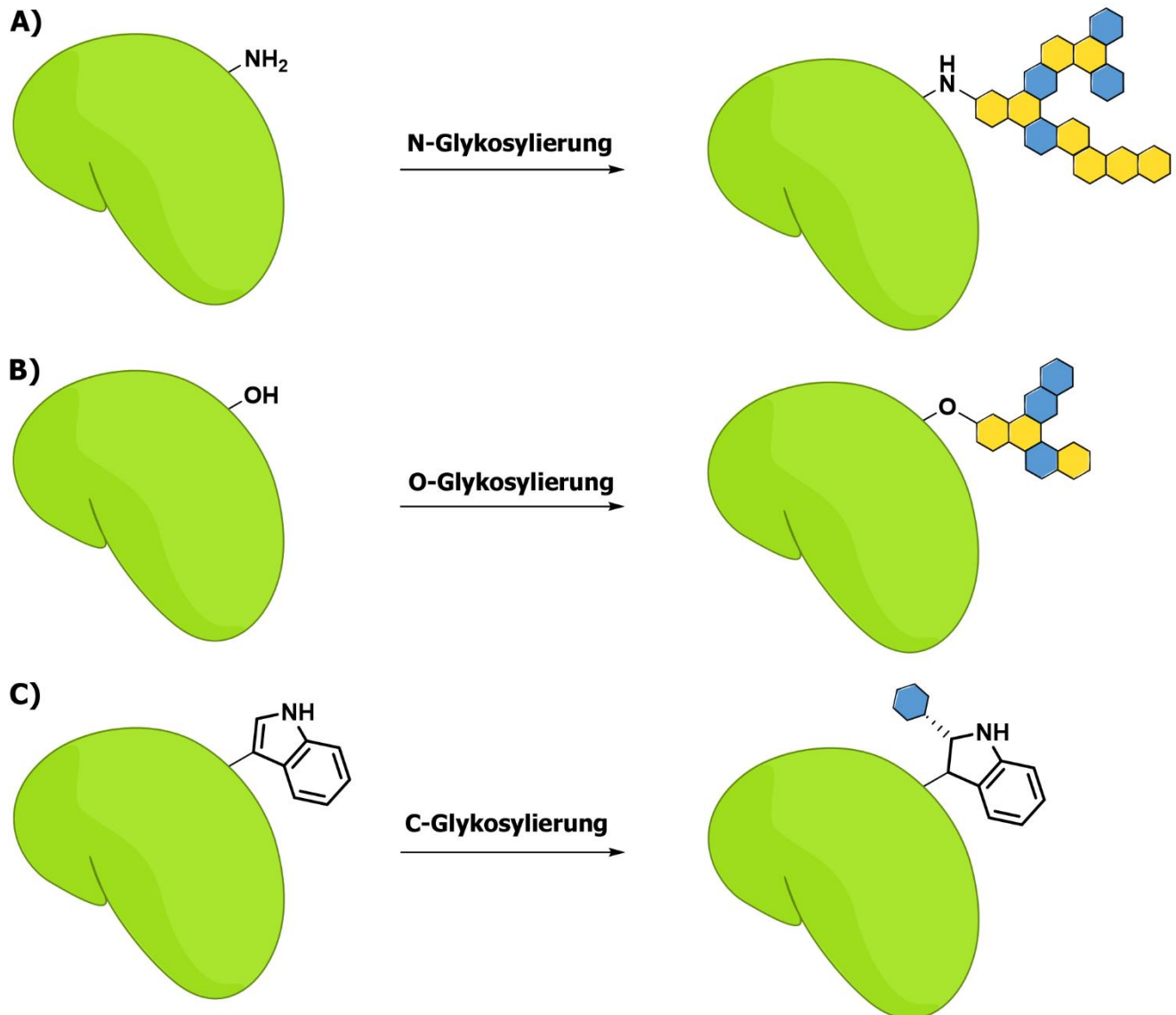


Abbildung 3 Schematische Darstellung der verschiedenen Glykosylierungsformen. **A)** Die *N*-Glykosylierung findet hierbei an Asn und Arg statt, mit Glukose und Galaktose als gängigste Kohlenhydrate. **B)** Die *O*-Glykosylierung kann an den kanonischen Aminosäuren Ser, Thr und Tyr sowie an den nicht-kanonischen Aminosäuren Hyl und Hyp erfolgen. **C)** Die seltene *C*-Glykosylierung findet durch Mannose an der Aminosäureseitenkette von Trp statt.¹⁵

Neben der Glykosylierung wird häufig auch die Addition von Palmitoyl- oder Farnesyl-Gruppen an Proteine zur Regulierung des intrazellulären Transports genutzt.¹ Wird die GTPase Ras an einem spezifischen Cys-Rest mit Palmitoleinsäure modifiziert, wird diese über einen vesikulären Transport vom Cytoplasma hin zur Zellmembran transportiert.¹⁴ Hier kann Ras nun seine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung extrazellulärer Signale in den Zellkern (RAS-RAF-MEK-ERK-Weg) einnehmen.^{4,10,16}

Die am häufigsten vorkommende posttranslationale Modifikation stellt die Phosphorylierung dar (Abbildung 4).¹ Der Grad an Phosphorylierung von Proteinen und damit u. a. deren Aktivität, wird in Zellen durch das Gleichgewicht von Proteinkinasen (Phosphorylierung) und Phosphatasen

(Dephosphorylierung) geregelt. Die besondere Bedeutung der Phosphorylierung in biologischen Systemen lässt sich auch daran verdeutlichen, dass die große Mehrzahl der bekannten Signalkaskaden Kinasen, Phosphatasen oder beide Enzymspezies beinhalten.^{5,17}

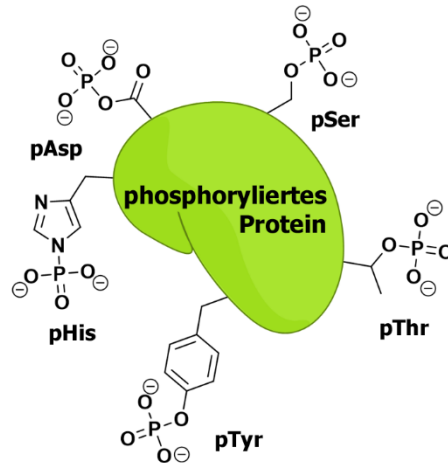


Abbildung 4 Die am häufigsten vorkommenden phosphorylierten Aminosäuren. Im Uhrzeigersinn: phosphoryliertes Serin (pSer), pThr, pTyr, pHis und pAsp.⁴

1.2 Kovalente Modifikationen von Proteinen durch Inhibitoren in der Medizinischen Chemie

Die Synthese von kleinen Molekülen welche mit krankheitsrelevanten Proteinen interagieren ist das zentrale Thema der Medizinischen Chemie. Bisher wurde dies überwiegend über die Maximierung reversibler Wechselwirkungen in der Bindetasche von Enzymen realisiert. Diese Enzym-Inhibitor-Komplexe werden durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen, wie van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder π - π -Wechselwirkungen von Aromaten stabilisiert (Abbildung 5). Die Inhibition eines entsprechenden Enzyms erfolgt demnach reversibel und ist durch ein dynamisches Gleichgewicht gekennzeichnet.¹⁸

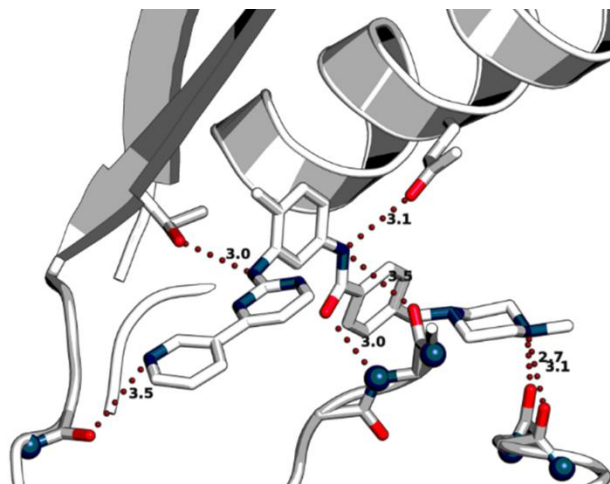


Abbildung 5 Kristallstruktur von Abl im Komplex mit Imatinib (PDB: 2hyy). Die gepunkteten roten Linien repräsentieren die Wasserstoffbrückenbindungen mit den gezeigten Aminosäureseitenketten bzw. dem Peptidrückgrat.

Die Stabilität des Protein-Inhibitor-Komplexes, bzw. die Affinität der beiden Bindungspartner, steht im Zusammenhang mit dem therapeutischen Erfolg eines Inhibitors. Dadurch liegt während der Entwicklung von reversiblen Inhibitoren ein besonderer Fokus auf der Maximierung und Verstärkung der nicht-kovalenten Wechselwirkungen mit dem Zielprotein. Neben den reversiblen Inhibitoren gewinnt die Klasse der kovalenten Inhibitoren zunehmend an Bedeutung.¹⁸⁻¹⁹ Kovalente Inhibitoren erzielen die Inaktivierung des Proteins zusätzlich zu den nicht-kovalenten Wechselwirkungen durch eine kovalente und damit irreversible Bindungen an das Protein. Obwohl viele kovalente Wirkstoffe auf dem Markt sind, war deren Entwicklung bisher meist nicht beabsichtigt.¹⁹ Bei einer großen Anzahl konnte ihre kovalente Wirkweise erst durch späteren Untersuchungen aufgeklärt werden (Abbildung 6). Die Gruppe solcher kovalenter Wirkstoffe umfasst unter anderem Aspirin (Schmerzmittel, Entzündungshemmer), Penicillin (β -Laktam-Antibiotika), die Klasse der Cephalosporine (β -Laktam-Antibiotika) und Fosfomycin (Epoxid-Antibiotika).^{18,20} Wirkstoffe, welche erst durch den körpereigenen Metabolismus kovalent-modifizierende Spezies generieren sind beispielsweise Omeprazol (Protonenpumpen-Inhibitor), Lansoprazol (Protonenpumpen-Inhibitor) sowie Clopidogrel (Antithrombose Medikament).^{18-19,21-22}

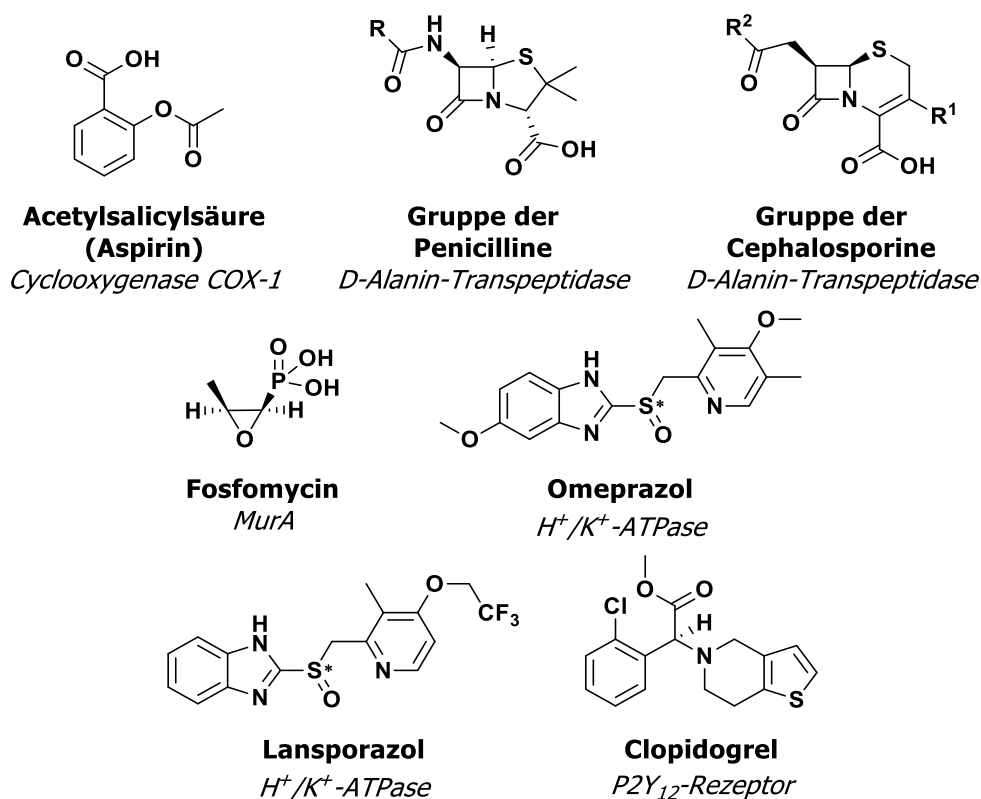


Abbildung 6 Übersicht einiger kovalent-bindender Inhibitoren und deren Zielprotein (kursiv), welche seit Jahrzehnten klinische Anwendung finden.

Aspirin wurde vor mehr als 100 Jahren das erste Mal synthetisiert und im Jahr 2008 alleine ca. 80 Milliarden Mal verabreicht.¹⁹ Die Wirkung bei der Schmerztherapie beruht dabei auf der Inhibition

der Prostaglandin Endoperoxidase Synthase 1 (Cyclooxygenase COX-1).^{19,23-24} Jedoch konnte erst in den 1980er Jahren nachgewiesen werden, dass diese Inhibition auf der kovalenten Acetylierung des katalytischen Serins des Zielenzym beruht.²³⁻²⁴ Die Entdeckung und Nutzung von Penicillin zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen gilt als eine der größten Durchbrüche in der Medizin. Dass die zugrunde liegende Klasse der β -Laktam Antibiotika dies durch eine kovalente Modifikation (unter Ringöffnung des Laktams) des katalytischen Serins der D-Ala-D-Ala Carboxypeptidase (D-Alanin-Transpeptidase) erreichen, konnte erst Jahrzehnte nach der ursprünglichen Entdeckung aufgeklärt werden.^{23,25} Eines der weltweit meistverkauften Medikamente war Ende der 1990er Omeprazol. Omeprazol wird im Körper nach Protonierung des Pyridinrings in 3 Stufen in eine Sulphenamid-Zwischenstufe überführt, welche über Ausbildung einer Disulfidbrücke die Protonen-Kalium-Pumpe (H^+/K^+ -ATPase) kovalent inhibiert.²⁶

Auch konnten in der Natur mehrere kovalent-modifizierende Substanzen identifiziert werden, welche jedoch zu einem Großteil stark cytotoxisch sind; u. a. Lipstatin (Inhibitor der Pankreaslipase aus *Actinobacterium Streptomyces toxytricini*)²⁷, Fumagillin (Anti-Infektiva, Inhibitor der Methioninaminopeptidase-2 (MetAP2) aus *Aspergillus fumigatus*)²⁸ und Microcystin (Hepatotoxin aus Cyanobakterien).²⁹

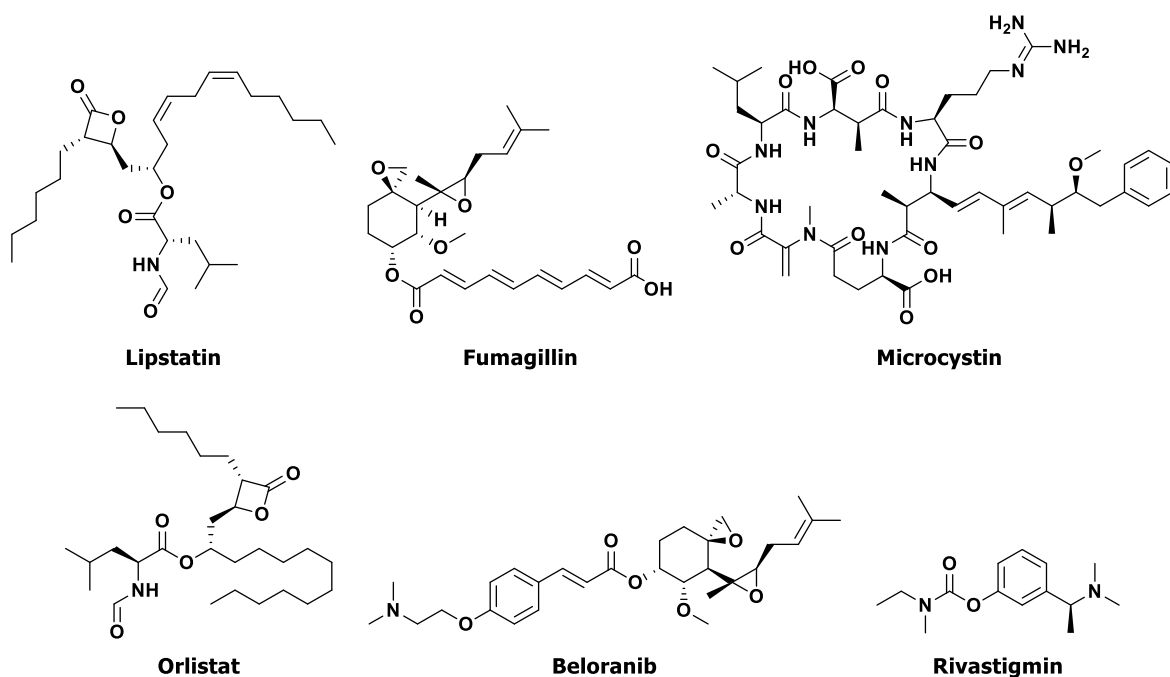


Abbildung 7 Auswahl von natürlich vorkommenden kovalent bindenden Verbindungen (oben) und aus Naturstoffen entwickelten Wirkstoffe (unten).

Mittlerweile wurden einige von diesen als Startpunkt für medizinisch-chemische Entwicklungen genutzt, was zu einer Vielzahl von naturstoffinspirierten Wirkstoffen führte, die selektiv an ein Zielprotein binden und nicht mehr die starke Toxizität der korrespondierenden parentalen

Verbindungen aufweisen. Beispiele hierfür sind die in Abbildung 7 gezeigten Orlistat (Pankreaslipasehemmer)³⁰ zur Behandlung von Adipositas, Beloranib (Inhibitor der MetAP2 zur Behandlung von Adipositas) und Rivastigmin (Inhibitor der Acetylcholinesterase (AChE) zur Behandlung von Alzheimer Demenz und Parkinson)³¹. Es bleibt festzuhalten, dass trotz einer Vielzahl von natürlich vorkommenden kovalent-modifizierenden Verbindungen und bekannten kovalenten Wirkstoffen, die strukturgetriebene Entwicklung von kovalenten Inhibitoren ein sehr junger Bereich in der Medizinischen Chemie darstellt.¹⁹ Dabei bieten kovalente Wirkstoffe unterschiedliche Vor- und Nachteile (siehe Abschnitt 1.2.1). Insbesondere dann, wenn eine nachhaltige Belegung des aktiven Zentrums des zu adressierenden Proteins von Nöten ist, können kovalente Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Dies ist vor allem bei der Behandlungen von Krankheiten wie Krebs und bakteriellen Entzündungen der Fall.²³

ROBERTSON *et al.* konnten zeigen, dass ein Drittel der zugelassenen Wirkstoffe über einen kovalenten Bindungsmodus verfügen (vgl. Abbildung 8).³² Die Bandbreite von Indikationen, welche schon erfolgreich mit 39 von der FDA genehmigten kovalenten Inhibitoren behandelt werden, reicht von Krebs über anti-bakterielle und gastrointestinale Anwendungen bis hin zu Anwendungen im zentralen Nervensystem. Hierbei konnten auch bei längerer Einnahme von kovalenten Inhibitoren keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet werden, was für die sichere und beschwerdefreie Einnahme bei chronischen Krankheiten von besonderer Bedeutung ist.¹⁹

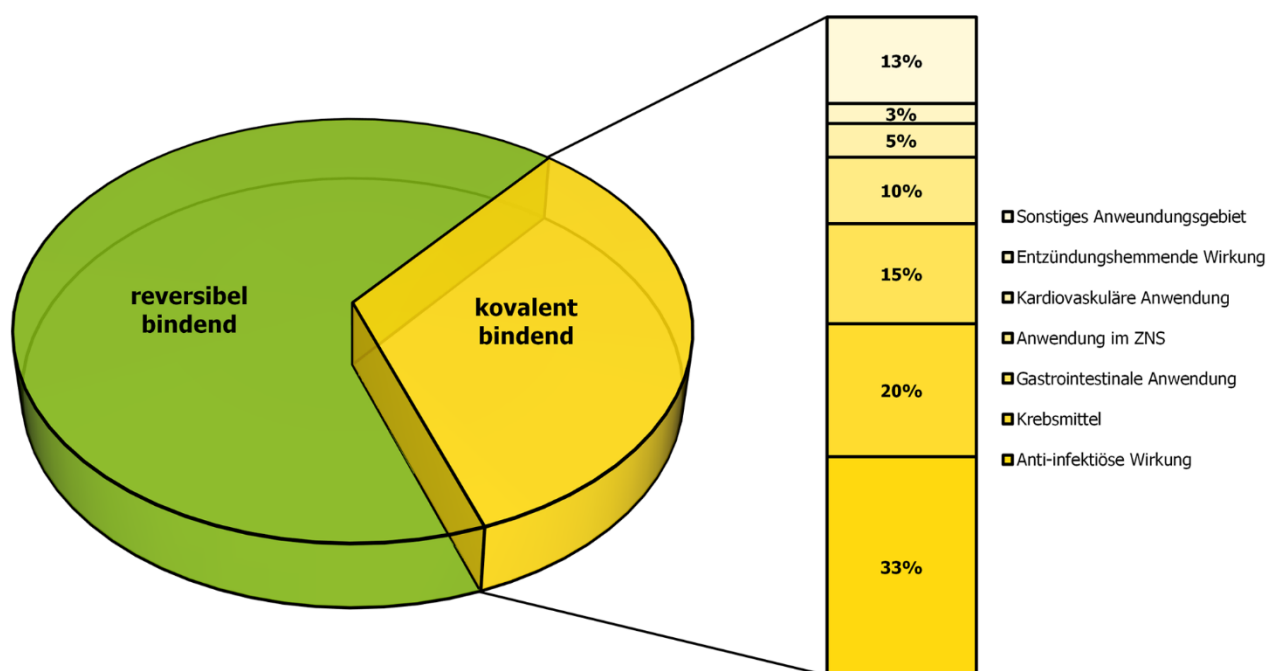


Abbildung 8 Anteil an kovalent oder reversibel bindenden Inhibitoren bei zugelassenen Wirkstoffen (links) und die zugehörigen Indikationen (rechts).^{19,32}

In der Onkologie konnten vor allem Inhibitoren, welche selektiv eine bestimmte Kinase adressieren, revolutionäre Erfolge feiern. Durch die häufig genau definierten genetischen Läsionen lassen sich äußerst selektive Inhibitoren entwickeln, welche eine hohe Wirksamkeit bei einer definierten Patientenpopulation aufweisen kann. Beispielsweise zeigten reversible Inhibitoren wie Erlotinib³³ und Gefitinib³⁴ besonders gute Ansprechraten bei EGFR^{L858R}-assoziiertem (*epidermal growth factor receptor*) nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC). Eine durch Evolutionsdruck auftretende Mutation führte jedoch zu einer neuerlichen Wirkstoffresistenz (EGFR^{L858R/T790M}) und dadurch zur rapiden Verschlechterung des Zustandes der Patienten (siehe Abschnitt 3.1.1). Mehrere kovalent bindende Inhibitoren, u. a. Afatinib³⁵, Rociletinib³⁶ und Osimertinib³⁷ konnten diese Resistenz durch die Adressierung von Cys797, an der Spitze von α HelixD in der ATP-Bindetasche, umgehen.

1.2.1 Bedenken bei der Verwendung kovalent-modifizierender Inhibitoren

Trotz der lang etablierten Wirkstoffe, verschiedener Beispiele aus der Natur und der allgemeinen Effektivität von kovalenten Inhibitoren rücken solche Wirkstoffe nur langsam in den Fokus der Arzneimittelforschung. Dies begründet sich hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, auf der von LANDSTEINER aufgestellten Hapten-Theorie von 1935.³⁸ LANDSTEINER und CHASE konnten zeigen, dass die willkürliche Bindung eines Elektrophil an zelluläre Makromoleküle oftmals eine akute Zellschädigung oder die Aktivierung des Immunsystems zur Folge hat (Abbildung 9). Dies kann wiederum zur Generierung von Antikörpern führen, welche das als fremdartig identifiziertes Makromolekül angreifen und für den Abbau durch T-Helferzellen markieren.³⁸⁻⁴⁰

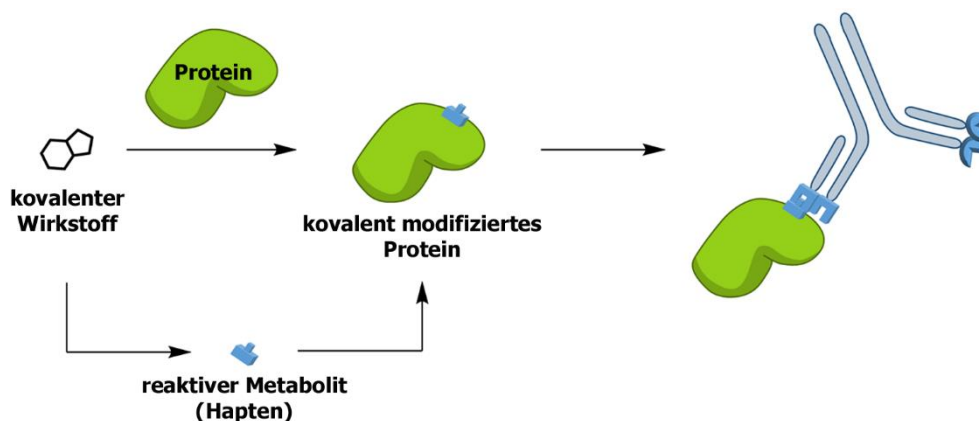


Abbildung 9 Schematische Darstellung des von LANDSTEINER und CHASE postulierten Mechanismus der toxischen Wirkweise von Haptenen. Durch die Bindung eines kovalenten Inhibitors, bzw. dessen reaktiver Metabolit an ein geeignetes Makromolekül (hier Proteine), fungiert dieses nun als Immunogen.

Um diese Studien korrekt einzuordnen sollte aber berücksichtigt werden, dass diese mit einer Verabreichung von hochreaktiven Elektrophilen (Trinitrochlorbenzol und 2,4-Dinitrofluorbenzol) per

direkter intraperitonealer Zugabe durchgeführt wurden.^{38,41-42} Die hierdurch gewonnenen Ergebnisse sind aus heutiger Sicht sehr kritisch zu sehen, da eine ungewöhnlich hohe Dosierung und Reaktivität der verabreichten Verbindung vorlag. Die Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität eines Wirkstoffs zeigt sich beispielsweise auch bei Paracetamol. Dieses sehr häufig eingenommene Schmerzmittel wird durch mikrosomale Oxidation zu NAPQI metabolisiert (siehe Abbildung 10). Dieser Metabolit ist in hohen Dosen durch kovalente Modifikation von Proteinen der Leberzelle hepatotoxisch und führt dadurch zur Leberzellennekrose.^{43 18,44} Das vollständige Nebenwirkungsprofil von Paracetamol wurde jedoch erst in Studien beobachtet, sobald mehrere Gramm Paracetamol pro Dosierung verabreicht wurden.^{15,29-31}

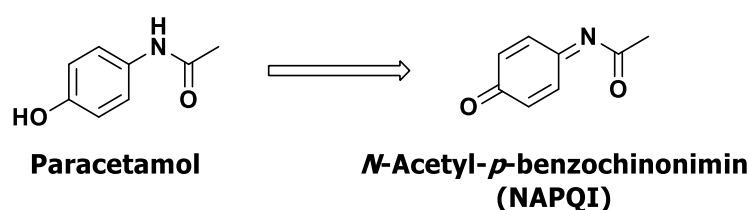


Abbildung 10 Strukturformeln von Paracetamol und dem toxischen Stoffwechselprodukt NAPQI.

Auch modernere Wirkstoffe und deren Nebenwirkungen, welche durch eine Überdosierung hervorgerufen werden, sind hinreichend dokumentiert. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Neratinib-Dosierung von $240 \frac{\text{mg}}{\text{d}}$ über mehrere Monate bei 30 % der Patienten eine Stufe 3 – 4 Diarrhoe auftritt.⁴⁵ Die dadurch entstandene grundlegende Skepsis gegenüber reaktiven Elektrophilen ist jedoch geschichtlich überholt.^{18,44,46-47} Eine retrospektive Untersuchung von in der Entwicklung gescheiterten Wirkstoffen zeigte, dass diejenigen mit einer vorgeschlagenen Dosierung von 100 mg pro Tag proportional häufiger scheiterten als Inhibitoren mit einer täglichen Dosis von 10 mg.¹⁹ Die idiosynkratischen Nebenwirkungen (Nebenwirkungen, die auf Grund angeborener oder erworbener Überempfindlichkeit schon bei erstem Kontakt mit nicht körpereigenen Stoffen auftreten) bei kovalenten Inhibitoren sind demnach stark abhängig von ihrer Dosierung, aber unabhängig vom Wirkmechanismus des Inhibitors.^{18,40,48}

Die genauen molekularen Mechanismen toxischer Wirkungen von kovalenten Modifikationen sind sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch dadurch bleibt die Rolle reaktiver Elektrophile und Metaboliten kovalenter Inhibitoren ein kontroverses Thema. Jedoch konnten Neuerungen, vor allem im analytischen Bereich, ein Umdenken bei pharmazeutischen Unternehmen hervorrufen und somit bekommen kovalent-modifizierende Inhibitoren nun häufiger einen Platz in der Entwicklungspipeline.¹⁹ Im Allgemeinen sollte bei der kritischen Toxizitätsbetrachtung zwischen optimierten Elektrophilen, hoch-reaktiven Elektrophilen (Epoxyde, stark elektrophile Michael-Akzeptoren, etc.) und ihren in der Leber generierten oxidativen Phase I Metaboliten unterschieden

werden. Letztere modifizieren promiskuitiv leicht zugängliche Oberflächennukleophile von Proteinen.^{19,45} Bei Elektrophilen mit intrinsisch niedriger Aktivität, welche hauptsächlich in den modernen zielgerichteten kovalenten Inhibitoren genutzt werden, ist die Gefahr unspezifischer Modifikationen, der so genannten *off-target* Bindung, deutlich geringer. Durch die nicht-kovalente Orientierung des Inhibitors in der Bindetasche werden die speziell abgestimmten milden Elektrophile in räumliche Nähe zu dem gewünschten Nukleophil (Serin, Cystein) gebracht, was wiederum zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei Ausbildung der kovalenten Bindung führt.^{19,49-50} Das Zusammenspiel von optimaler Positionierung und Optimierung der Elektrophile, kann soweit verfeinert werden, dass die Bindung an promiskuitive Thiole, selbst bei Konzentrationen im *in vivo* Bereich ($C_{\text{Glutathion}} = 0.1 - 10 \text{ mM}$)⁵¹, vermieden werden kann.⁴⁹⁻⁵⁰

1.2.2 Messbare Parameter zur Charakterisierung kovalenter Inhibitoren

Im Zuge der Entwicklung von Wirkstoffen wird auf ein breites Spektrum messbarer Parameter zurückgegriffen, welche eine schnelle und valide Einschätzung über die spätere *in vivo* Wirksamkeit zulassen sollen. Hierbei wird ein besonderes Augenmerk auf die orale Bioverfügbarkeit gelegt, repräsentiert durch Lipinskis *rule of five*⁵², welche mittlerweile aber kontrovers diskutiert werden, da hochpotente Naturstoffe unter der strengen Auslegung dieser Richtlinien nicht oral verfügbar sein sollten.⁵³ Die experimentell bestimmbaren Parameter für Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion (ADME) spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle.⁵³ Beispielhaft soll hier die Plasmaproteinbindung aufgeführt werden. Nach klassischen Modellen sollte ein Inhibitor eine möglichst geringe Plasmaproteinbindung aufweisen, da dieser sonst nicht für eine Inhibition am gewünschten Zielprotein zur Verfügung steht. Werden demnach hohe Werte für eine humane Plasmaproteinbindung bestimmt, wird der Wirkstoffkandidat meist modifiziert oder die Entwicklung sogar komplett eingestellt. Der kovalent bindende Inhibitor Neratinib zeigt eine starke Bindung an humane Plasmaproteine, was auf eine unspezifische Bindung des Inhibitors an Thiole hindeutet. In klinischen Studien zeigt Neratinib aber eine hohe Wirksamkeit. Ähnlich verhält es sich bei der Betrachtung des CL-Wertes (*clearance*, renal oder hepatisch), dieser gibt an wie schnell (Einheit: $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$) Niere, bzw. Leber ein Arzneimittel aus dem System entfernen können.⁵⁴ Dementsprechend ist eine hohe *clearance* bei reversiblen Inhibitoren unvorteilhaft, da dies zu einer geringeren Wirkdauer *in vivo* führt. Kovalente Inhibitoren deaktivieren ihre Zielproteine dauerhaft, eine schnelle Ausscheidung von nicht gebundenen Inhibitoren minimiert dadurch die Gefahr von ungewollten Nebenreaktionen mit anderen Proteinen.¹⁹ Es zeigt sich demnach, dass der Wirkmechanismus kovalenter Inhibitoren noch nichts vollends verstanden ist und dadurch die klassischen pharmakokinetischen und -dynamischen Parameter nicht immer adäquat sind um die Wirkung von kovalenten Inhibitoren vorherzusagen.^{18,55-56} Einer der am häufigsten verwendete Parameter zur

Beschreibung der Wirksamkeit von Inhibitoren ist der IC_{50} -Wert. Er beschreibt die Inhibitor-Konzentration, bei der die Aktivität des betrachteten Proteins auf 50 % gesunken ist. Er basiert auf der klassischen Betrachtung des Protein-Wirkstoff-Komplexes als ein System im Gleichgewicht (Abbildung 11).

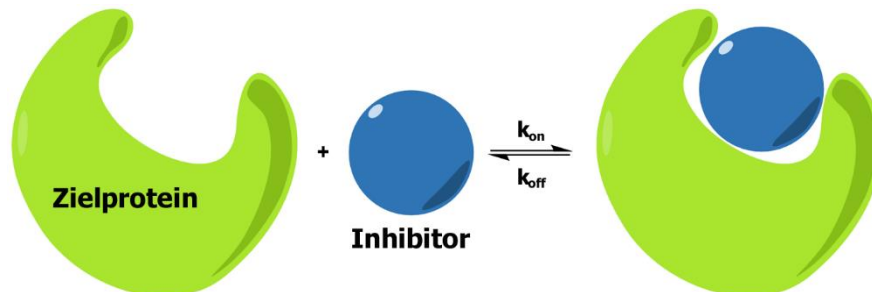


Abbildung 11 Mechanismus der Bindung eines reversiblen Inhibitors. Die Bindung des Inhibitors in seine Bindetasche erfolgt in einem dynamischen Gleichgewicht. Die Bindungskonstante K_i wird über das Verhältnis $\frac{k_{off}}{k_{on}}$ bestimmt.

Die Verweildauer eines kovalenten Inhibitors lässt sich, wie bereits besprochen, nicht hinreichend durch ein Gleichgewicht beschreiben. Kovalente Inhibitoren inaktivieren ihre Zielproteine vollständig, indem sie häufig eine wesentlich längere Halbwertszeit als das Zielprotein besitzen. Ihre Bindung an das Zielprotein ist nach der kovalenten Bindungsknüpfung irreversibel und die Besetzungsdauer damit quasi unendlich.⁵⁷ Dadurch lässt sich eine Verschiebung des IC_{50} -Wertes bei unterschiedlichen Inkubationszeiten des Inhibitors mit dem Zielprotein beobachten (Abbildung 12).⁵⁸

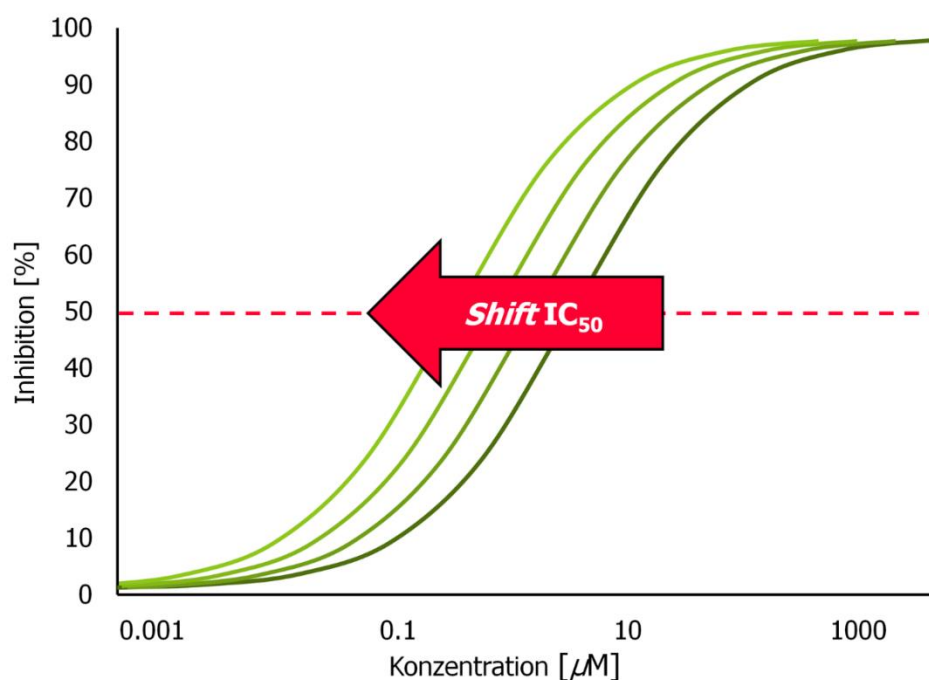


Abbildung 12 Die Bestimmung der IC_{50} -Werte von kovalenten Inhibitoren zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation führt zu einer charakteristischen Linksverschiebung mit zunehmender Inkubationsdauer.⁵⁸

Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes ist dementsprechend nicht gut geeignet um kovalente Inhibitoren zu beschreiben. Zur Beschreibung der Effektivität der Bindung sollte demnach besser auf die Bestimmung kinetischen Parameter zurückgegriffen werden.^{18,45,58}

Diese unzureichende Beschreibung kann vor allem dem, bei kovalenter Bindung, speziellen zweistufigen Mechanismus zugeschrieben werden. Jeder kovalent bindende Inhibitor muss durch nicht-kovalente Wechselwirkung zunächst in der Bindetasche binden. Die Effektivität dieser Positionierung wird über die Bindungskonstante K_i hinreichend gut beschrieben (Abbildung 11 und Abbildung 13B). Der daraus resultierende Komplex positioniert das moderat aktive Elektrophil in räumliche Nähe zu einem Nukleophil und führt zur kovalenten Bindungsbildung. Von einer kovalent irreversiblen Modifikation spricht man dann, wenn die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion (k_{-1}) nahezu Null ist (Abbildung 13A). Besitzt k_{-1} jedoch endliche Werte wird von einer kovalent-reversiblen Modifikation gesprochen.¹⁹

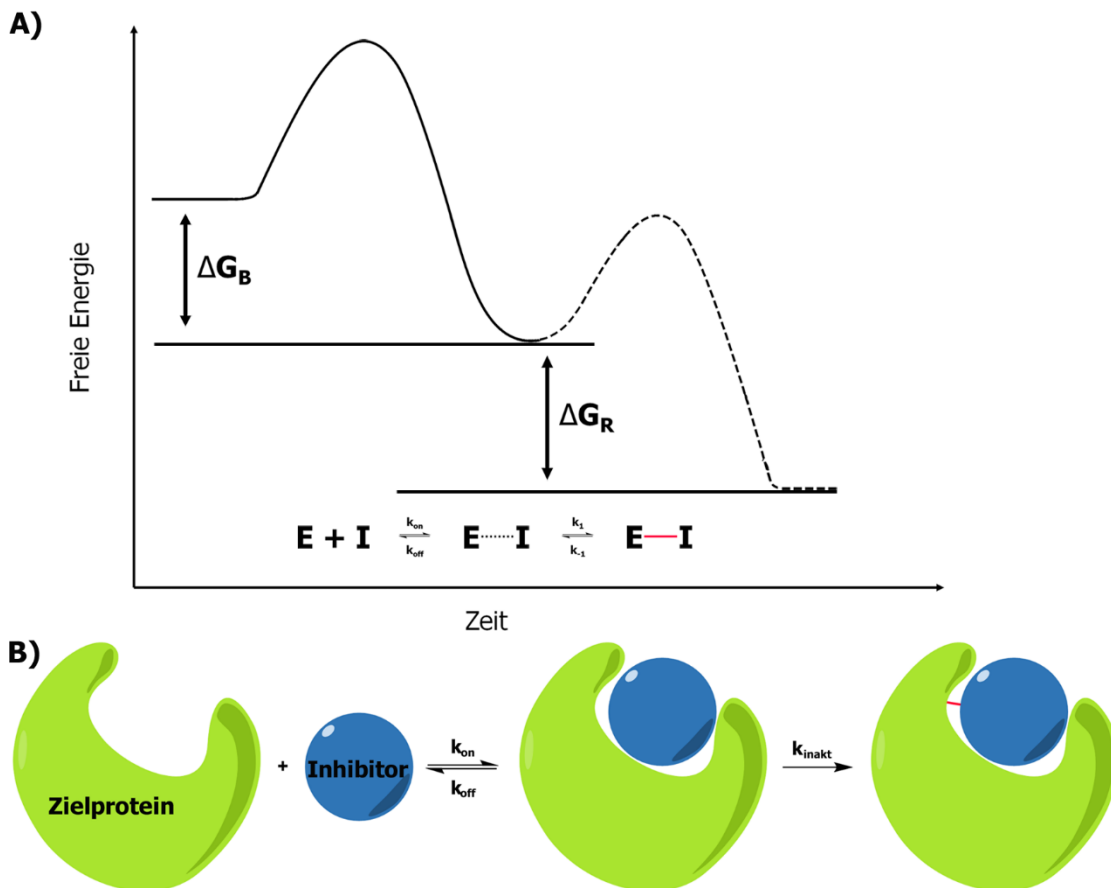


Abbildung 13A) Energiediagramm für den Mechanismus der kovalenten Inhibition. Während der initialen Ausbildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes ($E \cdots I$) wird ein definierter Betrag an Energie freigesetzt (ΔG_B), je größer dieser Betrag ist, desto stabiler ist der Komplex. In einem zweiten Reaktionsschritt wird nun die kovalente Bindung geknüpft ($E-I$, in rot), wobei die frei werdende Energie der freien Reaktionsenthalpie ΔG_R (Gibbs-Energie) entspricht. Im Falle von $k_1 > k_{-1}$ erhält man den Zustand der reversiblen Bindung (vgl. Abbildung 11). Im Fall, dass die Geschwindigkeitskonstante für die Rückreaktion (k_{-1}) Null entspricht, spricht man von einer kovalenten Inhibition.⁵⁹ **B)** Schematische Darstellung des Mechanismus der zweistufigen kovalenten Bindungsbildung und deren messbaren Parameter $K_i = \frac{k_{off}}{k_{on}}$ und k_{inakt} (wobei k_{inakt} k_1 entspricht sobald $k_{-1} = 0$).

Durch die Bestimmung von K_i , k_{inakt} und $\frac{k_{\text{inakt}}}{K_i}$ wird eine verbesserte Beschreibung der Wirksamkeit von kovalenten Inhibitoren erreicht.¹⁹ Der Quotient aus $\frac{k_{\text{inakt}}}{K_i}$ beschreibt hierbei die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung zwischen Enzym und Inhibitor.^{45,60}

Der Begriff der Irreversibilität bei Inhibitor-Enzym-Wechselwirkungen muss immer im Zusammenhang mit der Halbwertszeit des Enzyms gesehen werden, da die Neusyntheserate von Proteinen die Wirksamkeit von kovalenten Inhibitoren begrenzt. Ist die kinetische Halbwertszeit des kovalenten Komplexes länger als die Neusyntheserate des entsprechenden Proteins, kann von einer mechanistischen Irreversibilität ausgegangen werden.^{19,45} Andererseits führt diese Einschränkung aber auch zu vielen positiven Effekten bei der Entwicklung von Wirkstoffen. So gingen LEWANDOWICZ *et al.* soweit, die Abhängigkeit der Aktivität eines Zielproteins von dessen Neusynthese als ultimatives physiologisches Ziel bei der Entwicklung eines Inhibitors zu definieren.⁶¹ Am Beispiel von Omeprazol (Abbildung 6) und der Inhibition der H^+/K^+ -ATPase lässt sich dies recht einfach verdeutlichen: Die Halbwertszeit der ATPase beträgt 52 h wohingegen Omeprazol nach 1 – 2 h im Körper abgebaut wird.⁶² Trotz dieser kurzen Halbwertszeit ist es möglich die Dosierung von Omeprazol niedrig zu halten und nur einmal täglich zu verabreichen, da die Inaktivierung der ATPase schnell von Statten geht und die Neusynthese sehr langsam ist.^{19,62} Damit ist die Wirkung von kovalenten Inhibitoren intrinsisch länger ist als ihre eigentliche Halbwertszeit im Plasma da, sobald ein Molekül des Inhibitors sein Zielprotein inaktiviert hat, dieses bis zum Zeitpunkt der Neusynthese vollständig deaktiviert ist. Ist hingegen die Neusyntheserate des Zielproteins sehr schnell bieten kovalente Inhibitoren deutlich weniger Vorteile.^{18,63}

1.2.3 Entwicklung und Optimierung kovalenter Inhibitoren

Durch den zweistufigen Bindungsmechanismus (Abbildung 13) müssen kovalente Inhibitoren für beide Bindungsschritte optimiert werden. Hierbei kann durch die Wahl des Elektrophils eine spezifische Anpassung an das zu adressierende Nukleophil ermöglicht werden. Weiterhin müssen aber auch die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zur Positionierung in der Bindetasche für das jeweilige Zielprotein berücksichtigt werden.¹⁹ HAJDUK *et al.* konnten hierbei zeigen, dass die maximale nicht-kovalente Bindungsenergie, welche durch klassische medizinisch-chemische Optimierung erzielt werden kann 0.3 kcal/mol pro Schweratom beträgt.⁶⁴ Dahingegen können Inhibitoren, welche auf der Ausbildung einer kovalenten Bindung beruhen diese Werte problemlos übertreffen, da die kovalente Verknüpfung kinetisch und thermodynamisch stark bevorzugt ist. Es konnten Werte der *ligand efficiency* (Δg , definiert als die Gibbs-Energie (ΔG) pro Schweratom (Gl. 1))⁶⁵ erzielt werden, die entweder sehr hoch oder praktisch unendlich sind.^{19,57}

$$\Delta g = \frac{\Delta G}{N_{\text{Schweratom}}} \quad \text{Gl. 1}$$

Durch die hohe Effizienz bei kovalenter Modifikation, kann das Molekulargewicht der Inhibitoren im Vergleich zu rein nicht-kovalenten Inhibitoren relativ klein gehalten werden. Einer Optimierung der ADME Parameter wird dadurch mehr chemischer Raum gegeben.^{19,57} Die Selektivität von kovalenten Inhibitoren wird ebenfalls über das Zusammenspiel von K_i und k_{inakt} gesteuert. Die Affinität des Inhibitors muss hoch genug sein, um eine ausreichende Verweildauer am Zielprotein zu gewährleisten, die es erlaubt eine kovalente Bindungsknüpfung durchzuführen. Da jedoch die Verwendung von hoch-reaktiven Elektrophilen vermieden werden sollte, ist die Optimierung der Verweildauer besonders durch die Erhöhung der Affinität (K_i) zu erzielen. Für die Optimierung der verschiedenen Parameter sind unterschiedliche Herangehensweise notwendig. Eine Optimierung des K_i ist vornehmlich von der räumlichen Struktur und chemischen Umgebung in der Bindetasche abhängig, wohingegen der k_{inakt} fast ausschließlich von der Komplementarität von Nukleophil und Elektrophil beeinflusst wird.¹⁹

Die kovalente Modulierung von Proteinen durch organische Moleküle kann durch sieben verschiedene Mechanismen erzielt werden. Diese sind: Alkylierung, Acylierung, Metallbindung, Disulfidbrückenbindung, Hemiketalausbildung, die Pinner-Reaktion und Michael-Addition.²³ Bei der Entwicklung von Wirkstoffen wird meist auf die Michael-Addition mit reaktiven Nukleophilen zurückgegriffen (Mechanismus siehe Abbildung 14). Die erfolgreiche Addition von α,β -ungesättigten Verbindungen an Thiole ist abhängig von der elektronischen Konfiguration des Akzeptor-Donor-Paares, dem pH-Wert, der Temperatur und, im speziellen Fall der Bindung an ein Protein, von der lokalen Mikroumgebung des Nukleophils.⁶⁶ Bei einer Untersuchung von verschiedenen Elektrophilen kristallisierte sich die Klasse der Acrylamide als am besten geeignet heraus, da diese eine hohe Biokompatibilität aufweisen (*in vitro* und *in vivo*).⁶⁷ Acrylamide werden bevorzugt als Elektrophil eingesetzt, da sie meist eine geringe Reaktivität in Lösung aufweisen. Besitzen die Inhibitoren jedoch eine hohe nicht-kovalente Affinität zur Bindetasche wird durch die lokale Konzentration und lange Besetzungsdauer eine kovalente Modifikation des Nukleophils ermöglichen.⁶⁸

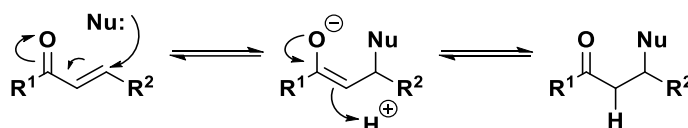


Abbildung 14 Schematische Darstellung des Mechanismus einer Michael-Addition. Im ersten Schritt erfolgt die nukleophile Addition, abschließend die Protonierung der Zwischenstufe und Generierung des stabilen Reaktionsprodukts.

Neben der sorgfältigen Auswahl des Elektrophils muss bei der Entwicklung von kovalenten Inhibitoren ein besonderes Augenmerk auf die Auswahl des zu adressierenden Nukleophils gelegt werden. Insbesondere die häufig ungewünschte Adressierung von, über Proteinfamilien stark konservierten, Nukleophilen oder Nukleophilen mit katalytischen Aufgaben (z. B. Serin in der

katalytischen Triade) kann zu erheblichen Selektivitätsverlusten sowie ungewollten Nebenwirkungen führen.⁶⁹ Eine elegante Lösung stellt hierbei die Adressierung von nicht konservierten Nukleophilen dar, welche durch die über die letzten Jahrzehnte entwickelten Methoden der Proteomik meist leichter zu identifizieren sind.⁶⁹⁻⁷¹

Cysteine gehören mit etwa 3.3 % Häufigkeit zu den am seltensten vorkommenden Aminosäuren in Proteinsequenzen. Sie sind jedoch disproportional häufig in einer funktionsgebenden Rolle zu finden.^{68,72-73} Hierzu zählen, unter anderem die Katalyse und die Signalweiterleitung.⁷⁴⁻⁷⁵ Durch die Adressierung nicht konservierter Cysteine mit kovalenten Inhibitoren ist eine Steigerung der Selektivität im Vergleich zu nicht-kovalenter Inhibitoren möglich. Die Reaktivität von verschiedenen Cysteinen kann bis zu sechs Zehnerpotenzen unterschiedlich sein, was eine gezielte Optimierung der Inhibitoren für ein definiertes Cystein erleichtert.^{19,68,76} Das Konzept des *de novo drug designs* mit dem Ziel reaktive Cysteine zu modifizieren ist noch relativ neu, jedoch durch die Erfolge der Vergangenheit ein schnell wachsendes Feld.⁶⁸ Die Bedeutung von Cysteinen für die Wirkstoffentwicklung kann auch dadurch gezeigt werden, dass die Mutation zu Cystein 2.6 Mal häufiger in Krebszellen vorkommt, als man durch zufällige Mutation erwarten würde. Hierbei treten gehäuft Mutationen auf, welche einen durch den Krankheitsverlauf entstandenen evolutionären Vorteil besitzen (z. B. Aktivierungsmutationen oder Wirkstoffresistenzen). Die hierbei auftretenden nicht-synonyme Mutationen (Punktmutationen von Aminosäuren) machen einen Großteil der Mutationen bei Kinasen aus, die eine prominente Rolle in verschiedenen Krebsarten einnehmen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass 12 % aller KRAS (*kirsten rat sarcoma*) und 88 % aller FGFR3 (*fibroblast growth factor receptor 3*) Mutationen erworbene Cystein-Mutationen sind.⁷⁷⁻⁷⁸ Strukturbiologische *in silico* Untersuchungen des humanen Kinoms zeigten, dass ca. 200 Kinasen mit einem Cystein innerhalb oder in adressierbarer Nähe ($\sim 10 \text{ \AA}$) der ATP-Bindetasche existieren, was Kinasen zu einem attraktiven Ziel für die Entwicklung kovalenter Inhibitoren macht.^{69,79-80}

Die generelle Adressierbarkeit von nicht-katalytischen Cysteinen in Kinasen wurde 1997 von SINGH *et al.* in einer Machbarkeitsstudie gezeigt. Hierbei konnte unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen einem 2'-Thioadenosin und Cys797 der Kinasedomäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) dieser komplett inaktiviert werden.⁸⁰⁻⁸¹ Diese Studie führte in den 90er Jahren zur Entwicklung mehrerer kovalenter Inhibitoren, welche das aktivierte Cys797 an der Spitze der ATP-Bindetasche von EGFR adressierten und den Rezeptor erfolgreich und selektiv inhibierten.⁸¹ Im Fall von EGFR-assoziiertem NSCLC sind mehrere im Krankheitsverlauf auftretende genetische Läsionen identifiziert worden. Durch die genaue Charakterisierung dieser Läsionen konnten immer neue wirksame Wirkstoffe entwickelt werden, welche die einzelnen Stadien der Krankheit effektiv bekämpfen.⁸² Die mittlerweile zweite Generation von kovalenten EGFR-Inhibitoren, vertreten durch Osimertinib, wurde von der FDA mit dem Label *breakthrough drug* honoriert.⁷⁸

Aber auch andere Kinasen⁸³⁻⁸⁵ oder Proteasen⁸⁶ konnten erfolgreich und mit hoher Selektivität adressiert werden. Als Beispiel sei hier die Modifizierung von Cys159 in der Hepatitis C Virus (HCV) Protease durch ein Peptidomimetikum genannt. Dieser auf Telaprevir⁸⁷ basierende kovalente Inhibitor Compound 3 (Abbildung 15) adressiert Cys159 der HCV-Protease ohne dabei menschliche Protease zu inhibieren (Telaprevir vs. Compound 3, HCV Protease IC₅₀ = 2500 vs. 2 nM).⁸⁸

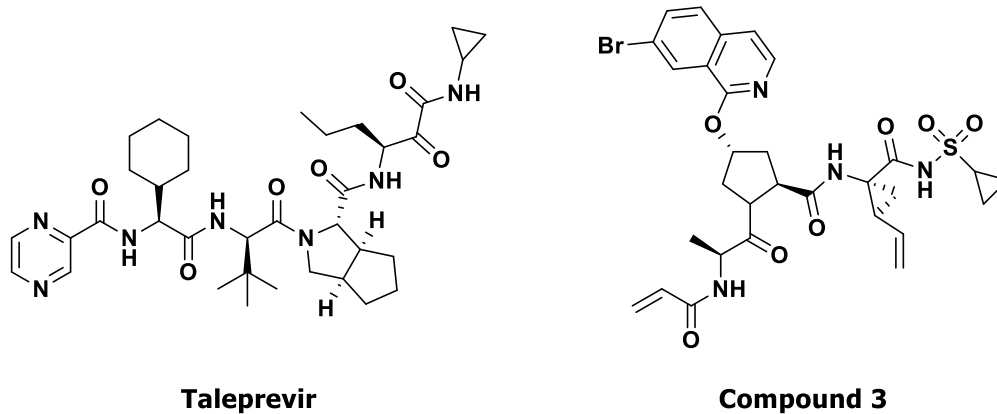


Abbildung 15 Struktur des virostatischen wirksamen Peptidomimetikum Teloprevir als Inhibitor der HCV-Protease und der daraus entwickelte kovalente Inhibitor „Compound 3“.

1.3 Kovalent-reversible Inhibitoren

Bei der Entwicklung von kovalenten Inhibitoren sollte immer eine Betrachtung der Reaktivität gegenüber in der Zelle in hohen Konzentrationen vorkommenden nicht-spezifischen Thiolen, wie Glutathion (GSH) vorgenommen werden, um mögliche *off-target* Bindung und damit einhergehende Nebenwirkungen auszuschließen. In der Literatur sind mehrere Veröffentlichungen bekannt, welche sich mit der inhärenten Aktivität von Inhibitoren gegenüber solchen Thiolen beschäftigt haben.^{56,89} Des Weiteren sind Proteine mit einer hohen Neusyntheserate nur eingeschränkt für die kovalente Inhibition geeignet, da diese durch den schnellen Abbau ihren Vorteil der nachhaltigen und dauerhaften Inhibition gegenüber nicht-kovalenten Inhibitoren verlieren. Die hier kurz beschriebenen Probleme könnten durch das relativ neu in der Wirkstoffentwicklung etablierte Prinzip der kovalent-reversiblen Inhibitoren (CRI) umgangen werden.⁹⁰⁻⁹¹ Kovalent-reversible Inhibitoren zeichnen sich durch endliche Werte bei der Rückreaktion der kovalenten Bindungsbildung aus (Abbildung 13A, wobei $k_{-1} \neq 0$; Abbildung 16). Um eine Reversibilität des Michael-Akzeptors zu gewährleisten ist es nötig, diesen mit zwei elektronenziehenden Resten zu versehen.

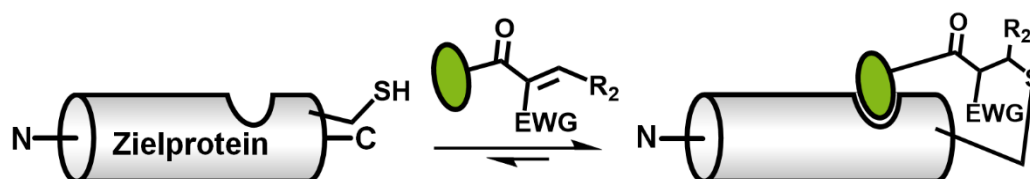


Abbildung 16 Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus der kovalent-reversiblen Bindung an ein Protein mit passendem Cystein (EWG, *electron withdrawing groups*).⁹⁰

Die Grundprinzipien der kovalent-reversiblen Bindung konnten bereits 1968 bei der Reaktion von Cyanoacrylaten mit Butan-1-thiol beobachtet werden.⁹² Kovalent-reversible Inhibitoren liefern trotz ihrer Reversibilität sehr lange Wirkdauern, ähnlich der kovalent-irreversiblen Inhibitoren. Dies kann mit ihrer sehr langsamen Dissoziation vom Zielprotein erklärt werden.⁷⁴ SERAFIMOVA *et al.* konnten zeigen, dass kovalent-reversible Inhibitoren schnell und vor allem reversibel mit β -Mercaptoethanol und GSH reagieren.⁹¹ Das Problem der schnellen Neusynthese von Proteinen könnte durch die kovalent-reversiblen Inhibitoren umgangen werden, da sie nicht mit dem Protein abgebaut werden, sondern mit der Entfaltung des Proteins wieder regeneriert werden und zur Inhibierung anderer Zielproteine theoretisch zur Verfügung stehen.⁴⁵ Ein großer Vorteil von kovalent-reversiblen Inhibitoren ist, dass die Besetzungsdauer am Zielprotein durch Modifizierungen am kovalent-reversiblen Zentrum speziell angepasst werden kann. Am Beispiel des kovalent-reversiblen Analogons von Ibrutinib⁹³ (Abbildung 17) ließ sich eine Besetzungsdauer von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden selektiv durch die Variation der Reste am reaktiven Zentrum einstellen.^{74,94} Mit Bortezomib existiert bereits zugelassener Wirkstoff, der einen kovalent-reversiblen Bindungsmodus aufweist (Abbildung 17). Die in Bortezomib vorhandene Boronsäure reagiert kovalent-reversibel mit Hydroxylgruppen (Serin oder Threonin) im Proteasom 26S und inhibiert dieses damit selektiv.^{74,95-97} Neben der Modifikation analog der Michael-Aktzeptoren bei den kovalent-irreversiblen Inhibitoren und der Reaktion von Boronsäuren mit Hydroxylgruppen können über Ausbildung einer Schiff'schen Base mit Aminen (z. B. Lysin) kovalent-reversible Inhibitoren generiert werden. Dies wurde bereits erfolgreich bei Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen gezeigt.^{74,98}

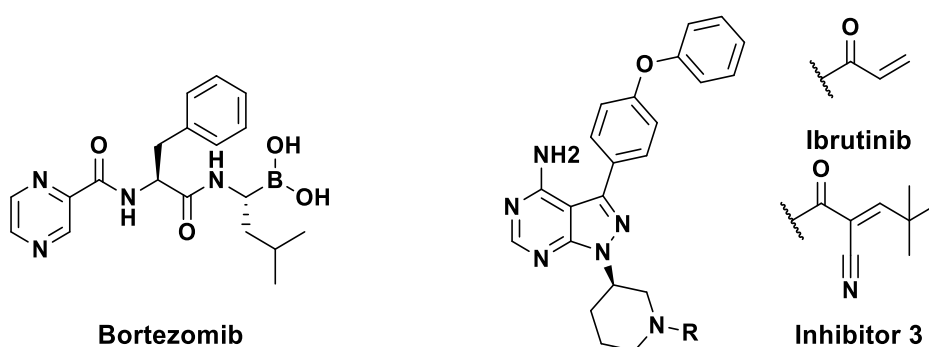


Abbildung 17 Struktur der kovalent-reversibel bindenden Inhibitoren Bortezomib und Inhibitor 3. Inhibitor 3 basiert auf dem kovalenten BTK-Inhibitor Ibrutinib und bindet über Michael-Addition an Cys481 in BTK.

1.3.1 Charakterisierung der Bindungszustände kovalent-reversiblen Inhibitoren

Bei der Charakterisierung der Bindungszustände von kovalent-reversiblen Inhibitoren greifen Forscher auf etablierte Verfahren zurück. Durch die Untersuchung der Absorptionseigenschaften und zeitaufgelöste NMR-Experimente konnten bisher gute Einblicke in die Bindungseigenschaften von kovalent-reversiblen Inhibitoren im Modell erhalten werden. SERAFIMOVA *et al.* nutzen die, für die meisten β -Aryl- bzw. Heteroarylcyanoacrylamide charakteristische UV-Vis Bande (zwischen

300 – 400 nm) um eine kovalente Bindungsbildung mit β -Mercaptoethanol nachzuweisen. Durch die Ausbildung der kovalenten Bindung verschwindet die typische Bande im UV-Vis Spektroskopie Experiment. Durch Verdünnen des Ansatzes mit Puffer lässt sich zeitabhängig ein Wiederaufkommen der Cyanoacrylamid-Bande im Spektrum beobachten.^{80,91} Um sicherzustellen, dass die Änderung der UV-Vis Bande mit der kovalenten Bindungsknüpfung zusammenhängt wurden zusätzlich $^1\text{H-NMR}$ Experimente durchgeführt in denen die kovalente Bindung zu β -Mercaptoethanol anhand des charakteristischen Thioether-Signals beobachtet wurde.^{80,91} Trotz dieser eleganten Methoden ist es bisher nicht möglich die kovalenten und reversiblen Bindungszustände eines Inhibitors innerhalb eines Proteins zu untersuchen.

1.4 Massenspektrometrie

Seit Anfang der 1990er Jahre ist es durch die Implementierung von Matrix-Assistierte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI⁹⁹) und Elektrospray-Ionisation (ESI¹⁰⁰)-Techniken möglich, Proteine mittels Massenspektrometrie (MS) zu untersuchen. Nur durch MALDI oder ESI-Techniken können große Biomoleküle als geladene Ionen in die Gasphase überführt werden, was für die Bestimmung der Masse mittels MS unerlässlich ist.¹⁰¹

Die Grundprinzipien zur MS wurden 1897 durch die Entdeckung des Elektrons durch THOMSON gelegt.¹⁰¹⁻¹⁰² Besonders wichtig für die Bestimmung der Masse von Molekülen war die Erkenntnis, dass die Flugzeit geladener Teilchen von ihrer Masse abhängt. Durch diese Erkenntnis legte THOMSON das Fundament, welches die Entwicklung der Massenspektrometrie ermöglichte.¹⁰¹ Die Nutzung von MS zur Bestimmung der Masse von kleinen Molekülen ist seit über 50 Jahren etablierte Praxis in der Chemie. Es gibt eine Vielzahl von Variationen an MS-Geräten, die jeweils für spezielle Fragestellungen optimiert werden können, jedoch ist der prinzipielle Aufbau der Geräte relativ gleichbleibend (Abbildung 18). Zunächst wird der Analyt von dem ihm umgebenden Medium getrennt und ionisiert, sodass geladene Molekül-Ionen entstehen. Diese werden dann in die Gasphase überführt und im Hochvakuum durch elektrische oder magnetische Felder gemäß ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt. Im letzten Schritt werden die so aufgetrennten Ionen detektiert.^{1,100-101,103-104}

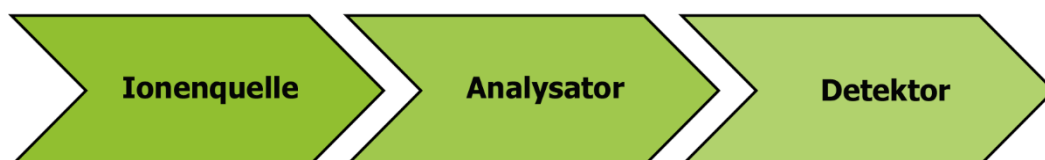


Abbildung 18 Fließdiagramm des Grundaufbaus eines Massenspektrometers.

Trotz der lang etablierten MS-Technik dauerte es bis Ende der 1980er Jahre bis die Übertragung auf Makromoleküle, wie PEG oder Biomoleküle, realisiert werden konnte. Das Problem bei der

Massenbestimmung von Biomolekülen lag vornehmlich in der schwierigen zerstörungsfreien Überführung in die Gasphase. Durch das fragile Peptidrückgrat bei Proteinen oder das Nukleotidrückgrat bei DNS mussten erst spezielle Ionisierungsmethoden entwickelt werden, die sicherstellen, dass diese Strukturen im Ionisierungsprozess intakt bleiben. Der Durchbruch gelang, unabhängig voneinander, TANAKA und FENN mit der Entwicklung der neuen Ionisierungsmethoden MALDI bzw. ESI, wofür beide 2002 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden.⁹⁹⁻¹⁰¹ Durch die Entwicklung dieser beiden Techniken war es nun möglich große Biomoleküle zerstörungsfrei zu Ionisieren und in die Gasphase zu überführen. Mit diesen Methoden konnte die Ungenauigkeit bei der Massenbestimmung kleiner Biomoleküle (30 – 40 kDa) von 5 – 10 % mittels SDS auf ca. 0.01 % gesenkt werden.¹⁰³

Bei der Elektrospray-Ionisation liegt der Analyt in einer flüchtigen, wässrigen Lösung vor, meist ein Gemisch aus Acetonitril oder Methanol und Wasser. Um die Ionisation zu unterstützen werden organische Säuren, wie TFA oder Essigsäure zugesetzt.¹⁰³ Die so gelöste Probe wird über eine Hohlneedle in die Elektrospray-Kammer geleitet. An der Nadel wird eine erhöhte Spannung, im Vergleich zu den Wänden der Kammer und der umgebenden zylindrischen Elektrode, angelegt. Die hierbei entstehenden geladenen Tröpfchen migrieren im Gasgegenstrom in Richtung einer Glaskapillare. Diese Migration wird durch den Potentialunterschied zwischen Nadelspitze und dem Einlass der Kapillare gewährleistet (Abbildung 19A).¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Durch den Gasgegenstrom verdampft das Lösemittel immer weiter, sodass ein für die MS-messbares Quasi-molekulares Ion verbleibt. Die positiv geladenen Ionen gelangen über die Glaskapillare in eine Hochvakuumkammer und von dort in einen angeschlossenen Massenanalysator. Die Auftrennung der ionisierten Biomoleküle erfolgt im elektrischen Feld nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis. Die so generierten Spezies liefern eine Vielzahl von Signalen. Die über einzelne Peaks dargestellten Signale repräsentieren die geladenen Ionen welche sich, insofern sie der gleichen Molekülspezies zugeordnet werden können, von seinem benachbarten Peak genau um eine Ladung. Durch den gewichteten Durchschnitt ist es dadurch möglich die genaue Ladung der Probe sehr genau zu bestimmen. Da die Proteine in wässriger Lösung vorliegen, ist bei der ESI eine Kopplung mit HPLC-Systemen zur Automatisierung möglich. Auch sind die äußerst geringen benötigten Flussraten (im Bereich von $\frac{nL}{min}$) von Vorteil, da dadurch nur sehr geringe Mengen an Analyt benötigt werden.^{100-101,103}

MALDI gilt als besonders sanfte Ionisierungsmethode, welche auf der Kokristallisation des Analyts mit einer Matrix (z. B. aus Sinapinsäure) auf einer Metallplatte basiert. Die Ionisierung und Desorption erfolgt durch einen gepulsten hochenergetischen Laser. Die so erzeugten Ionen werden anschließend im Hochvakuum in den Massenanalysator eingeleitet (Abbildung 19B). Einer der Vorteile von MALDI ist die sehr genaue Kenntnis über die erzeugten Ionen, welche überwiegend

einfach geladen vorliegen. Da, dass für die Ionisierung eine Matrix von Nöten ist, gestaltet sich die Probenvorbereitung (Kristallisation in der Matrix) komplizierter als bei der ESI.^{101,107}

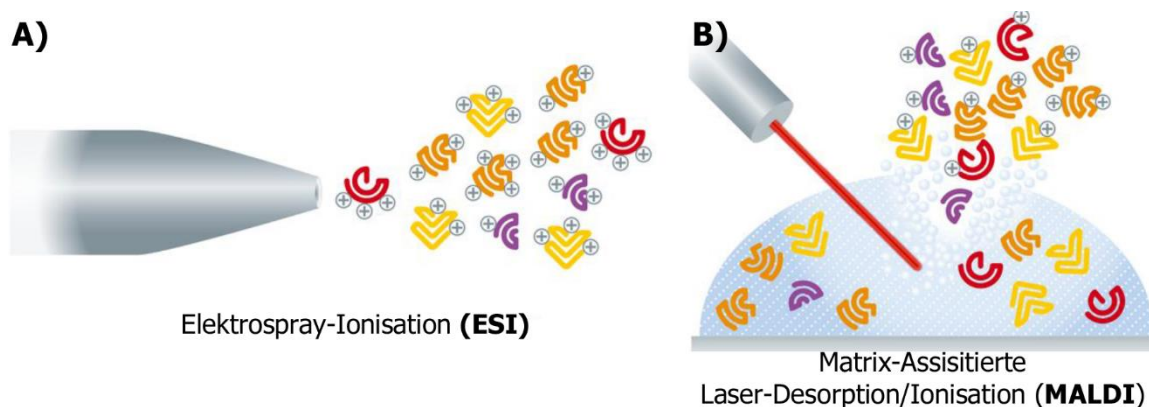


Abbildung 19 Schematische Darstellung der am häufigsten verwendeten Ionisationsmethoden ESI (A) und MALDI (B).¹⁰¹ (Adaptiert mit Genehmigung des Verlags und Korrespondenzautors Albert J. R. Heck aus: *Lössl et al. The Diverse and Expanding Role of Mass Spectrometry in Structural and Molecular Biology. EMBO J. 2016, 35, 2634 – 2657*).

Für die eigentliche Trennung der verschiedenen Massen stehen unterschiedlichste Techniken zur Verfügung. Die drei am häufigsten verwendeten sind: TOF (*time of flight*), Quadrupol (linearer Massenfilter) und Orbitrap (Ionenfalle).¹⁰¹ Die drei Techniken unterscheiden sich deutlich in den Parametern, welche genutzt werden um die Masse des Analyts zu bestimmen. Bei TOF-Analysatoren wird über eine genau definierte Distanz die Flugzeit der geladenen Teilchen gemessen. Hierbei stellt vor allem der apparative Aufbau, bzw. die exakte Zeitnahme die größte Herausforderung dar.^{1,101}

Der Orbitrap Massenanalysator besteht aus drei Elektroden, welche als Ionenfalle dienen. Eine innere spindelförmige Elektrode formt dabei die Ionenfalle, während sie von den zwei schalenförmigen Elektroden komplett umschlossen ist.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Wird nun eine Spannung zwischen den äußeren und der inneren Elektrode angelegt, baut sich ein lineares Feld entlang der Spindelachse auf. Die radiale Komponente des elektrischen Feldes zieht wiederum Ionen in Richtung der zentralen Elektrode.¹¹⁰ Die vorher erzeugten Ionen werden nun dezentral in den Zwischenraum der Elektroden injiziert. Abhängig von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis kreisen die Ionen in einer unterschiedlichen Frequenz um die Zentralelektrode. Diese Unterschiede in der Frequenz werden über einen Detektor erfasst und über Fourier-Transformation als m/z -Werte wiedergegeben.^{108,110}

Der Quadrupol ist ein linearer Massenfilter. Hierbei liegen vier Stabelektroden parallel zueinander. Die jeweils gegenüberliegenden Elektroden sind elektrisch miteinander verbunden. Durch leichte Spannungsunterschiede zwischen den beiden Paaren wird gewährleistet, dass nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert auf einer stabilen schlingernden Flugbahn auf der anderen Seite des Quadrupols auf den Detektor treffen können. Hierbei wird ein selektiv ein voreingestelltes m/z -Verhältnis detektiert.¹¹¹

Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung der hier präsentierten Techniken ist die Massenspektrometrie mittlerweile ein gängiges analytisches Werkzeug in allen Bereichen der Wirkstoffentwicklung. Das Einsatzgebiet erstreckt sich über die Leitstrukturfindung, Reinheitsbestimmung von Proteinen, toxikologische Untersuchungen, Pharmakokinetik bis hin zur Qualitätskontrolle.¹¹² Durch die sauren Additive im Lösemittelsystem und dem durch die Ionisierung bedingten Lösemittelentzug liegen Proteine bei ESI-MS Messungen denaturiert vor. Dementsprechend sind bei der Suche nach Wirkstoffen nur solche zu detektieren, die das Protein kovalent-irreversibel modifizieren. Jedoch konnten GANEM *et al.* schon 1991 zeigen, dass es möglich ist nicht-kovalente Wechselwirkungen von Inhibitor und Protein von der flüssigen in die Gasphase zu überführen.¹¹²⁻¹¹³ Durch nicht-denaturierende Bedingungen (pH-Wert, Flussraten, etc.) und eine Optimierung der verschiedenen MS-Komponenten wurde es möglich, nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Protein-Protein-Interaktionen und die Bindung von nicht-kovalenten Inhibitoren, zu detektieren.^{101,114}

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Synthese kovalenter und kovalent-reversibler Kinaseinhibitoren. Hierbei sollte das im Arbeitskreis Rauh bereits etablierte Grundgerüst der Pyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidine (**1**) chemisch auf eine erhöhte Affinität und Selektivität der wirkstoffresistenten Mutationsvariante des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR^{L858R/T790M}) optimiert werden. Die so erzeugten kovalenten Inhibitoren sollten anschließend biochemisch und zellbiologisch charakterisiert werden. Ergänzend dazu sollten durch die Einführung eines zweifach substituierten Acrylamids neuartige kovalent-reversible EGFR-Inhibitoren (CRI) synthetisiert werden. Ein Schwerpunkt sollte dabei die Entwicklung einer neuartigen MS-basierten Methodik zur Charakterisierung der reversiblen und kovalenten Bindungszustände der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten CRIs bilden. Inspiriert durch die Arbeiten von ENGEL *et al.* sollte, vor allem durch Einführen großer aromatischer Substituenten an der 3-Position eine erhöhte Selektivität gegenüber EGFR^{L858R/T790M} erreicht werden (Abbildung 20).¹¹⁵ Hierfür sollte Größe und elektronische Konfiguration der Substituenten variiert werden um Erkenntnisse über positive und negative Wechselwirkungen in der Bindetasche von EGFR-Mutanten, besonders im Bereich der Türsteher-Aminosäure Met790 zu gewinnen.

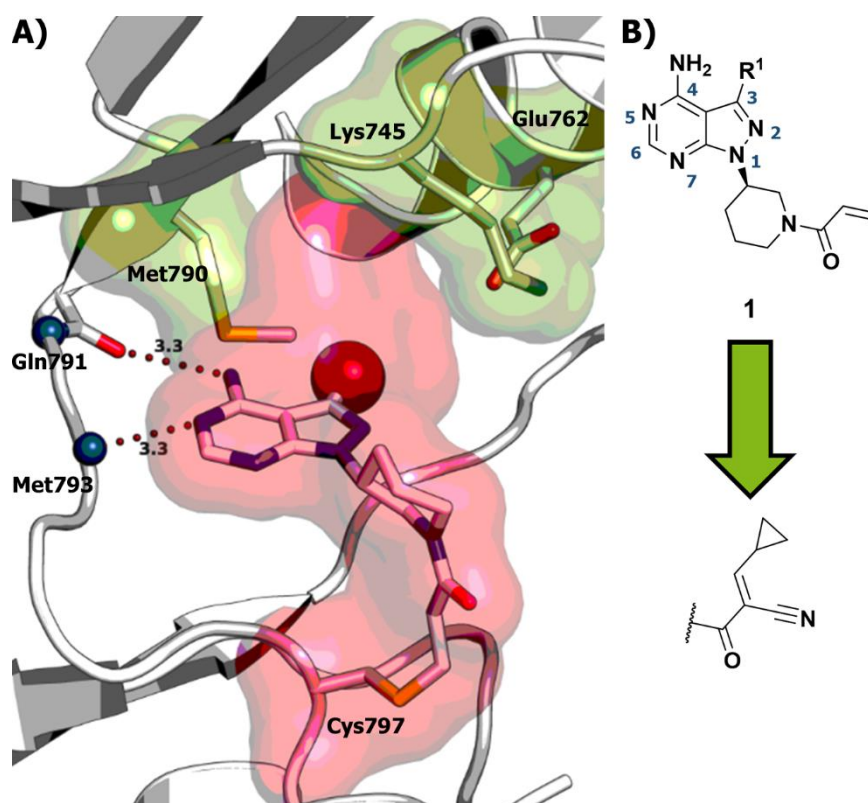


Abbildung 20A) Grafische Darstellung des rationalen Designs der zu synthetisierenden EGFR-Inhibitoren (PDB: 5j9y) basierend auf dem Pyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidin Grundgerüst (**1**). **B)** Chemische Struktur der von Dr. DEBJIT BASU im Arbeitskreis etablierten Modifikation zur kovalent-reversiblen Adressierung von Cys797 in EGFR.

Des Weiteren sollten neuartige Akt Interdomänen-Inhibitoren entwickelt werden. Hierfür wurden zwei Ansätze gewählt. Zunächst sollte ausgehend von Hitverbindungen aus einer Hochdurchsatzdurchmusterung eine fokussierte Substanzbibliothek aus dreifach substituierten Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidinen (**2**) synthetisch dargestellt werden (Abbildung 21).¹¹⁶ Diese Substanzbibliothek sollte in Zusammenhang mit ihrer biochemischen Charakterisierung einen tieferen Einblick in die Struktur-Aktivitätsbeziehung (SAR) der neuartigen Akt-Inhibitoren gewähren. Bei erfolgreicher Synthese potenter Inhibitoren mit einer eindeutigen SAR sollte zudem die Möglichkeit untersucht werden die Verbindungen so zu modifizieren, dass eine Adressierung von Cys296 in der Kinasedomäne von Akt ermöglicht wird.

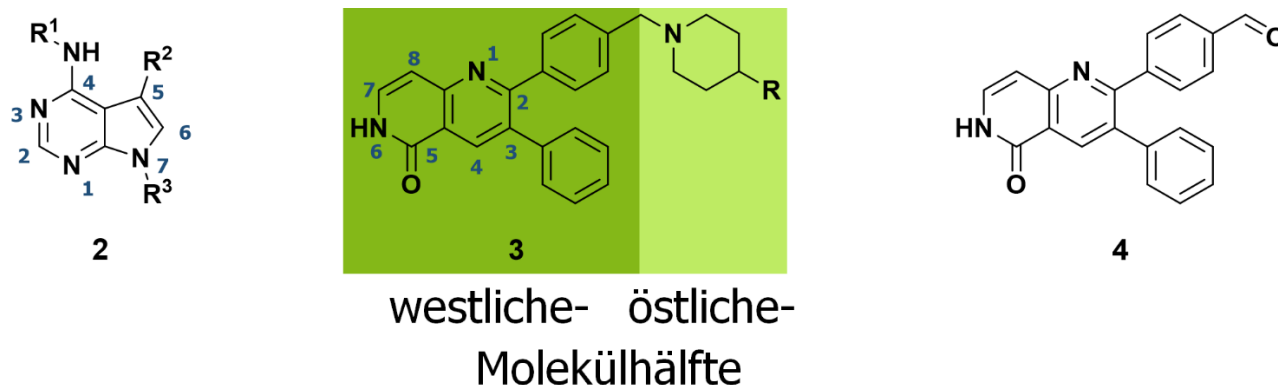


Abbildung 21 Chemische Struktur der in dieser Arbeit zu generierenden Interdomänen-Inhibitoren für Akt.

Zusätzlich sollte eine Syntheseroute, basierend auf Arbeiten von WEISNER und GONTLA *et al.*, zur Generierung von kovalenten 1,6-Naphthyridon-Inhibitoren (**3**) optimiert werden (Abbildung 21).¹¹⁷ In einer genauen Betrachtung der einzelnen Syntheseschritte konnten zwei kritische Stufen identifiziert werden, welche im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Ausbeute optimiert werden sollten. Bei der Generierung der westlichen Molekülhälfte (**4**, Abbildung 21) sollte eine Möglichkeit gefunden werden, welche neben der erhöhten Ausbeute auch eine bessere Skalierbarkeit der Reaktion ermöglicht. Die Reduktive Aminierung welche westliche und östliche Molekülhälfte verbindet sollte ebenfalls optimiert werden, da hier die größten Ausbeuteverluste zu verzeichnen waren. Nach der Optimierung der Syntheseroute sollte die fokussierte Substanzbibliothek biochemisch und zellbiologisch charakterisiert werden.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden nun die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Ergebnisse in ihrer Gänze präsentiert und diskutiert. In Abschnitt 3.1 soll der strukturbasierte Ansatz zur Entwicklung neuartiger EGFR-Inhibitoren mit kovalentem Bindungsmodus präsentiert werden. Davon ausgehend wird das Design und die Synthese von kovalent-reversiblen EGFR-Inhibitoren präsentiert, sowie die Entwicklung und Etablierung der Methodik zur Charakterisierung der Bindung mittels Massenspektrometrie (siehe Abschnitt 3.1.9). Des Weiteren wird ab Abschnitt 3.2 die strukturbasierte Entwicklung neuartiger Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-basierter Akt-Inhibitoren behandelt sowie die Optimierung der Syntheseroute und der Aufbau einer fokussierten Substanzbibliothek von 1,6-Napthyridon-basierter Inhibitoren zur kovalent-allosterischen Inhibition von Akt.

3.1 EGFR-Inhibitoren

3.1.1 Aufbau EGFR und zielgerichtete Wirkstofftherapie

Von weltweit 2012 gemeldeten Krebserkrankungen konnten 13 % als Lungenkarzinome identifiziert werden.¹¹⁸ Betrachtet man das Krankheitsbild ‚Lungenkarzinom‘ genauer konnten 80 % dem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC) zugeordnet werden. In absoluten Zahlen sind zwischen 2007 und 2011 226.000 NSCLC-Fälle in den USA dokumentiert.¹¹⁹ Ein Großteil der NSCLC-Fälle (62 %) lässt sich auf eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) zurückführen, welche mit einer Amplifikation auf chromosomaler Ebene assoziiert ist.¹²⁰⁻¹²³ EGFR gehört zu einer untereinander eng verwandten Klasse von Rezeptortyrosinkinasen (RTK), welche über den RAS-RAF-MEK-ERK und den PI3K-AKT-mTOR Signalweg einen essentiellen Teil der Prozesssteuerung in Zellen übernehmen.¹²³⁻¹²⁵ Wie die meisten der RTKs dient EGFR auch als molekularer Schalter zwischen extrazellulären Signalgebern wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und der intrazellulären Signalkaskade.¹²³ Durch diese prominente Position im Zellzyklus kann eine Fehlregulierung der RTKs schnell zu einer malignen Mutation der Zelle führen, so wird auch in den verschiedensten Krebsarten, z. B. Kopf/Hals, Eierstock, Gebärmutterhals, Gebärmutter Schleimhaut, Blase, Speiseröhre, Bauch, Hirn, Brust, Darm und Lunge ein erhöhtes Niveau der Expression von EGFR vorgefunden.^{121,123,126} Die mit NSCLC assoziierte Punktmutation EGFR^{L858R} führt durch Änderung der Mikroumgebung in der Aktivierungsschleife zu einer erheblichen Konformationsänderung der Kinasedomäne und damit zu einer erhöhten Kinaseaktivität, welche die nachgeschalteten Überlebenssignale hochreguliert und EGFR damit onkogene Eigenschaften verleiht.^{123,127-128} Neben der fast 50-fachen Erhöhung der Aktivität im Vergleich zu EGFR^{WT} ist bei der Aktivierungsmutation EGFR^{L858R} die sonst bei EGFR übliche asymmetrische Dimerisierung nicht nötig um ein Signal weiterzuleiten.¹²⁹⁻¹³¹ Ein Vergleich der K_M -Werte von ATP für EGFR^{WT} und EGFR^{L858R} zeigte, dass die Punktmutation in einer geringeren Affinität von ATP zur Kinase resultiert.¹³⁵⁻¹³⁶ Dies

wiederrum bedingt eine erhöhte Sensitivität von EGFR^{L858R} gegenüber Kinaseinhibitoren welche die ATP Bindetasche adressieren.^{123,132} Eine retrospektive Analyse ergab, dass die, auf einem Chinazolin-Grundgerüst basierenden, reversiblen Inhibitoren Erlotinib³³ und Gefitinib³⁴ (siehe Abbildung 22) eine Ansprechrate von bis zu 80 % zeigen konnten und dabei das progressionsfreie Überleben der Patienten im Schnitt verdoppeln (9.7 vs. 5.2 Monate).^{115,133-134} Durch die genau definierte Läsion und deren Sensitivität gegenüber Kinaseinhibitoren wurde es möglich weitere maßgeschneiderte Inhibitoren zu entwickeln, welche eine Verbesserung gegenüber klassischen Behandlungsmethoden boten.^{128,133-136}

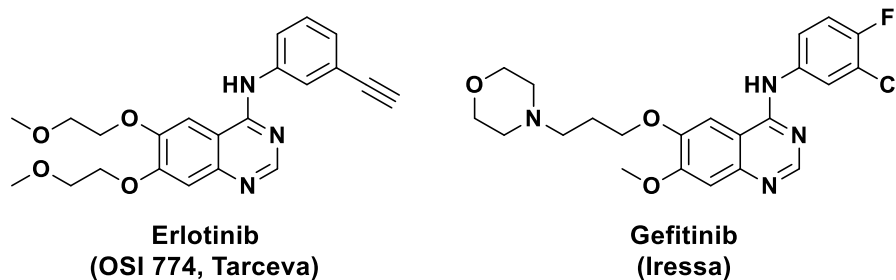


Abbildung 22 Chemische Struktur der beiden zugelassenen reversiblen EGFR Inhibitoren.

Jedoch konnte innerhalb von 6 – 12 Monaten nach Behandlungsstart in allen Patienten eine aufkommende Resistenz gegenüber der ersten Wirkstoff-Generation beobachtet werden.¹²³ Diese konnte in über 50 % der Fälle als eine Mutation der Türsteher-Aminosäure identifiziert werden. Durch die Mutation des relativ kleinen Threonin-790 zu einem raumgreifenden Methionin ändert sich die Form und Größe der Inhibitorbindetasche in dramatischer Weise.^{123,137-138} Neben der geänderten Topographie der Bindetasche konnte festgestellt werden, dass EGFR^{T790M} eine Ligandenunabhängige konstitutionelle Aktivität aufweist.^{123,137} Ein weiterer Grund, warum EGFR^{T790M} im Gegensatz zu EGFR^{L858R} nicht mehr wirkstoffsensitiv ist, ist die Wiederherstellung der Affinität der Kinase zu ATP, welche in EGFR^{T790M} ein annähernd hohes Niveau wie in der Wildtyp Kinase erreicht.^{82,139-140}

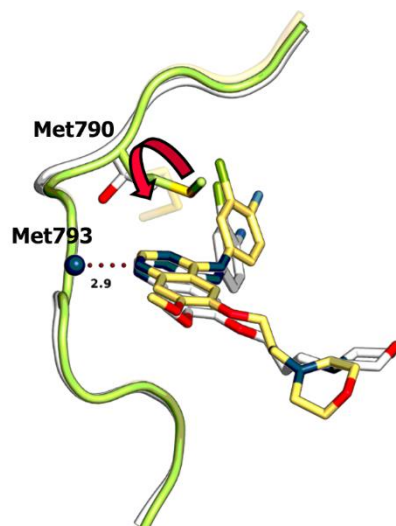


Abbildung 23 Grafische Darstellung der Konformations- und Bindungspositionsänderung von Gefitinib durch die Türsteher-Mutation T790M. Die Bindungspose von Gefitinib in EGFR^{WT} (weiß, PDB: 2ity) würde zu einer sterischen Repulsion mit Met790 (grün, PDB: 3ug1) führen, was in einer Repositionierung von Gefitinib in der Scharnierregion von EGFR^{T790M} führt sowie zu einer Rotation der Aminosäureseitenkette von Met790 (gelb, PDB: 3ug2).⁸² (Adaptiert von ENGEL und LATEGAHN *et al.* Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 2 – 5).

Durch die aufkommende Resistenzmutation war es nötig eine neue Generation von Wirkstoffen zu entwickeln. Es zeigte sich, dass die Einführung elektrophiler Gruppen für die Reaktion mit dem in der Bindetasche befindlichen Cys797 das beste Ergebnis hervorbringt.¹⁴¹⁻¹⁴² Die initialen Versuche das bereits etablierte Chinazolin-Grundgerüst mit einem Michael-Akzeptor zu versehen lieferten erste vielversprechende Ergebnisse vor allem mit der Entwicklung des Wirkstoffs Afatinib³⁵ (Abbildung 24). Hierbei traten jedoch auch eine Vielzahl von Nebenwirkungen auf, da neben der Resistenzmutation auch die Wildtyp Kinase stark inhibiert wird.^{141,143} Dieses Selektivitätsproblem konnte durch ein Wechsel des Grundgerüsts von einem Chinazolin zu einem Pyrimidin umgangen werden, wie in den Inhibitoren Osimertinib³⁷ (als TagrissoTM durch die FDA zugelassen)¹⁴⁴ oder Rociletinib^{36, 36,145-146}

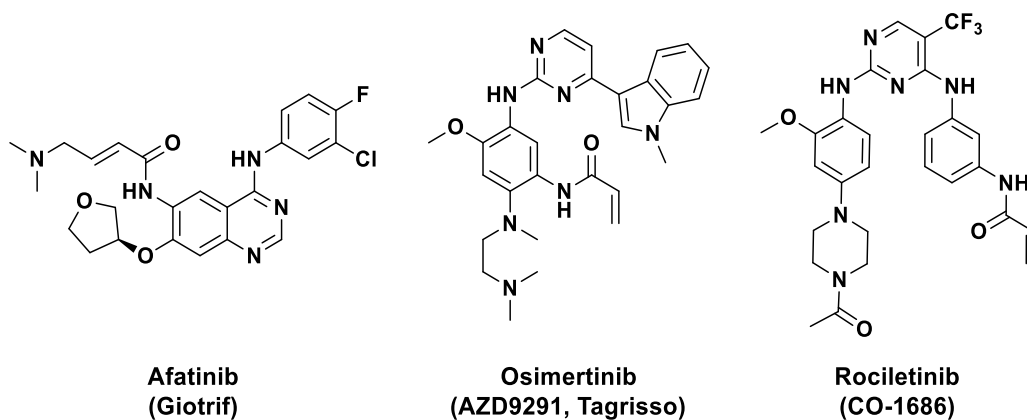


Abbildung 24 Übersicht einiger kovalenter EGFR Inhibitoren.

Mittlerweile wurden weitere Resistenzmutationen entdeckt.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸ Diese Mutationen treten vornehmlich am nukleophilen Zentrum Cys797 auf, wobei der Austausch zu Glycin oder Serin hierbei die am häufigsten beobachteten Mutationen sind.¹⁴⁵ Durch die Punktmutation C797S wird die Ausbildung der kovalenten Bindung der neueren Inhibitor-Generationen an die Kinase verhindert, da die Serin-Seitenkette unter physiologischen Bindungen keine Michael-Addition eingehen kann.^{82,147} Im Fall von Osimertinib konnte nach 23 Wochen Behandlung eine wiederaufkommende Progression im Krankheitsverlauf beobachtet werden.¹⁴⁷ Bei genaueren zellbasierten Untersuchungen zeigte sich, dass 40 % der wirkstoffresistenten Zellen eine EGFR^{T790M/C797S}-Mutation aufweisen, was zu einem erheblichen Verlust der Sensitivität für alle bisher bekannten kovalenten EGFR-Inhibitoren führte.^{145,147}

Diese Entwicklung zeigt deutlich, dass ein großer Bedarf an einer kontinuierlichen Weiter- und Neuentwicklung der EGFR adressierenden Kinaseinhibitoren von Nöten ist.^{145,149}

3.1.2 Strukturbasiertes Design der Zielverbindungen

Die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen basieren auf den in dieser Arbeitsgruppe bereits dargestellten Verbindungen (**1a** – **e**, siehe Abbildung 25C).¹⁵⁰ Sowie der Erkenntnissen, die aus der erfolgreichen Auflösung mehrerer Kristallstrukturen (Abbildung 25A, B) dieser Verbindungsklasse im Komplex mit EGFR^{T790M} durch Dr. CHRISTIAN BECKER gewonnen wurden.¹⁵¹

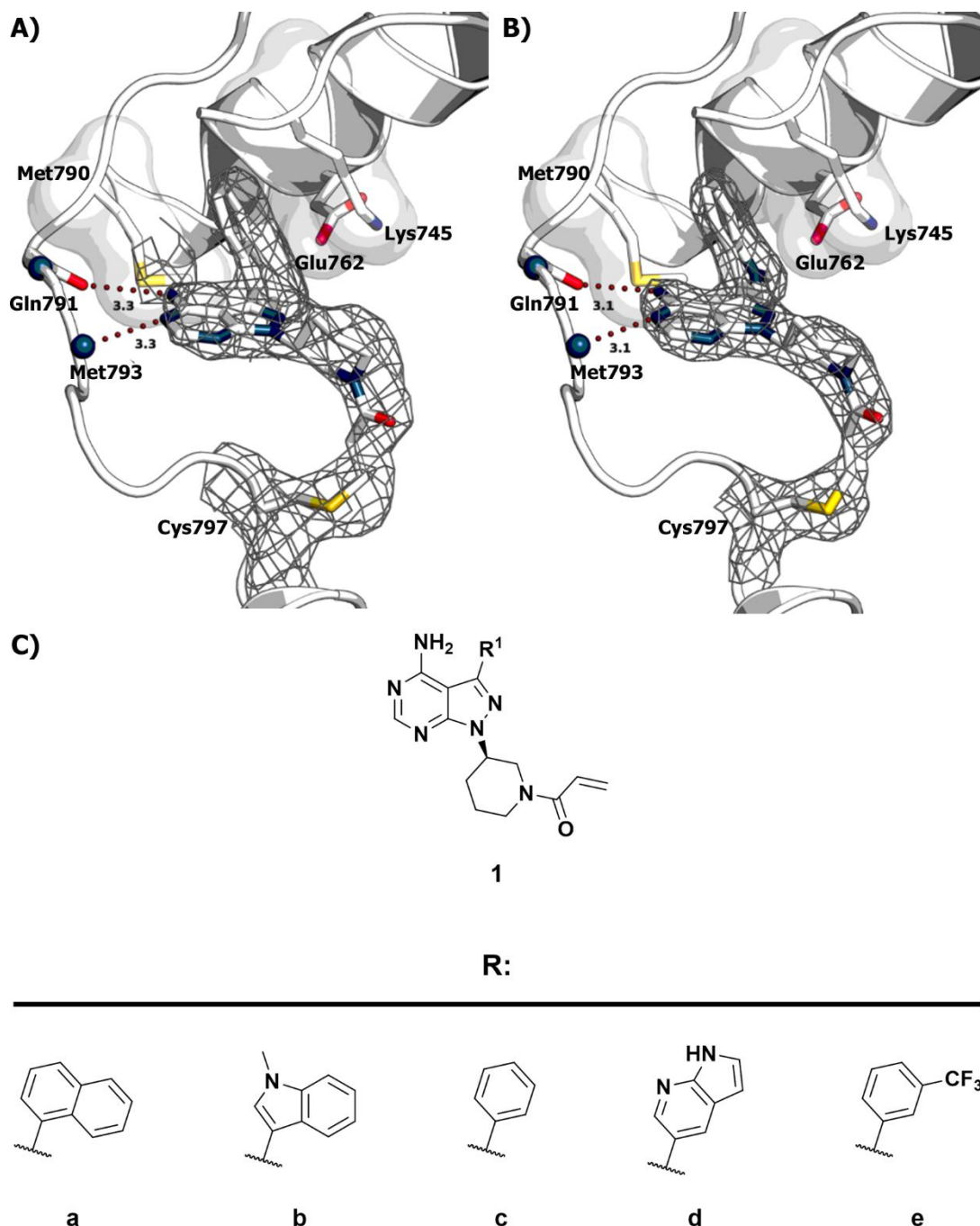


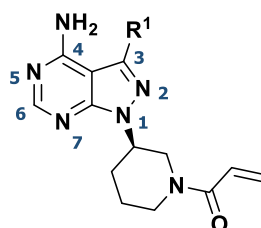
Abbildung 25 Kristallstrukturen von **1a** (A, PDB: 5j9y) und **1b** (B, PDB: 5y9z) jeweils in EGFR^{T790M}. Wasserstoffbrückenbindungen mit der Scharnierregion (weiß) dargestellt als rote Punkte.¹¹⁵ C) Struktur der bereits von ENGEL synthetisierten kovalenten EGFR-Inhibitoren.^{150,152}

Unter Berücksichtigung beider Arbeiten und einer Untersuchung der in der Klinik befindlichen Wirkstoffen konnten folgende drei Punkte als essentiell für eine inhibitorische Aktivität von kovalenten Inhibitoren auf EGFR^{L858R/T790M} abgeleitet werden:⁸²

- (i.) Um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden, sollten die generierten Inhibitoren eine hohe Selektivität für die verschiedenen Mutationen und eine minimale Inhibition der Wild-Typ Kinase aufweisen.
- (ii.) Die Wahl des Inhibitor-Grundgerüsts sollte eine Orientierung der variablen Substituenten in Richtung der Türsteher-Aminosäure Met790 gewährleisten, ohne eine sterische Repulsion zu induzieren.
- (iii.) Ferner sollte das Grundgerüst eine geeignete Ausrichtung des reaktiven Elektrophils zu Cys797 gewährleisten.

Das in der medizinisch-chemischen Forschung oft verwendete Grundgerüst der 4-Aminopyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidine ist ein seit 20 Jahren etabliertes Strukturmotiv um eine solide Interaktion über mehrere Wasserstoffbrücken mit der Scharnierregion von verschiedensten Kinasen zu erzielen. Einer der ersten selektiven Kinaseinhibitoren wurde 1996 von HANKE *et al.* für die Familie der Src-Kinasen präsentiert. Der Inhibitor PP1¹⁵³ diente mit seinem Substitutionsmuster für eine Vielzahl von Kinaseinhibitoren als Startpunkt zur weiteren Entwicklung. Eine dieser resultierte in dem BTK-Inhibitor Ibrutinib (Abbildung 17) welcher Cys481 kovalent modifiziert.⁷¹ Strukturelle Analysen zeigten, dass Cys797 in EGFR an gleicher Stelle in der Scharnierregion lokalisiert ist und das chemische Grundgerüst damit als guter Startpunkt für weitere Entwicklungen dienen kann.¹¹⁵ Die von Dr. CHRISTIAN BECKER gelöste Kristallstruktur zeigte zudem, dass große bityklische Reste an Position 3 des Aminopyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidins (**1a** und **1b**, Abbildung 25A, B) innerhalb der Bindetasche in einer Weise ausgerichtet sind, dass sie sich perfekt in den Zwischenraum zwischen Met790 und Lys745 einfügen und dadurch zusätzlich in der Bindetasche fixiert werden.^{115,151} Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun durch weitere Derivatisierung der 3-Position eine deutlich detailliertere SAR herausgearbeitet werden (siehe Abbildung 26). Unter Berücksichtigung der in ENGEL und BECKER *et al.* gewonnenen Erkenntnisse wurden diverse unterschiedlich substituierte Verbindungen entworfen, wobei ein deutlicher Fokus auf die möglichst maximale Raumerfüllung der Tasche hinter Met790 gelegt wurde.¹¹⁵ Zu Vergleichszwecken wurden monozyklische Substituenten entworfen, die verschiedene *meta*- bzw. *para*-substituiert Fluor-Gruppen tragen, sowie eine Verbindung, die keinen Substituenten in 3-Position trägt. Die Möglichkeit eine erhöhte Affinität zu erzielen sollte durch die Interaktion mit Lys745 untersucht werden. Hierzu wurde die *Hit*-Verbindung **1a** so modifiziert, dass sie durch Einführung weiterer Substituenten eine erhöhte bzw. erniedrigte Elektronendichte an Position 3 aufweist. Die Einführung solcher Gruppen sollte einen deutlichen Einfluss auf die Fähigkeit der Ausbildung von Kationen- π -Wechselwirkungen haben.¹⁵⁴ In der Theorie

sollten besonders elektronenarme Ringsysteme eine deutlich schwächere Wechselwirkung mit positiv-geladenen Seitenketten eingehen und dadurch auch eine verringerte Affinität als die elektronenreichen Referenzverbindungen aufweisen. Im Hinblick auf das weitere Entwicklungspotential der hier generierten Verbindungen sollten zudem Verbindungen generiert werden, welche die Exklusion der Türsteher-Aminosäure nicht durch Einführung von aromatischen Verbindungen erzielt, sondern durch die sterisch anspruchslosere aber extrem rigide Alkin-Verknüpfung.



1

R:

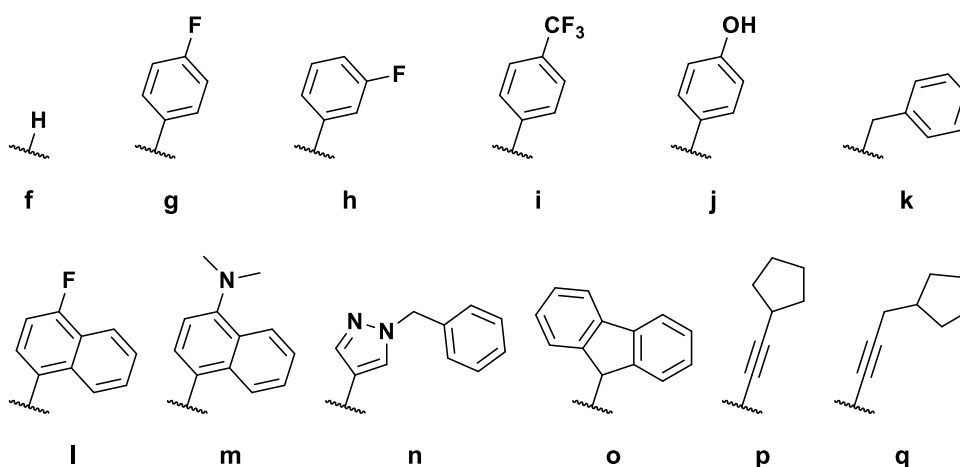


Abbildung 26 Das dem rationalen Design zugrunde liegende Grundgerüst **1** und einzuführenden Substituenten zur kovalenten Inhibition von EGFR.

BASU *et al.* synthetisierten, aufbauend auf dem bekannten kovalenten EGFR-Inhibitor WZ4002¹⁴⁶, Verbindungen, welche einen kovalent-reversiblen Bindungsmodus aufweisen (**5**, Abbildung 27).¹⁵⁵ Durch die Adressierung von Cys797 der dort beschriebenen Verbindungen sollte es auch nach einem Wechsel des Grundgerüsts zum hier verwendeten 4-Aminopyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidin möglich sein kovalent-reversible bindende Inhibitoren zu synthetisieren. Zu diesem Zweck sollten im Rahmen dieser Arbeit zu einer kleinen Auswahl kovalenter Analoga die korrespondierenden kovalent-reversiblen Derivate dargestellt werden. Die Auswahl des kovalent-reversiblen reaktiven Zentrums erfolgte hierbei basierend auf den Erkenntnissen, die durch BASU *et al.* gewonnen wurden.¹⁵⁵

Die Bestimmung der optimal zu verwendenden Substituenten in 3-Position (vgl. Abbildung 26) sollte nach Evaluation der kovalenten Inhibitoren in einem biochemischen Testsystem erfolgen.

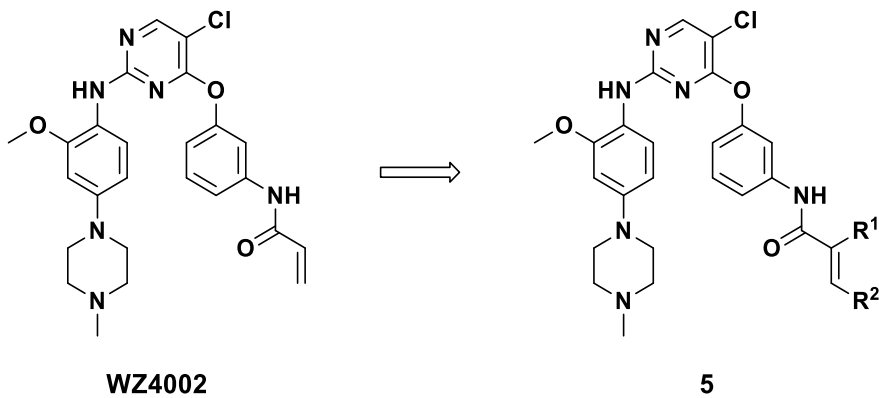
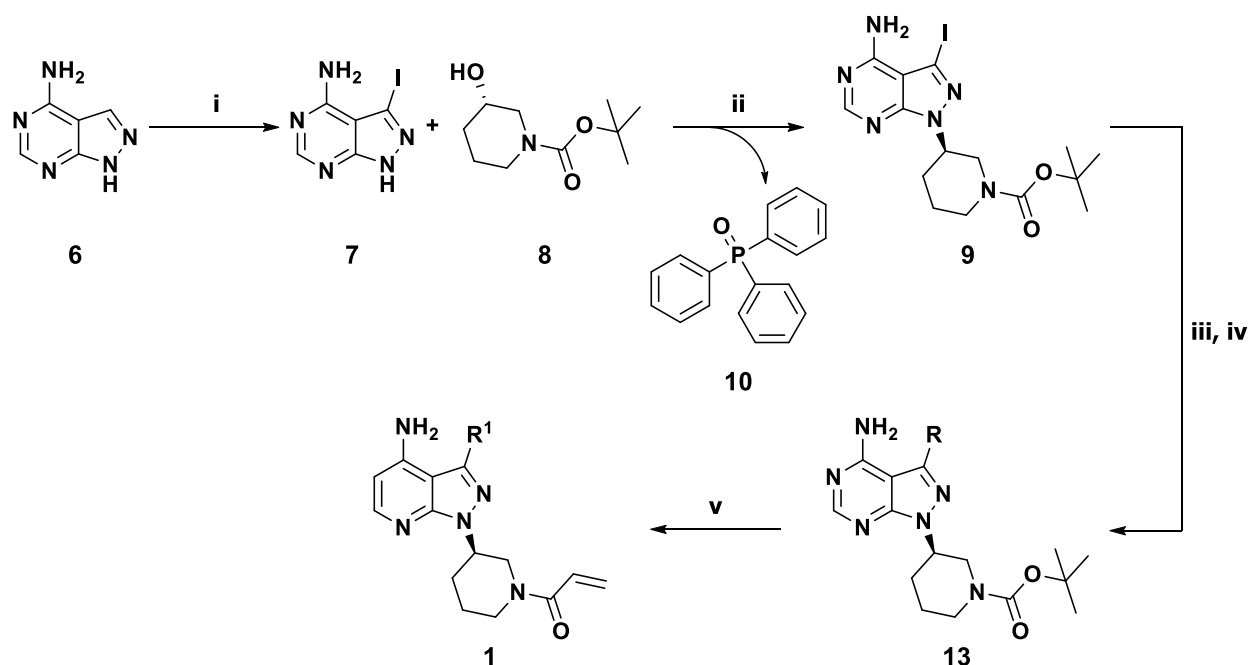


Abbildung 27 Generelle Struktur der von Dr. DEBJIT BASU dargestellten, auf WZ4002 basierenden kovalent-reversiblen Inhibitoren.¹⁵⁵

3.1.3 Synthese der Wirkstoffbibliothek

Für die in Abschnitt 3.1.2 präsentierten Zielverbindungen konnte eine bereits optimierte fünfstufige Syntheseroute (siehe Schema 1) in Anlehnung an bereits literaturbekannte Vorschriften verfolgt werden.^{93,115} Im initialen Schritt der Syntheseroute wurde das kommerziell erhältliche 4-Aminopyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidin (**6**) iodiert um die für die Derivatisierung notwendige Verknüpfungsstelle an Position 3 zu generieren. Um eine leichtere Handhabbarkeit zu gewährleisten wurde *N*-Iodsuccinimid (NIS), im Gegensatz zu elementarem Iod, als Halogenierungsreagenz genutzt. Durch Erhitzen von **6** in Gegenwart von NIS in DMF über Nacht und anschließendem Ausfällen des gewünschten Produkts **7** konnten Ausbeuten von bis zu 99 % (ohne weitere Aufarbeitung) generiert werden.

Schema 1 Synthese kovalent bindender 4-Aminopyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidin-Derivate.^a



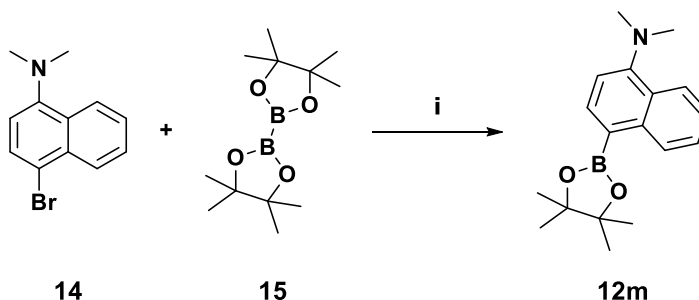
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) NIS, DMF, 80 °C; (ii) (*S*)-1-Boc-3-hydroxypiperidin, DIAD, PPh₃, THF, rt; (iii) Boronsäure/-pinakolester, Pd(PPh₃)₄, ges. Na₂CO₃, DME/EtOH (3:1, v/v), 90 °C; (iv) CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, Et₃N, rt; (v) 1. TFA in DCM, rt; 2. Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C.

Um eine passende Orientierung des reaktiven Elektrophils in Relation zu Cys797 zu gewährleisten wurde (*S*)-1-Boc-3-hydroxypiperidin (**8**) mittels MITSUNOBU Kupplungsreaktion eingeführt.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ In Einklang mit dem etablierten Mechanismus¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ konnte demnach unter Inversion des stereogenen Zentrums am C3-Kohlenstoff des Piperidin-Linkers, Produkt **9** mit Ausbeuten zwischen 24 und 54 % erhalten werden. Die stark schwankenden, sowie geringen Ausbeuten konnten mit der anspruchsvollen Aufreinigung des entstehenden Rohprodukts erklärt werden. In allen Reaktionsansätzen konnte eine nahezu vollständige Umsetzung zu **9** beobachtet werden, zusätzlich zu den in der Reaktionsmischung enthaltenen Edukten musste das durch den

Reaktionsmechanismus entstehende Triphenylphosphinoxid (**10**) säulenchromatographisch mühsam abgetrennt werden. Durch eine stetige Verfeinerung der Methode in der automatisierten Säulenchromatographie konnte die Ausbeute sukzessive von 24 % auf 54 % erhöht werden. Außerdem konnte durch die automatisierte Chromatographie nicht abreagiertes Edukt **7** wiedergewonnen werden. Ausgehend von dem im größeren Maßstab (bis zu 5 g) dargestellten gemeinsamen Vorläufermolekül **9** wurde anschließend durch Einführung verschiedener Substituenten mittels SUZUKI-Kupplung¹⁶⁰⁻¹⁶² mit der Derivatisierung begonnen.

Für die Palladium-katalysierten Kupplungsreaktionen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Boronsäuren (**11**) und Boronsäurepinakolester (**12**) eingesetzt. Hierbei wurden zwei Wege beschrieben um die angestrebten Zielverbindungen (**13g – o**) zu generieren (siehe Tabelle 1). Diese unterscheiden sich vor allem in der gewählten Methode der Energiezufuhr. In Variante A wird die Reaktionsmischung durch einen Heizrührer erhitzt, während in Syntheseweg B die Energiezufuhr durch eine Mikrowellenapparatur erfolgt. Die Aufarbeitung beider Reaktionswege erfolgte wiederum gleich. Die Ausbeuten der SUZUKI-Reaktion schwankten dabei stark zwischen 41 und 93 %.

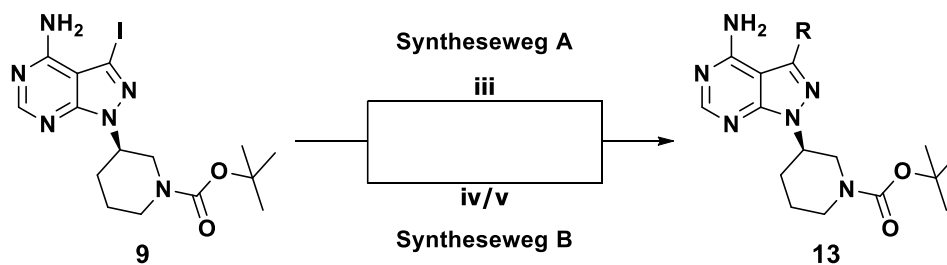
Schema 2 Synthese des für die SUZUKI-Kupplung nötigen Boronsäurepinakolesters **12m**.^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) *n*-Butyllithium, THF, -78 °C auf rt.

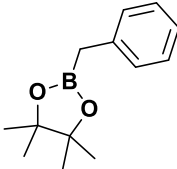
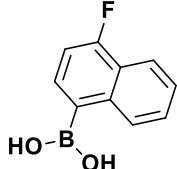
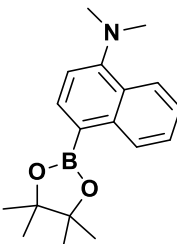
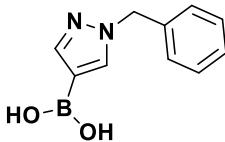
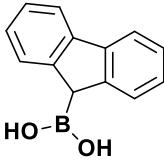
Der für die Synthese von **13m** notwendige Boronsäurepinakolester **12m** wurde über das korrespondierende Bromid **14** durch eine *n*-Butyllithium vermittelte Substitution mit Bis(pinakolato)diboron (**15**) dargestellt (siehe Schema 2).¹⁶³ Das nach saurer Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde in der anschließenden SUZUKI-Kupplung ohne weitere Aufarbeitung verwendet, da bei mehreren Versuchen der säulenchromatographischen Aufreinigung keine adäquate Trennung erzielt werden konnte.

Tabelle 1 Übersicht der verschiedenen Reaktionswege und Derivate, welche in der SUZUKI-Kupplung verwendet wurden, inkl. der dazugehörigen Ausbeuten.^a



^a Reagenzien und Bedingungen: **A:** (iii) Boronsäure/-pinakolester, Pd(PPh₃)₄, ges. Na₂CO₃, DME/EtOH (3:1, v/v), 90 °C. **B:** (iv) Boronsäure/-pinakoleseter, Pd(dppf)Cl₂, Cs₂CO₃, Dioxan/H₂O (1:1, v/v), 145 °C, MW, 30 W; Boronsäure/-pinakolester, Pd(PPh₃)₄, ges. Na₂CO₃, DME/EtOH (3:1, v/v), 180 °C, MW, 30 W.

Syntheseweg	Verbindung	Ausbeute
A	 11g	81 %
A	 11h	48 %
A	 12i	82 %
A	 12j	93 %

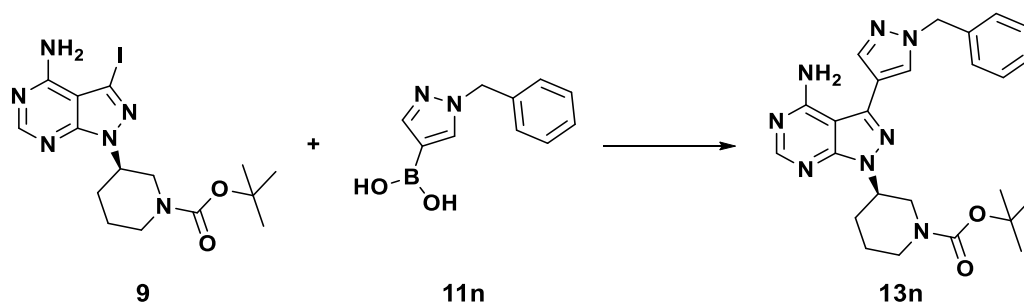
B	 12k	63 %
B	 11l	77 %
A	 12m	41 %
B	 11n	n.b.*
-	 11o	n.b.*

* n.b., nicht bestimmbar.

Generell ließ sich feststellen, dass die Reaktionen unter Mikrowelleneinstrahlung mit weniger Nebenprodukten und höheren Ausbeuten verliefen (durchschnittlich 84 % im Vergleich zu 51 % im Kolben), jedoch ist nicht auszuschließen, dass dies zufällig und durch eine glückliche Wahl der eingesetzten Boronsäure/-pinakolsäureester hervorgerufen wurde. Die Synthese von **13n** konnte unter den bisher verwendeten Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich abgeschlossen werden, da Boronsäure **11n** eine nur sehr geringe Reaktivität unter den angewendeten Bedingungen aufwies. Untersuchungen mittels LC-MS ergaben, dass im Verlauf der Reaktion keine Umsetzung des Edukts **9** stattfand. Eine Variation in den Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 2) zur Verbesserung der Reaktivität durch Variation der Energiezufuhr oder Anpassung des Katalysatorsystems konnte

ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt führen. Eine genaue Analyse per NMR-Spektroskopie der verwendeten Boronsäure zeigte eine geringe Stabilität, die vermutlich zu einer vollständigen Zersetzung während der Reaktion führt.

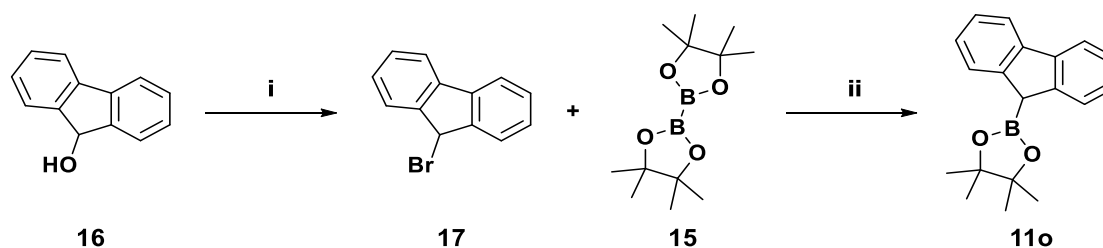
Tabelle 2 Variationen der Reaktionsbedingung zur Darstellung von **13n**.



N°	Katalysator	Base	Bedingungen	Ausbeute
1	Pd(PPh ₃) ₄	Na ₂ CO ₃	DME/EtOH, 20 min, 130 °C, MW, 30 W	-
2	Pd(PPh ₃) ₄	Na ₂ CO ₃	DME/EtOH, 18 h, 90 °C	-
3	Pd(dppf)Cl ₂	Cs ₂ CO ₃	1,4-Dioxan/H ₂ O, 20 min, 145 °C, MW, 30 W	-
4	Pd(dppf)Cl ₂	NaOH	1,4-Dioxan, 3 min, 170 °C, MW, 30 W	-

Im Falle des an Fluoren angelehnten trizyklischen Derivats **13o** musste aus Ermangelung an kommerzieller Verfügbarkeit **11o** in einer zweistufigen Synthese aus 9*H*-Fluoren-9-ol (**16**) dargestellt werden (Schema 3). Basierend auf einer von WANG *et al.* vorgestellten Syntheseroute wurde **16** mittels PBr₃ in DCM bromiert.¹⁶⁴ Nach erfolgreicher Umkristallisation aus Petrolether konnte die gewünschte Verbindung in mäßigen Ausbeuten von bis zu 38 % erhalten werden.

Schema 3 Synthese des Fluorenderivats **11o**^a.



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) PBr₃, ges. NaHCO₃, DCM, 0 °C; (ii) *n*-Butyllithium, THF, -78 °C auf rt.

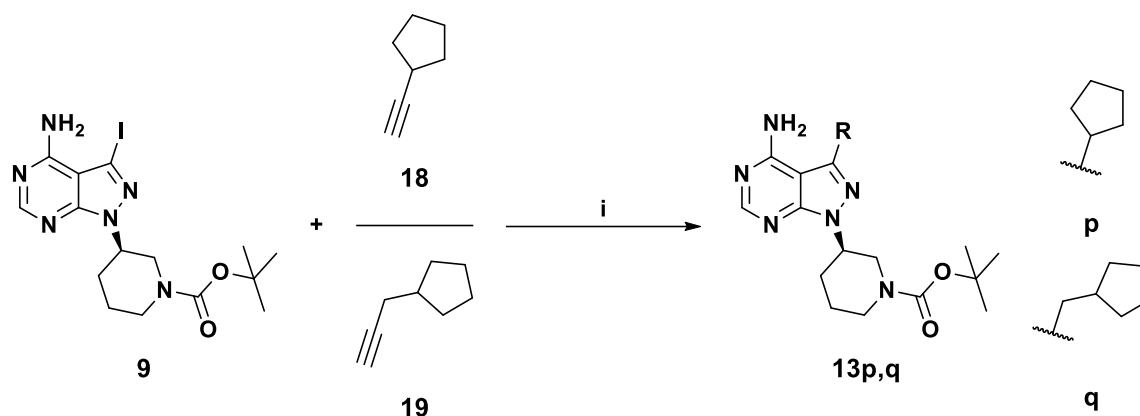
Zur Darstellung des Boronsäurepinakolesters **11o** wurden nun zunächst die für **12m** etablierten Bedingungen genutzt (Tabelle 3, Schema 3). Die Synthese des lithierten Intermediats und die *in situ* Substitution mit **15** konnten weder mittels Dünnschichtchromatographie oder LC-MS-Analyse nachgewiesen werden. Anschließend wurde versucht über eine palladium-katalysierte MIYAUURA-Borylierung^{159,165} zur gewünschten Verbindung **11o** zu gelangen. Auch hier konnte keine Umsetzung zu Produkt **11o** beobachtet werden. Im Reaktionszyklus der MIYAUURA-Borylierung stellt die Insertion des Halogens an den Katalysator den wichtigsten Schritt dar. Dieser findet besonders effektiv bei aromatischen Halogenen statt, im Fall von **17** könnte die doppelt benzyliche Position zur ungenügenden Insertion führen und damit die weitere Reaktion zum gewünschten Produkt blockieren.¹⁵⁹ Weiterhin wurde versucht über eine Kupfer-katalysierte Reaktion das gewünschte Produkt zu erhalten doch leider konnte auch hierbei **11o** nicht dargestellt werden.¹⁶⁶ Da eine Insertion von **17** an verschiedenste Metallkatalysatoren, wahrscheinlich aufgrund der benzylichen Position, nicht möglich erscheint und auch die sonst standardmäßig angewendete Reaktionsführung über ein organometallisches Intermediat keinen Erfolg brachte, wurde im weiteren Verlauf auf die Synthese von **11o** verzichtet.

Tabelle 3 Variationen der Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **11o**.

N°	Lösungsmittel	Reagenzien	Bedingungen	Ausbeute
1	THF	15 , <i>n</i> -Butyllithium	0 °C, 2 h und RT, 12 h	-
2	Dioxan	15 , Pd(dppf)Cl ₂ , KOAc	110 °C, 19 h	-
3	DMF	15 , CuI, PPh ₃ , NaOMe	RT, 18 h	-

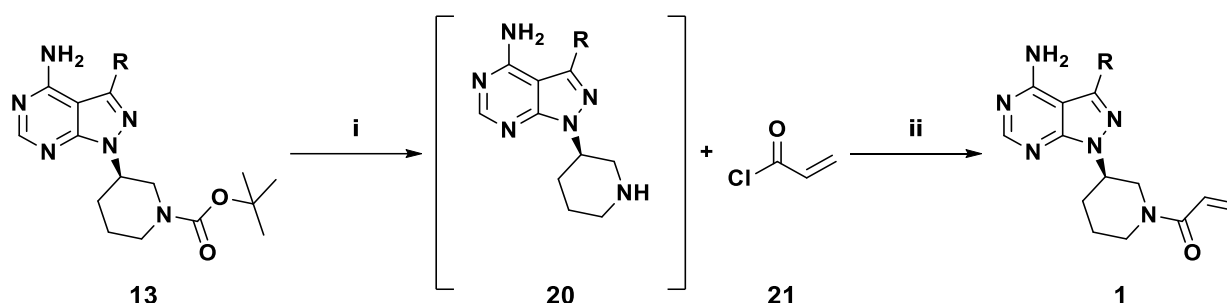
Zur Darstellung von **13f** wurde auf den Einsatz eines Boronsäurederivats ersatzlos verzichtet, wodurch es analog des Mechanismus der SUZUKI-Kupplung nach der Metathese zu keiner Transmetallierung kommen konnte was effektiv zu einer Eliminierung des Iods zu **13f** führte.

Die Alkin-tragenden Derivate **13p** und **13q** wurden im Gegensatz zu den bisher präsentierten Verbindungen (**13g** – **m**) über eine SONOGASHIRA-Kupplung^{159,167-168} erhalten (Schema 4). Die hierfür eingesetzten Alkine **18** und **19** wurden jeweils unter Katalyse von Kupfer(I)-iodid und Bis(triphenylphosphin)palladium(II) dichlorid mit **9** zur Reaktion gebracht. Beide Reaktionen verliefen in hohen Umsätzen ab, sodass nach schneller säulenchromatographischer Aufreinigung Ausbeuten von über 70 % für **13p** und **13q** erzielt werden konnten.

Schema 4 SONOGASHIRA-Kupplung zur Darstellung von **13p** und **13q**.^a

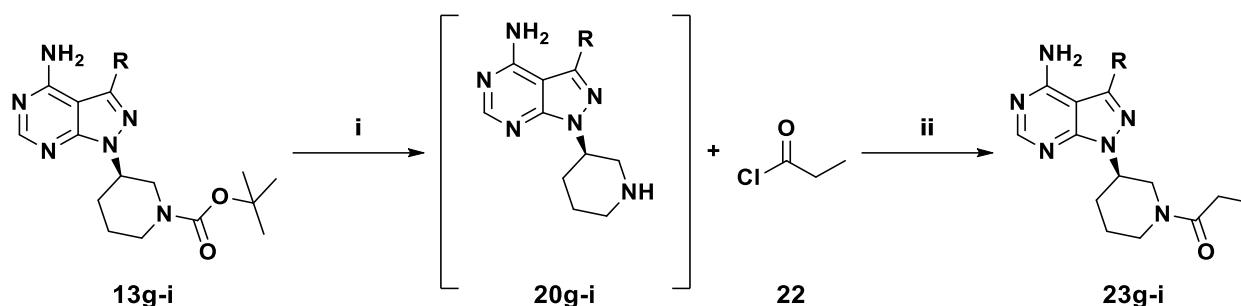
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) CuI, (PPh₃)PdCl₂, Et₃N, THF, rt.

Anschließend wurden die bisher erfolgreich dargestellten Derivate (**13f – n**, **p** und **q**) mit Hilfe von Trifluoressigsäure (20 % in DCM) Boc-entschützt (Schema 5). Die so dargestellten sekundären Amine **20** wurden nach basischer Aufarbeitung ohne weitere Aufreinigung direkt in trockenem THF gelöst. Die folgende Amidknüpfung von **20** und Acrylylchlorid (**21**) erfolgte bei 0 °C für 30 min mit DIPEA als Base. Nach wässriger Extraktion und Aufreinigung konnten die Pyrazolpyrimidin-Derivate **1f – n**, **p** und **q** mit Ausbeuten zwischen 20 – 65 % (über zwei Schritte) erhalten werden.

Schema 5 Reaktionskaskade zur Darstellung der kovalenten EGFR-Inhibitoren **1f – n**, **p** und **q**.^a

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) TFA in DCM, rt; (ii) DIPEA, THF, 0 °C.

Zudem wurde eine Auswahl von reversiblen Kontrollverbindungen zu **1g – i** dargestellt. Die Synthese erfolgte dabei analog Schema 1, lediglich wurde im letzten Schritt anstatt **21** Propionylchlorid (**22**) zur Amidknüpfung eingesetzt (Schema 6). Die drei reversiblen Analoga **23g – i** wurden in Ausbeuten zwischen 20 – 55 % (über zwei Schritte) erhalten und ebenso wie die kovalenten Verbindungen **1f – n**, **p** und **q** im Anschluss biochemisch charakterisiert.

Schema 6 Synthese der reversiblen Kontrollverbindungen **23g – i**.^a

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) TFA in DCM, rt; (ii) DIPEA, THF, 0 °C.

3.1.4 Biochemische Charakterisierung der kovalenten EGFR-Inhibitoren

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurde der von Cisbio entwickelte KinEASE™ HTRF Assay verwendet.¹⁶⁹⁻¹⁷⁰ Dieses aktivitätsbasierte Assaysystem beruht auf einem biotinyliertem Substratpeptid, welches mit der untersuchten Kinase, ATP sowie dem zu testendem Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen inkubiert wird. Hierbei wird das artifizielle, biotinylierte Substratpeptid durch die vorliegende Kinase phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wird durch einen phosphospezifischen Fluorophor-Antikörper-Konjugat gebunden. Im weiteren Verlauf der Reaktion bindet ein Fluorophor-Streptavidin-Konjugat, welches das zur Detektion notwendige FRET-Paar (Förster-Resonanzenergietransfer) komplettiert. Durch die Messung der zeitaufgelösten Emission bei verschiedenen Wellenlängen (655 nm bzw. 620 nm) lässt sich die relative Aktivität der untersuchten Kinase bestimmen. Durch Messung der relativen Kinaseaktivität bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und anschließender logarithmierten Auftragung erhält man den gewünschten IC₅₀-Wert.

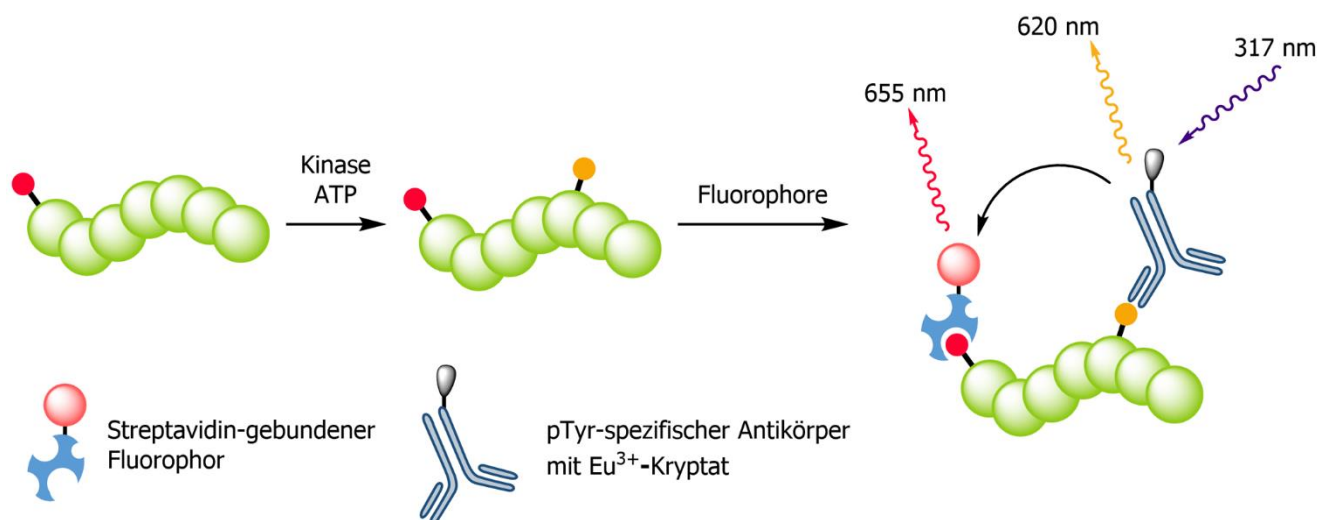
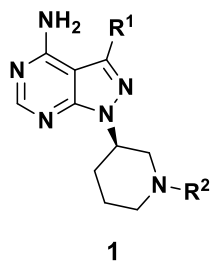


Abbildung 28 Schematische Darstellung des aktivitätsbasierten Assaysystems KinEASE™ von Cisbio.¹⁷¹ (Adaptiert mit Genehmigung des Autors Dr. André Richters aus: RICHTERS. Kinaseinhibitoren Als Molekulare Sonden in der Chemischen Biologie. Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2013**).

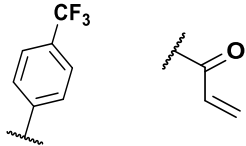
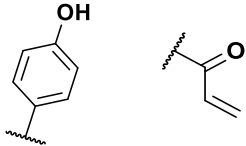
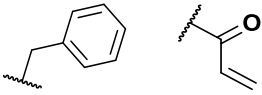
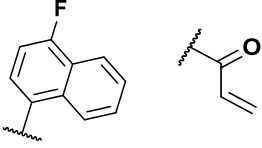
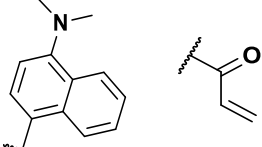
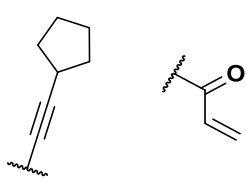
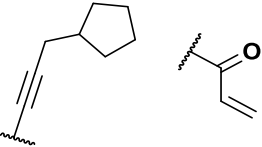
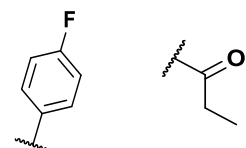
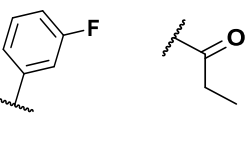
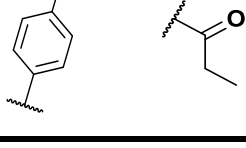
In die Reihe an zu untersuchenden Inhibitoren wurden neben den rational entwickelten Verbindungen **1f** – **q** und **23g** – **i** zusätzlich die von JULIAN ENGEL synthetisierten Verbindungen **1a** – **e** aufgenommen, sowie eine Auswahl von fünf kommerziell verfügbaren reversiblen und kovalenten EGFR-Inhibitoren. Die in Tabelle 4 aufgeführten Verbindungen wurden jeweils gegenüber EGFR^{WT}, EGFR^{L858R} und EGFR^{L858R/T790M} getestet und anschließend die Selektivität durch Division der IC₅₀-Werte von EGFR^{WT} und EGFR^{L858R/T790M} bestimmt.

Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass die reversiblen Verbindungen (**23g** – **i**, sowie Gefitinib) keine oder nur sehr moderate Aktivität auf der Resistenzmutation (EGFR^{L858R/T790M}) zeigen. Die dadurch bedingte sehr schlechte Selektivität unterstreicht die Notwendigkeit einer kovalenten Modifikation zur Adressierung von EGFR^{L858R/T790M}. Das unsubstituierte Grundgerüst (**1f**) zeigt eine moderate Aktivität auf allen EGFR-Varianten (IC₅₀ = 6.9 μM, 2.5 μM, beziehungsweise 1.6 μM). Die geringe Aktivität und lediglich moderate Selektivität ($\frac{WT}{L858R/T790M} = 4.2$) zeigen deutlich, dass eine Substitution der 3-Position essentiell für eine potente Inhibition ist. Durch die Einführung von verschiedenen Fluor-Gruppen (**1g** – **i**) basierend auf **1c** sollte der Einfluss von stark elektronegativen Substituenten auf die Türsteheraminosäure Met790 untersucht werden. Wie schon bei **1e** konnte auch bei **1g** – **i** kein positiver Effekt auf Aktivität oder Selektivität beobachtet werden. Interessanterweise führte die Einführung der *p*-Hydroxyphenyl-Gruppe (**1j**) zu einer 5 – 6-fachen Steigerung der Aktivität bei allen untersuchten EGFR-Varianten. Dieser Trend setzt sich auch in Verbindung **1d** fort, welche ein ähnliches freies Elektronenpaar trägt, wie das in dieser Arbeit synthetisierte **1j**. Durch die Verlängerung um eine Methyl-Einheit und der damit gesteigerten Drehbarkeit des Substituenten an 3-Position (**1k**) wurde eine 20-fache Verbesserung des IC₅₀-Wertes auf EGFR^{L858R/T790M} erreicht. Die Steigerung der Aktivität von **1k** gegenüber **1c** geht auch mit einer deutlichen Steigerung der Selektivität (0.6 für **1c** zu 2.1 für **1k**) einher. Durch die Synthese von **1n** und **1o** sollte der Einfluss von elektronenziehenden und -drückenden Substituenten auf die Naphthyl-Gruppe von **1a** untersucht werden um eine mögliche Kationen-π-Wechselwirkung mit Lys745 zu induzieren. Leider führte die Einführung solcher Gruppen zu einem dramatischen Aktivitätsverlust, der vermuten lässt, dass die maximale Größe der Substitution in 3-Position begrenzt und in **1a** bereits erreicht wurde. Jedoch kann auch eine ungünstige Positionierung des π-Systems einen stark nachteiligen Effekt für die Ausbildung der erhofften Wechselwirkung haben und dadurch zu einem solchen Aktivitätseinbruch (10-fach für **1n** und 100-fach für **1o**) auf EGFR^{L858R/T790M} führen.¹⁵⁴ Ein Ersatz der zyklischen Substituenten durch substituierte Alkine (**1p** und **1q**) resultierte in einem signifikanten Verlust der jeweiligen Enzymaktivität (Tabelle 4). Es zeigte sich, dass durch diese Derivatisierung eine höhere Selektivität für EGFR^{WT} erzielt wurde. Daraus erschließt sich, dass die Wechselwirkung mit der Türsteheraminosäure Met790 eine kritische Interaktion bei der Entwicklung von potenten und selektiven EGFR-Inhibitoren darstellen muss.

Tabelle 4 Bestimmung der IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren und literaturbekannter Referenzverbindungen gegen die relevanten EGFR-Varianten.⁹



EGFR IC ₅₀ [nM]						
N°	R ¹	R ²	WT	L858R	L858R/T790M	Selektivität
1a			58 ± 13	1.0 ± 0.32	1.9 ± 0.77	31
1b			35 ± 14	3.8 ± 2.8	2.5 ± 1.4	14
1c			140 ± 58	11 ± 3.0	240 ± 42	0.58
1d			13 ± 3.0	2.0 ± 0.76	2.7 ± 0.35	4.4
1e			370 ± 91	27 ± 1.9	220 ± 75	1.7
1f			6900 ± 900	2500 ± 170	1600 ± 490	4.3
1g			130 ± 30	26 ± 8.3	280 ± 96	0.46
1h			130 ± 66	12 ± 3.0	230 ± 54	0.57

1i		62 ± 15	63 ± 32	270 ± 21	0.23	
1j		28 ± 18	2.8 ± 1.6	43 ± 37	0.65	
1k		21 ± 16	3.3 ± 3.3	10 ± 12	2.1	
1n		69 ± 15	18 ± 1.0	20 ± 5.0	3.5	
1o		810 ± 81	270 ± 110	210 ± 46	3.9	
1p		750 ± 110	60 ± 28	1400 ± 680	0.54	
1q		750 ± 72	120 ± 45	920 ± 340	0.82	
23g		$>10 \mu\text{M}$	5000 ± 4600	$>10 \mu\text{M}$	-	
23h		$>10 \mu\text{M}$	3400 ± 2100	$>10 \mu\text{M}$	-	
23i		6500 ± 2800	5900 ± 2600	$>10 \mu\text{M}$	0.82	
Ibrutinib	-	-	<1	9.3 ± 1.0	40 ± 2.5	<0.1

Gefitinib	-	-	<1	<1	180 ± 98	<0.1
WZ4002	-	-	11 ± 6.7	<1	<1	>10
Osimertinib	-	-	1.5 ± 0.36	1.1 ± 0.52	<1	>1.5
Rociletinib	-	-	1.8 ± 0.39	1.6 ± 0.20	2.3 ± 0.71	0.78

^a Die ermittelten IC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die IC₅₀-Werte der EGFR-Varianten wurden von Frau Simone Eppmann und Herrn Andreas Arndt bestimmt.

3.1.5 Auswahl und Synthese der kovalent-reversiblen EGFR-Inhibitoren

Nach Auswertung der biochemischen Daten von **1a – q** aus Tabelle 4 wurde vor allem im Hinblick auf Selektivität eine Auswahl an Inhibitoren getroffen, welche über den von BASU *et al.* aufgezeigten Syntheseweg mit einem kovalent-reversiblen *warhead* versehen werden sollten.¹⁵⁵ Um ein breites Spektrum an Selektivitäten abzudecken wurden die von JULIAN ENGEL synthetisierten Verbindungen **1a – e** ausgewählt.

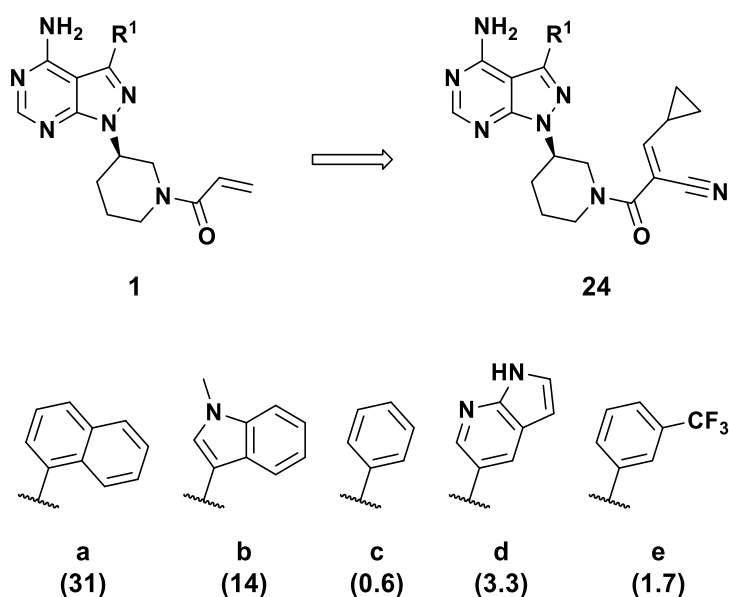
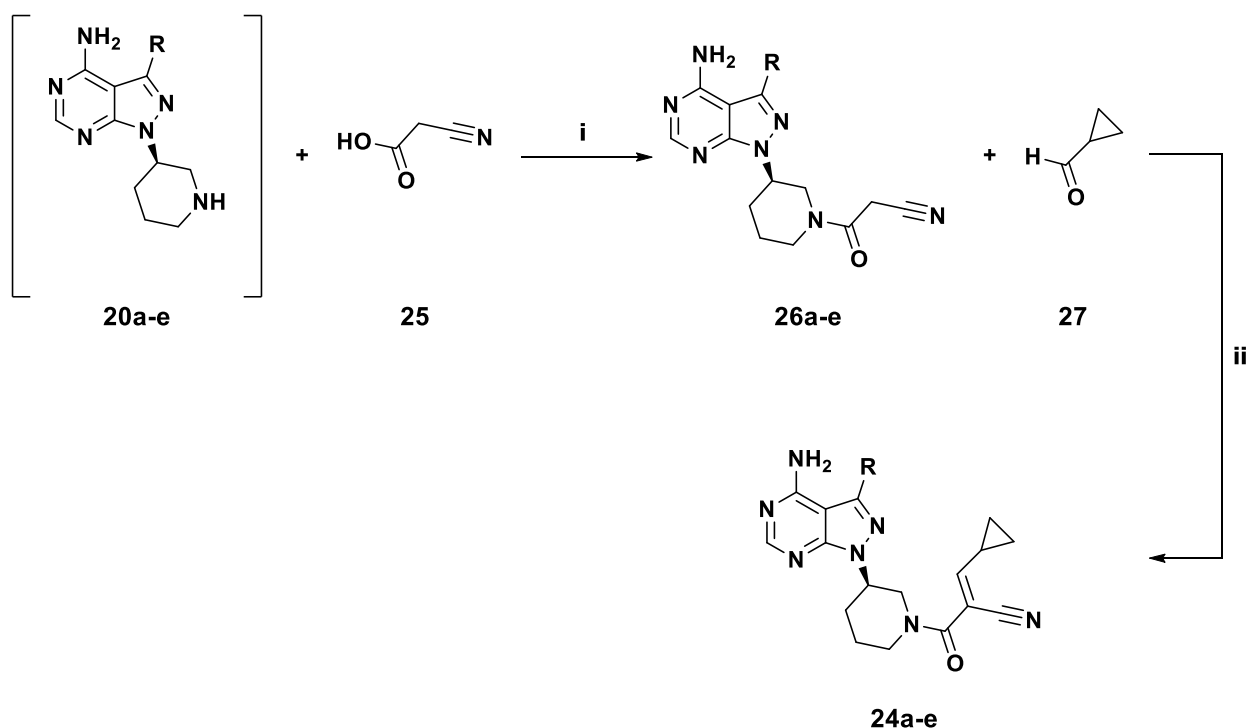


Abbildung 29 Auswahl der zu synthetisierenden kovalent-reversiblen EGFR-Inhibitoren. In Klammern die in Tabelle 4 aufgeführten Selektivitäten ($\frac{WT}{L858R/T790M}$).

Ausgehend von der in Abschnitt 3.1.3 vorgestellten Synthese der kovalenten EGFR Inhibitoren (Schema 1) soll nun der von BASU *et al.* erarbeitete Syntheseweg des kovalent-reversibel bindenden Michael-Akzeptor-Systems adaptiert werden (Schema 7). Hierfür wurden die Boc-entschützten sekundären Amine **20** mittels Amid-kupplung mit 2-Cyanoessigsäure (**25**) verknüpft.

Schema 7 Synthese der kovalent-reversibel bindender 4-Aminopyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidin-Derivate **24**.^a

^aReagenzien und Bedingungen: (i) EDC·HCl, HOBT, DIPEA, DCM, rt; (ii) Piperidin, EtOH, 80 °C.

Die über EDC·HCl vermittelte Kupplung konnte hierbei mit Ausbeuten zwischen 14 – 79 % erfolgreich durchgeführt werden. Die so entstandenen α -C-aziden Verbindungen **26a – e** wurden nach wässriger Aufarbeitung direkt in der folgenden Aldolkondensation mit Cyclopropancarboxaldehyd (**27**) verwendet. Hierfür wurde **26** in Ethanol gelöst und nach Zugabe von **27** und Piperidin als Base über Nacht auf 80 °C erhitzt. Da durch erhöhte Temperatur die Eliminierung zu α,β -ungesättigten Verbindungen begünstigt ist konnte gemäß dem Mechanismus der Aldolkondensation (Abbildung 30) **24** erhalten werden. Das Rohprodukt wurde nach wässriger Aufarbeitung erst über Flash Chromatographie und anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt, sodass die reine Endverbindung **24** im finalen Schritt mit Ausbeuten zwischen 17 – 44 % erhalten werden konnte.

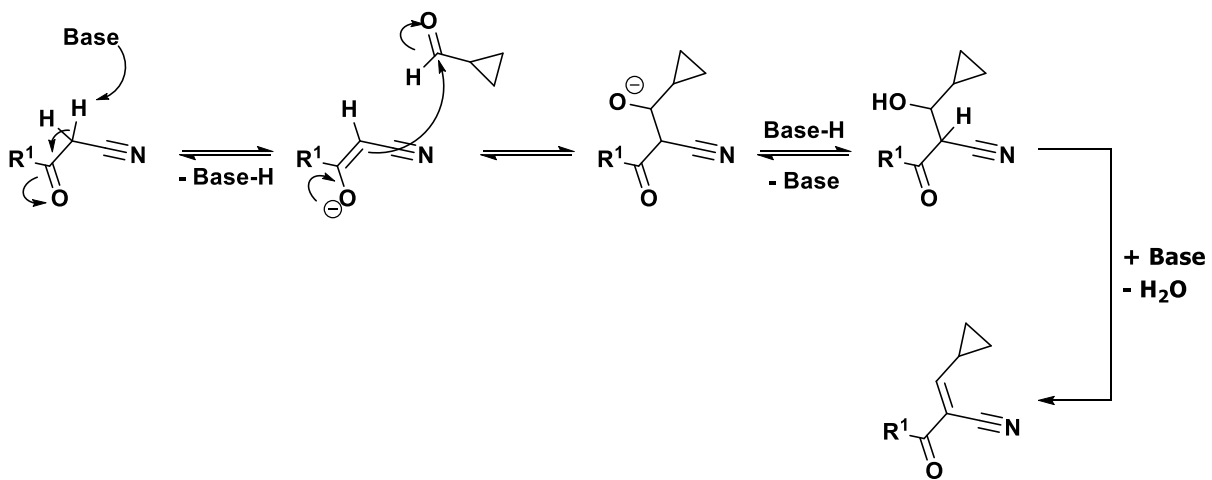


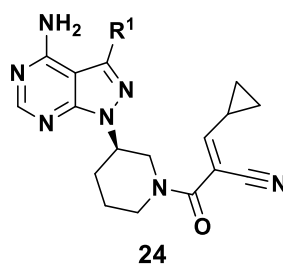
Abbildung 30 Reaktionsmechanismus der basenvermittelten Aldolkondensation.

Die fünf so erhaltenen kovalent-reversiblen Inhibitoren (**24a – e**) wurden nun biochemisch charakterisiert und anschließend genutzt um eine MS-basierte Methode zu entwickeln um die beiden Bindungszustände (kovalent und reversibel) dieser Inhibitoren zu beobachten.

3.1.6 Biochemische Charakterisierung der kovalent-reversiblen EGFR-Inhibitoren

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte für EGFR^{WT}, EGFR^{L858R} und EGFR^{L858R/T790M} erfolgte analog der in Abschnitt 3.1.4 beschriebene Methodik. Als Positivkontrollen dienten in diesem Fall WZ4002, Gefitinib und Osimertinib. Des Weiteren wurden für **24a – e** die kinetischen Parameter K_i und k_{inakt} bestimmt.

Tabelle 5 Bestimmung der IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit synthetisierten kovalent-reversiblen Inhibitoren und literaturbekannter Referenzverbindungen gegen die relevanten EGFR-Varianten.^a



EGFR IC ₅₀ [nM]					
N°	R ¹	WT	L858R	L858R/T790M	Selektivität
a		100 ± 75	21 ± 20	80 ± 51	1.3
b		340 ± 69	85 ± 34	210 ± 49	1.6
c		5400 ± 3900	230 ± 62	4500 ± 54	1.2
d		96 ± 26	10 ± 8.0	20 ± 13	4.8
e		>10 μM	390 ± 210	2500 ± 420	<4
Gefitinib	-	<1	<1	180 ± 98	<0.1
WZ4002	-	11 ± 6.7	<1	<1	>10
Osimertinib	-	1.5 ± 0.36	1.1 ± 0.52	<1	>1.5

^a Die ermittelten IC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die IC₅₀-Werte der EGFR-Varianten wurden von Frau Simone Eppmann bestimmt.

Wie aus Tabelle 5 zu entnehmen, konnten die synthetisierten Verbindungen (**24a – e**) moderate bis gute Aktivitäten auf den unterschiedlichen EGFR-Varianten erzielen. Jedoch konnte, im Vergleich zu den korrespondierenden kovalenten Inhibitoren (**1a – e**) eine bis zu 40-fache Abnahme der

IC₅₀-Werte beobachtet werden (**1a** vs. **24a**, IC₅₀ = 2 vs. 80 nM). Eine detaillierte Analyse der bereits veröffentlichten Kristallstrukturen (PDB: 5j9z und 5j9y) zeigt eine räumliche Nähe von Cys797 zu Arg841, welches eine starke Restriktion für Substitutionen um das reaktive Elektrophil darstellt. Diese räumliche Einschränkung könnte die Cyclopropyl-Gruppe der kovalent-reversiblen Inhibitoren in eine ungünstige Konformation drücken, welche wiederum zu einer Änderung der Position des restlichen Moleküls in der Bindetasche führen kann.

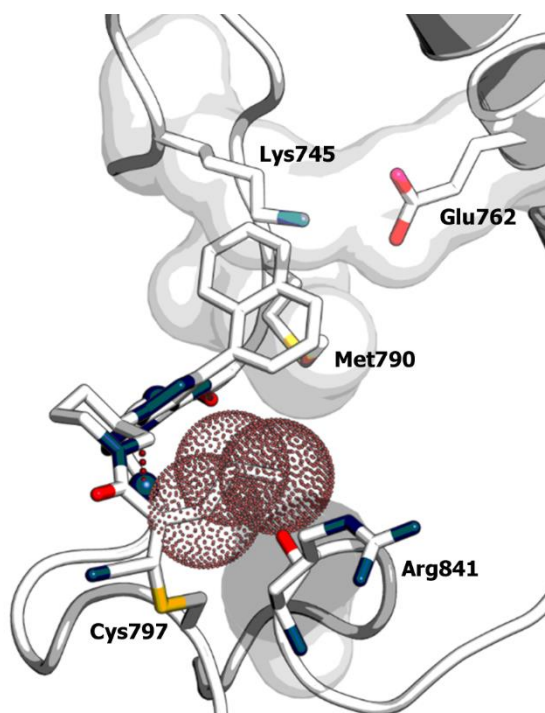


Abbildung 31 Grafische Darstellung der sterische Restriktion zwischen den kovalent-reversiblen Inhibitoren (**24a – e**) und Arg841 in EGFR^{T790M} (PDB: 5j9y). Die Darstellung wurde durch eine Superposition einer energiminimierten Modellstruktur von **24e** mit der bekannten Kristallstruktur von **1a** in EGFR^{T790M} (PDB: 5j9y) erstellt. Die räumliche Interaktion des Cyclopropyl-Rests von **24e** mit Arg841 ist hier in rot dargestellt.

Auch konnte durch die kovalent-reversiblen Inhibitoren keine erhöhte Selektivität zu EGFR^{L858R/T790M} beobachtet werden. Bis auf Inhibitoren **24c** und **24d** nahm die Selektivität um den Faktor 9 bis 20 ab (**1a** vs. **24a** und **1b** vs. **24b**, $\frac{WT}{L858R/T790M} = 31$ vs. 1.3 und 14 vs. 1.6). Da die Aktivität von **24c** und **24d** im mittleren μ M-Bereich liegt, sind die gesteigerten Selektivitäten zur EGFR^{L858R/T790M} nicht signifikant.

24d zeigt hierbei die höchste Aktivität auf der Doppelmutante von EGFR der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten kovalent-reversiblen Inhibitoren (IC₅₀ = 20 nM). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die perfekte Positionierung des Azaindol-Rests zwischen Met790 und Lys745 (Abbildung 32) für eine maximale Wechselwirkung beider Aminosäureseitenketten mit dem π -System. Des Weiteren befindet sich der Pyridin-Stickstoff in räumlicher Nähe zu Glu762 um eine

zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung auszubilden, was zu einer weiteren Stabilisierung des Protein-Ligand-Komplexes beitragen kann.

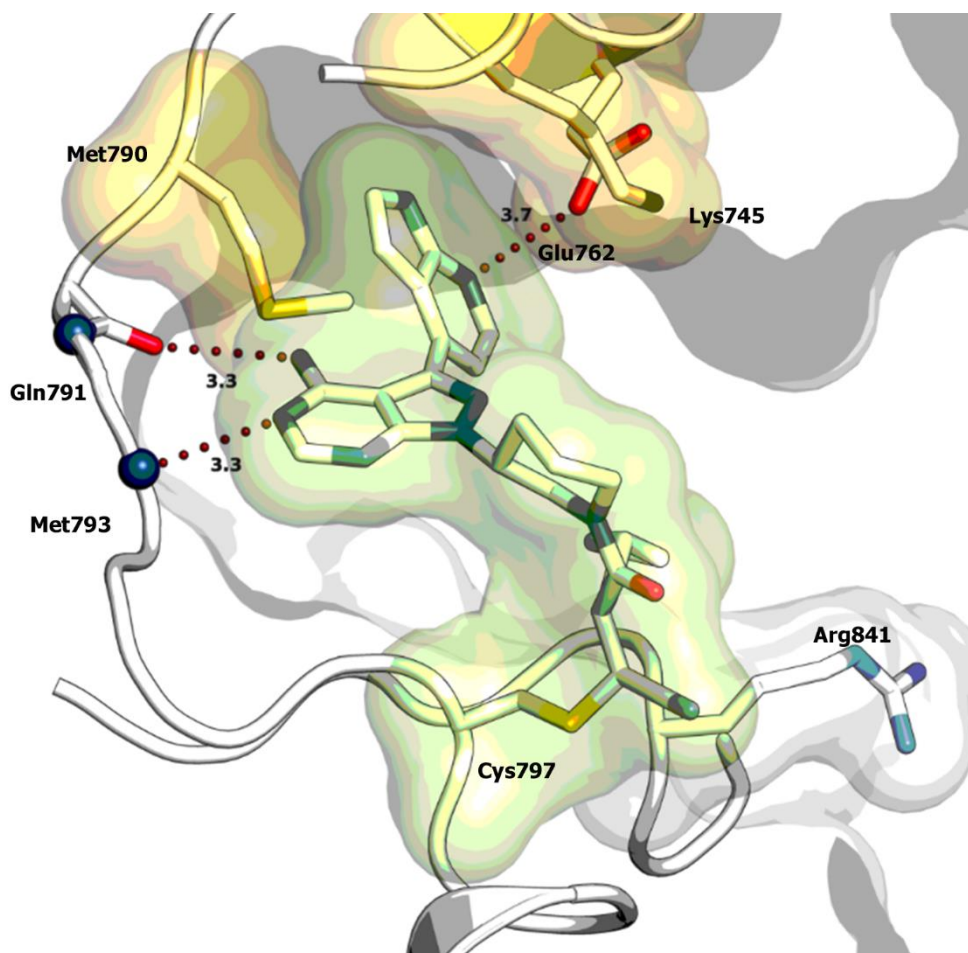


Abbildung 32 Grafische Darstellung der vorteilhaften Positionierung von **24d** in EGFR^{T790M} (PDB: 5j9y) visualisiert durch Superposition einer energieminierten Modellierung von **24d** und der bekannten Kristallstruktur von **1a** in EGFR^{T790M} (PDB: 5j9y).

Für eine detaillierte Untersuchung der in Tabelle 5 gezeigten Verbindungen wurden im weiteren Verlauf die kinetischen Parameter K_i und k_{inakt} bestimmt (Tabelle 6). In die Betrachtung der kinetischen Parameter wurden nur die aktivsten Verbindungen der Serie (**24a**, **b** und **e**) und deren korrespondierenden kovalenten Inhibitoren (**1a** und **1b**) herangezogen. Hierzu wurden die IC_{50} -Werte (Bestimmung analog Abschnitt 3.1.4) der synthetisierten Verbindungen für die jeweiligen EGFR-Varianten (EGFR^{WT}, EGFR^{L858R} und EGFR^{L858R/T790M}) zeitaufgelöst aufgenommen.

Im Fall von reversibler kompetitiver Inhibition von Enzymen stellten 1973 CHENG und PRUSSOFF eine nach ihnen benannte Gleichung auf, welche eine Umrechnung von K_i - zu IC_{50} -Werten zulässt (Gl. 2).¹⁷²

$$IC_{50} = \frac{[I]}{K_M} \cdot K_i \quad \text{Gl. 2}$$

[I] = Konzentration an Inhibitor, K_M = Michaeliskonstante

Die Rate von kovalenter Proteininaktivierung (k_{inakt}) steht im direkten Zusammenhang mit der zeitabhängigen Abnahme des IC_{50} -Wertes (Abbildung 12), weswegen im Gegensatz zur reversiblen Bindung von Inhibitoren die CHENG-PRUSOFF-Gleichung keine verlässliche Abschätzung des K_i zulässt. Durch die kovalente Inaktivierung des Enzyms findet eine Erniedrigung der Konzentration von katalytisch aktiven Enzyms statt. KRIPPENDORF *et al.* konnten durch Herleiten von Gl. 3 zeigen, dass ein grundlegender Zusammenhang zwischen K_i , k_{inakt} und IC_{50} -Werten im Falle der kovalenten Inaktivierung besteht.⁵⁸

$$IC_{50}(t) = K_i \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_M}\right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta_{IC_{50}} \cdot k_{\text{inakt}} \cdot t}}{\eta_{IC_{50}} \cdot k_{\text{inakt}} \cdot t} - 1\right) \quad \text{Gl. 3}$$

mit

$$\eta_{IC_{50}} = \frac{IC_{50}(t)}{K_i \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_M}\right) + IC_{50}(t)} \quad \text{Gl. 4}$$

Durch Gl. 3 lassen sich nun für jede zeitaufgelöst aufgenommenen IC_{50} -Werte eine definierte Kombination aus K_i und k_{inakt} -Werten bestimmen. Die aufgenommenen IC_{50} -Werte können durch grafische Annäherung mit, z. B. XLFit aufgetragen und anschließend die K_i und k_{inakt} -Werte daraus abgeleitet werden.

Tabelle 6 Bestimmung der kinetischen Parameter (K_i , k_{inakt} und $\frac{k_{\text{inakt}}}{K_i}$) der in dieser Arbeit synthetisierten kovalent-reversiblen Inhibitoren (**24a**, **b** und **e**), sowie den kovalenten Inhibitoren **1a** und **b** und Osimertinib als literaturbekannte Referenzverbindungen gegen die relevanten EGFR-Varianten.^a

N°	EGFR	K_i [nM]	k_{inakt} [min^{-1}]	$\frac{k_{\text{inakt}}}{K_i}$ [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
1a	WT	47 ± 5.8	0.13 ± 0.05	0.05 ± 0.04
	L858R	44 ± 6.5	0.25 ± 0.06	0.10 ± 0.06
	L858R/T7890M	58 ± 3.3	0.31 ± 0.04	0.09 ± 0.02
1b	WT	25 ± 7.2	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.02
	L858R	19 ± 3.1	0.17 ± 0.08	0.14 ± 0.07
	L858R/T7890M	16 ± 5.2	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.09
24a	WT	64 ± 1	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	L858R	14 ± 2	0.04 ± 0.03	0.68 ± 0.25
	L858R/T7890M	15 ± 3	0.11 ± 0.01	0.73 ± 0.16
24b	WT	1700 ± 450	0.17 ± 0.06	0.01 ± 0.01
	L858R	79 ± 9	0.12 ± 0.01	0.26 ± 0.07
	L858R/T7890M	83 ± 10	0.13 ± 0.04	0.36 ± 0.02
24e	WT	270 ± 1	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	L858R	37 ± 6	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01
	L858R/T7890M	51 ± 1	0.17 ± 0.08	0.05 ± 0.02
Osimertinib	WT	13.5 ± 2.3	0.43 ± 0.11	0.55 ± 0.05
	L858R	1.58 ± 0.19	0.3 ± 0.01	3.24 ± 0.46
	L858R/T7890M	1.46 ± 0.07	0.33 ± 0.06	3.75 ± 0.39

^a Die ermittelten K_i -, k_{inakt} - und $\frac{k_{\text{inakt}}}{K_i}$ Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die kinetischen Parameter der EGFR-Varianten wurden von M.Sc. Marina Keul bestimmt. Die jeweiligen Werte der kovalenten Verbindungen (**1a** und **b**) sowie Osimertinib wurden von ENGEL und BECKER *et al.* übernommen.¹¹⁵

Im Vergleich mit Osimertinib zeigen alle hier gezeigten Verbindungen ein deutlich abgeschwächtes kinetisches Profil. Dies liegt vorwiegend an der deutlich höheren Affinität von Osimertinib zu den jeweiligen EGFR-Varianten (EGFR^{WT}, EGFR^{L858R} und EGFR^{L858R/T790M}, K_i = 13.5, 1.6 und 1.5 nM). Dahingegen erfolgt die Knüpfung der kovalenten Bindung annähernd gleich schnell bei

allen betrachteten Verbindungen ($k_{\text{inakt}} \sim 0.3 \text{ min}^{-1}$). Im Gegensatz zu den IC_{50} -Werten lässt sich jedoch kein drastischer Verlust an Affinität der jeweiligen kovalent und kovalent-reversiblen Verbindung beobachten (**1a** $K_i = 58 \text{ nM}$ und **24a** $K_i = 15 \text{ nM}$). Im Vergleich der kovalent-reversiblen Inhibitoren **24a**, **b** und **e** hinsichtlich k_{inakt} (Geschwindigkeit der kovalenten Bindungsknüpfung) in EGFR^{L858R/T790M} zeigt sich, dass diese Inaktivierung relativ langsam abläuft ($\sim 0.14 \text{ min}^{-1}$, vgl. **1a** $k_{\text{inakt}} = 0.31 \text{ min}^{-1}$). Da kovalent-reversible Inhibitoren zur wirksamen Bindung in EGFR in Konkurrenz zu ATP stehen, ist eine langsame kovalente Bindungsknüpfung eine mögliche Erklärung für die niedrigen Aktivitäten dieser Verbindungsklassen in EGFR. Abgesehen davon konnte bei den kovalent-reversiblen Inhibitoren (**24**) der Trend der korrespondierenden kovalenten Inhibitoren (**1**) bestätigt werden, dass eine sterisch anspruchsvollere Substitution an 3-Position des Pyrazolo-[3,4-*d*]-pyrimidin-Grundgerüsts für eine potente Inhibierung von EGFR nötig ist.

Durch die Methodik zur Bestimmung der kinetischen Parameter kommt es jedoch zu Ungenauigkeiten bei dem Vergleich von Werten mit unterschiedlichen Bindungsmodi. Hierbei wird der IC_{50} -Wert in Abhängigkeit der Inkubationsdauer des Inhibitors mit der betrachteten Kinase aufgetragen. Im Idealfall ergibt sich dadurch eine abfallende Kurve, die in einer Plateauphase endet.⁵⁸ Ein Vergleich der Kurven für **1a** und **24a** zeigt deutlich, dass der kovalent-reversible Inhibitor sein Plateau nach 10 min erreicht, während der kovalente Inhibitor **1a** erst nach 60 min in die Plateauphase übergeht. Auch die Steigung im abfallenden Bereich unterscheidet sich deutlich zwischen den beiden Verbindungen (Abbildung 33). Die Steigung der Kurve hängt vornehmlich von der Geschwindigkeit ab in welcher die kovalente Bindung geformt wird. Hierdurch wird ersichtlich, dass bei kovalent-reversiblen Inhibitoren eine sehr langsame Bindungsknüpfung stattfindet. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die letztendliche Bindungsknüpfung im Protein nicht irreversibel ist ($k_{-1} > 0$, Abbildung 13). Im Gegensatz zur kovalent-irreversiblen Bindungsknüpfung liegt die kovalent-reversible Bindung im Gleichgewichtszustand vor und bedingt dadurch ein deutliches Abflachen der Kurve (**1a** vs. **24a**, Abbildung 33). Hierdurch wird deutlich, dass ein direkter Vergleich der beiden Bindungsmodi über kinetische Parameter zu ungenauen Rückschlüssen führen kann und dadurch äußerst vorsichtig beurteilt werden muss.

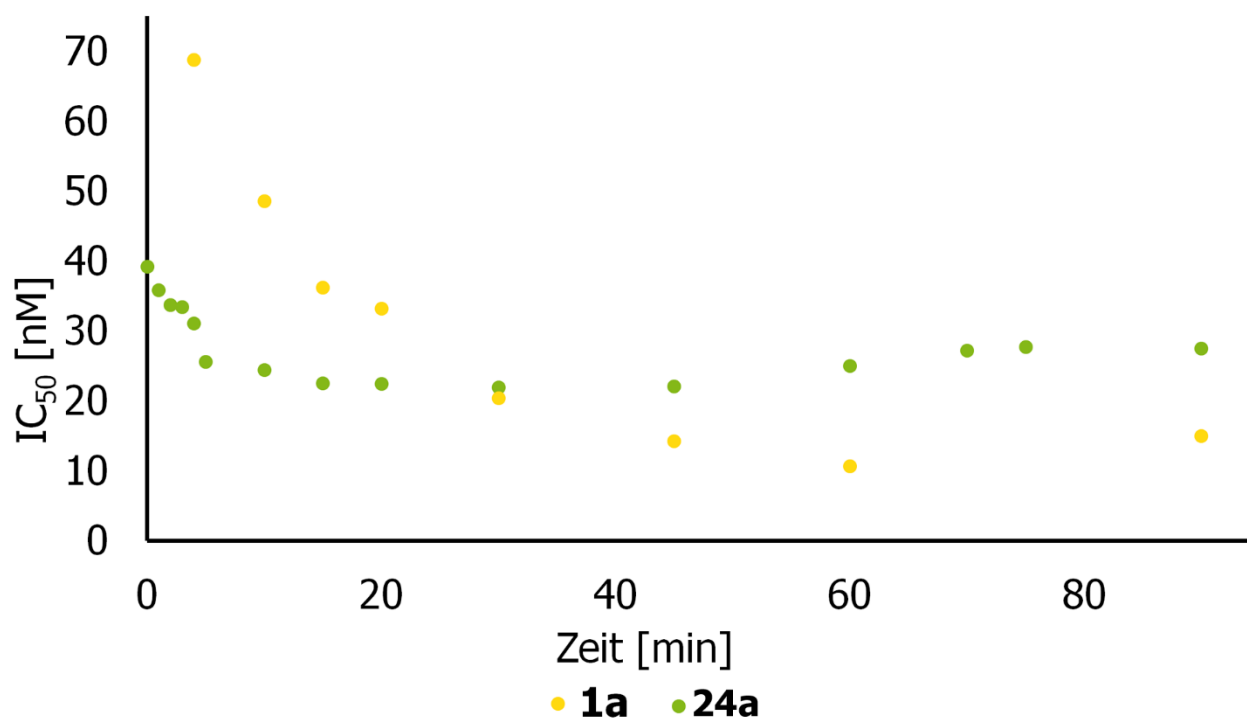


Abbildung 33 Zeitaufgelöste IC₅₀-Bestimmung von **1a** (gelb) und **24a** (grün) in EGFR^{L858R/T790M}. Die hier gezeigten IC₅₀-Werte für EGFR^{L858R/T790M} wurden von M.Sc. Marina Keul bestimmt.

3.1.7 Zelluläre Charakterisierung einer Auswahl von EGFR-Inhibitoren

Die Charakterisierung der zellulären Aktivität der hier präsentierten Verbindungen erfolgte durch den von Promega entwickelten CellTiter-Glo Assay.¹⁷³ Das grundlegende Prinzip dieses Assays beruht auf der Proportionalität der durch den ATP-gekoppelten Reporter Luciferase quantifizierten Biolumineszenz und der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen.¹⁷⁴ Hierbei werden die Zellen für 96 h mit einer Verdünnungsreihe des zu testenden Inhibitor inkubiert und anschließend mit CellTiter-Glo Reagenz behandelt. Durch das zugegebene Reagenz wird eine Zelllyse vollzogen, wodurch das zelluläre ATP freigesetzt wird, wobei metabolisch aktive Zellen einen entsprechend höheren ATP-Gehalt aufweisen. Das freigesetzte ATP unterstützt dabei die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin durch Luciferase unter Freisetzung von AMP und Pyrophosphat (PP_i). Durch die Messung der Lumineszenz von Oxyluciferin kann ein direkter Rückschluss auf die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen gezogen werden. Durch anschließende logarithmierte Auftragung erhält man den gewünschten EC₅₀-Wert.

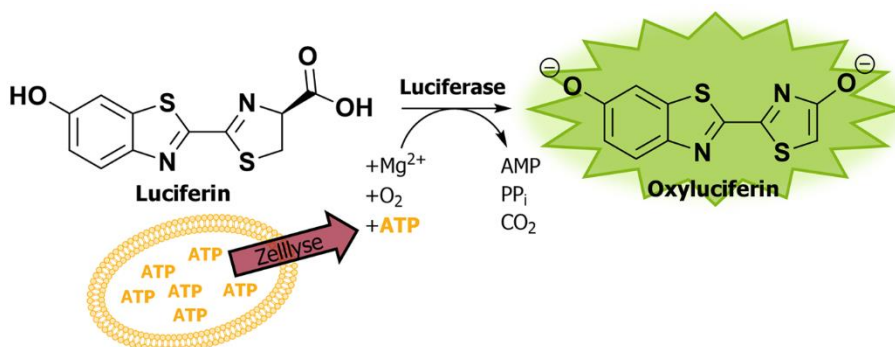


Abbildung 34 Schematische Darstellung des verwendeten CellTiter-Glo Assays.¹⁷³ Das durch Zelllyse freigesetzte ATP (in Gelb) kann Luciferin durch Luciferase-Katalyse zu Oxyluciferin umgesetzt werden und die entstehende Lumineszenz vermessen werden.

Zur Evaluierung der zellularen Wirksamkeit wurden die EGFR-mutierten Zelllinien HCC827¹⁷⁵ (humane Lungenepithelzellen, Adenokarzinom; EGFR^{del746_A750}) und H1975¹⁷⁶ (humane Lungenepithelzellen, Adenokarzinom, NSCLC; EGFR^{L858R/T790M}) verwendet (Tabelle 7). Zur Bestimmung der Selektivität wurde zusätzlich humanen Plattenepithelkarzinomzellen (A431¹⁷⁷) verwendet, welche eine Abhängigkeit von EGFR^{WT} aufweisen (Tabelle 7). Zusätzlich wurden die KRAS-mutierten Zelllinien A549¹⁷⁶ (humane alveolar Adenokarzinomzellen; KRAS^{G12S}) und H358¹⁷⁷ (humane alveolar Adeonkarzinomzellen, NSCLC; KRAS^{G12C}) verwendet um eine *off-target* Toxizität auszuschließen (Tabelle A1, Seite I).

Tabelle 7 Bestimmung der EC₅₀-Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren und literaturbekannter Referenzverbindungen gegen die Krebszelllinien A431, HCC827 und H1975.^a

N°	EC ₅₀ [μM]			Selektivität A431:H1975
	A431 (EGFR ^{WT})	HCC827 (EGFR ^{del746_A750})	H1975 (EGFR ^{L858R/T790M})	
1a	29.4 ± 1.67	0.50 ± 0.04	0.49 ± 0.32	60.0
1b	6.78 ± 4.45	0.09 ± 0.08	0.23 ± 0.06	29.5
1c	12.7 ± 4.37	0.07 ± 0.02	3.67 ± 0.10	3.5
1d	1.39 ± 0.59	<0.014	0.28 ± 0.03	5.0
1e	16.0 ± 2.81	0.65 ± 0.13	4.16 ± 0.77	3.8
1f	n.i. ^b	9.90 ± 1.02	n.i.	-
1g	17.0 ± 5.92	0.08 ± 0.03	1.84 ± 0.36	-
1h	11.7 ± 3.81	0.07 ± 0.35	3.37 ± 0.85	3.5
1i	8.87 ± 4.38	0.16 ± 0.08	1.38 ± 0.31	6.4

1j	4.17 ± 2.20	0.07 ± 0.02	1.84 ± 0.56	2.3
1k	19.9 ± 9.59	0.15 ± 0.02	0.69 ± 0.17	28.8
1n	12.8 ± 4.63	0.43 ± 0.10	0.36 ± 0.19	35.6
1o	24.5 ± 5.76	2.13 ± 0.513	2.67 ± 1.64	9.2
1p	10.9 ± 2.32	1.15 ± 0.14	8.27 ± 0.30	1.3
1q	8.77 ± 2.88	3.15 ± 0.55	6.93 ± 1.14	1.3
23g	n.i.	25.9 ± 3.58	n.i.	-
23h	n.i.	22.3 ± 4.85	n.i.	-
23i	n.i.	23.6 ± 6.96	n.i.	-
24a	n.i.	-	n.i.	-
24b	14.3 ± 3.68	-	27.7 ± 2.10	0.52
24c	n.i.	-	n.i.	-
24d	8.37 ± 1.95	-	11.4 ± 1.12	0.73
24e	26.6 ± 5.32	-	n.i.	-
Ibrutinib	2.38 ± 1.66	-	0.64 ± 0.30	3.7
Gefitinib	1.71 ± 0.792	-	10.7 ± 2.55	0.2
WZ4002	2.21 ± 0.44	-	0.09 ± 0.01	24.6
Osimertinib	0.67 ± 0.23	-	<0.014	>48
Rociletinib	1.66 ± 0.12	-	0.10 ± 0.03	16.6

^a Die ermittelten EC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die EC₅₀-Werte der EGFR-Varianten wurden von M.Sc. Hannah Lea Tumbrink und M.Sc. Jonas Lategahn bestimmt. ^b n.i. kein inhibitorischer Effekt bei einer Inhibitorkonzentration von 30 μM.

Im Rahmen der zellulären Charakterisierung wurden alle hier präsentierten Inhibitoren (**1a – q**, **23g – i** und **24a – e**) sowie fünf kommerziell verfügbare kovalente Kinaseinhibitoren gegen eine Auswahl der oben beschriebenen Zelllinien getestet.

Keine der in dieser Arbeit synthetisierten und getesteten Inhibitoren zeigten eine inhibitorische Aktivität auf den als Kontrolle eingesetzten KRAS-mutierten Zelllinien (A549 und H358, EC₅₀ > 10 μM, Tabelle A1) mit der Ausnahme von **1d** (A549 und H358, EC₅₀ = 3.45 und 2.3 μM) und **1j** (H358, EC₅₀ = 6.23 μM). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der hohen biochemischen

Aktivität dieser Inhibitoren auf EGFR^{WT} (**1d** und **1j**, IC₅₀ = 13 und 28 nM). Neben den bereits biochemisch hoch selektiven Inhibitoren **1a** und **1b** (IC₅₀ $\frac{WT}{L858R/T790M}$ = 31 und 14; EC₅₀ $\frac{A431}{H1975}$ = 60 und 30) zeigen zellulär auch **1k** und **1n** eine sehr gute Selektivität für H1975 ($\frac{A431}{H1975}$ = 29 und 36). Allgemein zeigen alle kovalenten Inhibitoren eine moderate bis gute Aktivität auf H1975 (EC₅₀ < 9 μM) mit moderaten Selektivität für die wirkstoffresistente Zelllinie H1975 ($\frac{A431}{H1975}$ = 1 – 10). Eine Ausnahme bildet hierbei der unsubstituierte Inhibitor **1f** welcher keine Aktivität auf A431 und H1975 bei 30 μM Inhibitorkonzentration aufweist. Ebenfalls zeigen alle kovalenten Inhibitoren eine moderate bis hohe Aktivität auf HCC827, welche in dieser Arbeit als Modell für die Aktivierungsmutation von EGFR verwendet wurde. Auch dies entspricht den bereits biochemisch observierten Aktivitäten und Trends. Wie bereits in der biochemischen Charakterisierung konnten für die reversiblen Inhibitoren **23g – i** keinerlei Effekt auf A431 und H1975 beobachtet werden. Lediglich auf HCC827 konnten diese einen schwachen inhibitorischen Effekt ausüben (EC₅₀ ~ 23 μM).

Im Falle der CRIs konnte nur bei **24b** und **24d** ein Effekt auf den untersuchten Zelllinien (A431 und H1975) beobachtet werden. Im Gegensatz zur biochemischen Charakterisierung konnten jedoch keine Selektivität für die wirkstoffresistente EGFR Mutation erfasst werden (IC₅₀ $\frac{WT}{L858R/T790M}$ = 1.6 und 4.8; EC₅₀ $\frac{A431}{H1975}$ = 0.5 und 0.7 für **24b** bzw. **24d**). Durch die schwache Aktivität auf der jeweils mutierten Zelllinie legt nahe, dass dieser Effekt durch eine nur mäßige Zellpermeabilität nicht signifikant ist.

3.1.8 Profilierung von 24d

Um eine Aussage über die Selektivität der hier entwickelten kovalent-reversiblen Inhibitoren im Kinom zu treffen wurde eine Profilierung über das von Thermo Fisher Scientific angebotene *SelectScreen® Kinase Profiling* durchgeführt.¹⁷⁸ Hierbei handelt es sich um eine Profilierung mit Hilfe des *Z'-LYTE Kinase Assay Kit*, welches auf einem messbaren Förster-Resonanzenergietransfer beruht.¹⁷⁹ In diesem fluoreszenz-basierten System wird die unterschiedliche Sensitivität von phosphorylierten und unphosphorylierten Peptiden gegenüber proteolytischem Abbau durch eine nach erfolgter Kinasereaktion zugegebene Protease genutzt. Zu Beginn wird ein synthetisches Peptid durch eine Kinase an einem spezifischen Serin, Tyrosin oder Threonin phosphoryliert. In einer sekundären Reaktion erfolgt nun der selektive Abbau der unphosphorylierten Peptidspezies durch eine Protease. Durch diesen Abbau wird das FRET-Signal zwischen Donor und Akzeptor aufgehoben, wohingegen phosphorylierte Peptide weiterhin ein messbares FRET-Signal liefern. Durch die Berechnung eines Emissions-Verhältnisses bei unterschiedlichen Wellenlängen kann eine Aussage über die erfolgte Inhibition gemacht werden. Ein hohes Emissions-Verhältnis steht im direkten

Zusammenhang mit unphosphorylierten Peptiden und dadurch erfolgreicher Inhibition der Kinase und *vice versa*.¹⁷⁸

Der hier dargestellte Inhibitor **24d** wurde für die Profilierung ausgewählt, da er biochemisch die höchste Selektivität gegenüber der EGFR^{L858R/T790M}-Mutation zeigte, sowie eine im Allgemeinen erhöhte Aktivität auf allen relevanten EGFR-Varianten besitzt (vgl. Tabelle 5). **24d** wurde bei einer Konzentration von 1 μ M gegen ein vorher bestimmtes Panel an Kinasen getestet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass eine möglichst große Anzahl an Kinasen enthalten ist, welche ein EGFR-analoges Cystein tragen (Cys797 an der Spitze der α HelixD, Tabelle 8), sowie die relevanten EGFR-Varianten beinhaltet sind.

Tabelle 8 Übersicht der Aminosäuresquenz, beginnend am Türsteher Rest, der Kinasen mit einem EGFR-analogen Cystein.

Kinase	TR ^a										
BLK	T	E	Y	M	A	R	G	C	L	L	D
BMX	T	E	Y	I	S	N	G	C	L	L	N
BTK	T	E	Y	M	A	N	G	C	L	L	N
EGFR	T	Q	L	M	P	F	G	C	L	L	D
HER2	T	Q	L	M	P	Y	G	C	L	L	D
HER4	T	Q	L	M	P	H	G	C	L	L	E
ITK	F	E	F	M	E	H	G	C	L	S	D
JAK3	M	E	Y	L	P	S	G	C	L	R	D
TEC	T	E	F	M	E	R	G	C	L	L	N
TXK	T	E	F	M	E	N	G	C	L	L	N

^aTR = Türsteher Aminosäure

Wie erwartet zeigte **24d** eine hohe Aktivität gegenüber EGFR^{T790M} sowie der Doppelmutante EGFR^{L858R/T790M}. Beide Varianten wiesen unter 10 % Restaktivität auf. Zudem wurden die meisten Kinasen, welche das bereits angesprochene analoge Cystein besitzen so weit inhibiert, dass maximal 50 % Restaktivität gemessen werden konnte. Somit belegen diese Kinasen das obere Viertel der Gesamtmenge an getesteten Kinasen (Abbildung 35). Außerhalb der 50 % Restaktivität-Grenze konnten nur 4 Cystein-tragende Kinasen gefunden werden, diese waren in aufsteigender Reihenfolge: EGFR^{L858R}, JAK3, ITK und HER2.

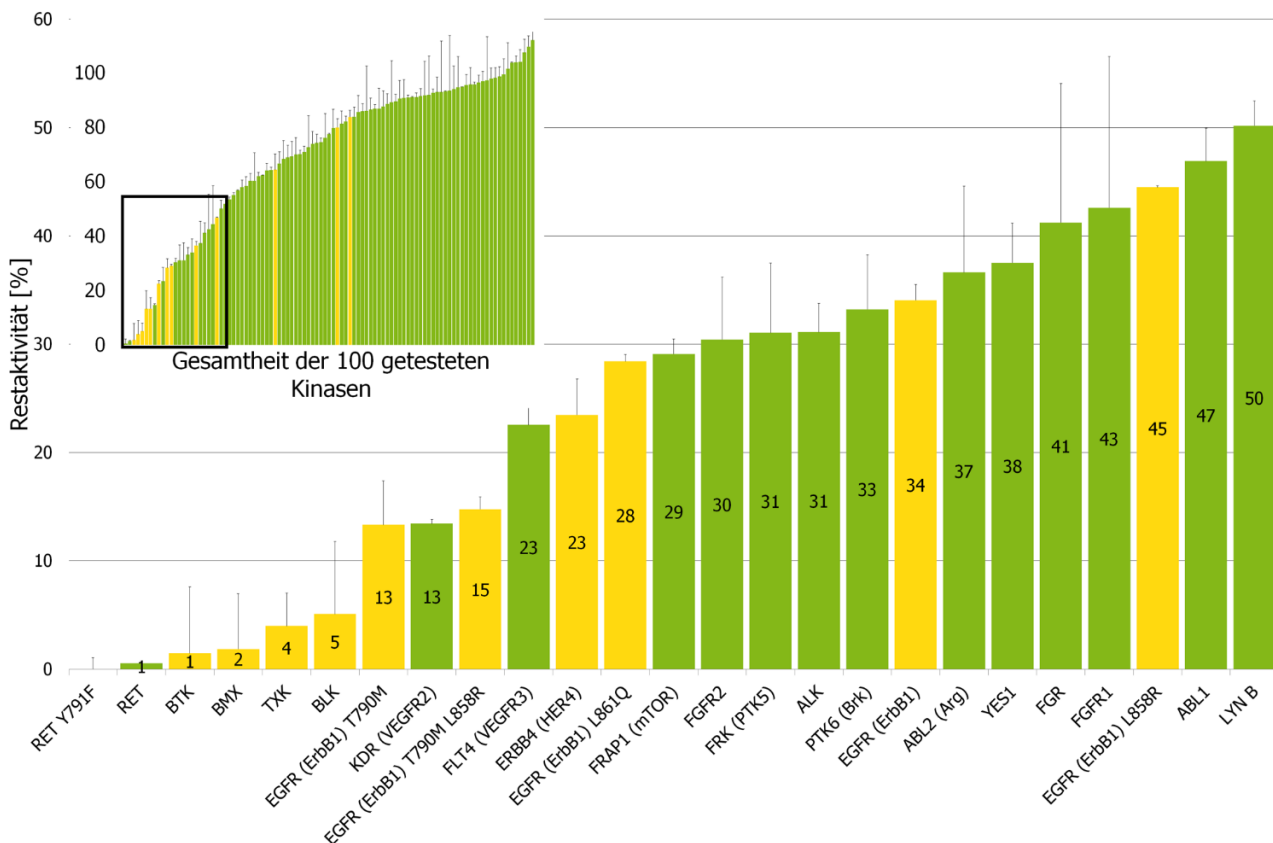


Abbildung 35 Visualisierung der Ergebnisse der Profilierung von **24d** gegen 100 ausgewählte Kinasen (Links oben: Übersicht der kompletten Profilierung). Die 25 am stärksten inhibierten Kinasen sind samt korrespondierenden Aktivitätswerten (in Prozent) angegeben. Gelb-markiert sind hierbei die Kinasen, welche ein EGFR analoges Cystein tragen (Cys797, Tabelle 8). Die Profilierungsdaten wurden durch den *SelectScreener® Profiling Service* der Firma Life Technologies erstellt.

3.1.9 Methodenentwicklung MS

Wie in Abschnitt 1.2.2 und Abschnitt 1.3.1 beschrieben, ist es für eine hinreichende Beschreibung der Bindungszustände kovalenter und kovalent-reversibler Inhibitoren im Protein dringend erforderlich Parameter und Experimente heranzuziehen, welche eine genauere Charakterisierung des im Protein gebunden Moleküls zulassen. Im Falle von kovalent-irreversibel bindenden Inhibitoren konnte sich die Bestimmung der kinetischen Parameter (K_i und k_{inakt}) in der wissenschaftlichen Forschungsgemeinde etablieren. Durch die Erhebung dieser beiden Parameter ist es möglich eine belastbare Aussage über die Affinität des Inhibitors zum Protein zu treffen.

Durch die speziellen kinetischen Eigenschaften von kovalent-reversiblen Inhibitoren ($k_{-1} > 0$) und dem damit veränderten Bindungsmechanismus im Vergleich mit kovalent-irreversiblen Inhibitoren (Abbildung 33), mussten für diese Klasse von Inhibitoren neue Methoden entwickelt werden, welche eine ähnlich belastbare und schnelle Aussage über ihre Bindungseigenschaften treffen können. SERAFIMOVA *et al.* gelangten zu der Hypothese, dass kovalent-reversible Inhibitoren so lange an ihrem Protein gebunden sind, bis es durch Proteinentfaltung zu einer Änderung der pH-Umgebung kommt und dadurch die reversible Dissoziation des Inhibitors begünstigt wird.^{91,180} BRADSHAW *et al.* zeigten

zudem, dass durch Variation der unterschiedlichen elektronenziehenden Reste eine starke Variation der Besetzungsdauer am Protein erzielt werden kann.⁹⁴ Da es sich bei diesen Publikationen um die Vorreiter in der Entwicklung dieser Inhibitorenklasse handelt wurde ein besonderes Augenmerk auf die Charakterisierung der Bindungseigenschaften gelegt. Jedoch konnte in beiden Fällen nur in zeitlich getrennten Experimenten die Bestimmung der einzelnen Bindungsbestandteile erreicht werden.

Mit der hier generierten fokussierten Substanzbibliothek von kovalent-reversiblen Inhibitoren (**24a – e**, siehe Tabelle 5) sollte nun eine schnelle experimentelle Methode, basierend auf MS-Messungen entwickelt werden. In dieser sollte gezeigt werden, dass die Bindung von kovalent-reversiblen Inhibitoren im intakten Protein durchaus reversibel ist (Abbildung 36).⁹⁰ Durch die Generierung von komplementären kovalent-reversiblen und kovalent-irreversiblen Inhibitoren konnten Änderungen des Bindungsverhaltens im Protein direkt auf das reaktive Elektrophil zurückgeführt werden. Um zu zeigen, dass kovalent-reversible Inhibitoren durch kovalente Inhibitoren im Protein verdrängt werden können, wurde das Zielprotein (EGFR^{T790M}) für drei Stunden auf Eis mit einem kovalent-reversiblen Inhibitor inkubiert. Nach Ablauf der drei Stunden wurde ein Aliquot entnommen und in flüssigem Stickstoff als Referenz für spätere MS-Messungen eingefroren. Der restliche Protein-Inhibitor-Komplex wurde mit äquimolaren Mengen eines kovalenten Inhibitors versetzt, der sich nur durch die reaktive Michael-Akzeptor-Gruppe, vom kovalent-reversiblen Inhibitor unterscheidet. Nach weitere Inkubation von einer Stunde auf Eis wurden beide Proben mittels ESI-MS vermessen.

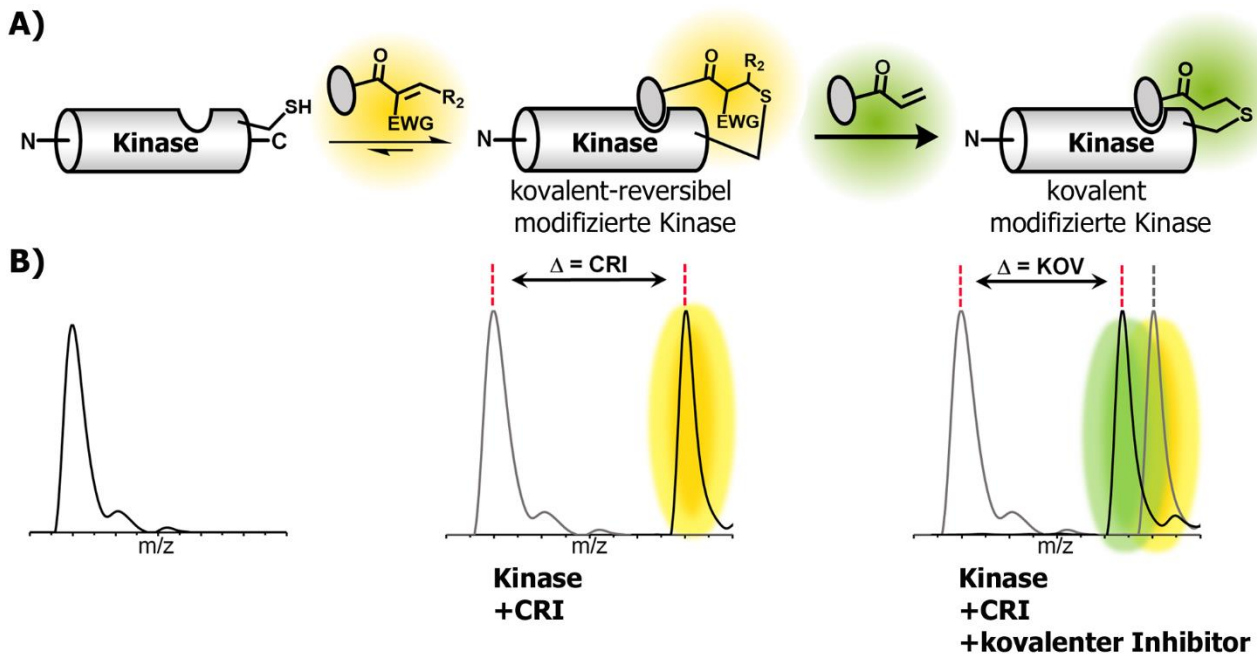


Abbildung 36 Experimenteller Aufbau zur Charakterisierung von kovalent-reversiblen Inhibitoren. **A)** Schematische Darstellung der erwartenden Abfolge der Bindung des kovalent-reversiblen Inhibitors (hervorgehoben in Gelb) und des zur Verdrängung zugesetzten kovalenten Gegenspielers (hervorgehoben in Grün). **B)** Dem Versuchsaufbau entsprechenden erwartenden MS-Spektren. Von links nach rechts: Das Masse-Ladungsverhältnis des apo Proteins als einzelnes Signal. Die Zugabe des kovalent-reversiblen Inhibitors (hervorgehoben in Gelb) führt zu einer vollständigen Markierung des Proteins. Visualisiert durch eine Massenzunahme gegenüber des apo Proteins korrespondierend zur Masse des Inhibitors ($\Delta = \text{CRI}$). Durch Zugabe und Inkubation des kovalenten Inhibitors (hervorgehoben in Grün) findet eine komplette Verdrängung des kovalent-reversiblen Inhibitors aus der Bindetasche statt, sodass die Verschiebung im Vergleich zum apo Protein einer vollständigen Markierung mit dem kovalenten Inhibitor entspricht ($\Delta = \text{KOV}$).

Die vorliegenden Spektren zeigen, dass die kovalenten Inhibitoren die kovalent-reversiblen Inhibitoren vollständig aus der Proteinbindetasche verdrängen konnten. Bei keinem der untersuchten Inhibitoren konnte eine signifikante Restmenge von kovalent-reversibel markiertem Protein detektiert werden (Abbildung 37A und Abbildung A1, Seite II). In Abbildung 37A ist beispielhaft die Bindung von **25a** in EGFR^{T790M} aufgeführt. Nach dreistündiger Inkubation auf Eis ist eine fast vollständige Besetzung im Protein zu beobachten (repräsentiert durch die Verschiebung der gemessenen Massen korrespondierend zur Molekülmasse von 464 g/mol). Nach Zugabe des korrespondierenden kovalenten Inhibitors **1a** und weiterer Inkubation über eine Stunde auf Eis findet eine weitere Verschiebung der gemessenen Proteinmasse statt. Diese korreliert passend zur vorgestellten These (Abbildung 36B) mit einer kombinierten Masse aus Protein und kovalenten Inhibitor. Als Kontrolle, dass der Verdrängungseffekt nicht auf unterschiedlichen Affinitäten des Inhibitors zum Protein basiert wurde das Experiment mit zwei rein kovalenten Inhibitoren (**1a** und **1e**) durchgeführt. Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer biochemischen Aktivität gegenüber EGFR^{T790M}, weisen aber eine hohe strukturelle Übereinstimmung auf (Phenyl- (**1e**) zu Naphtyl-Substitution (**1a**), vgl. Abbildung 37B).

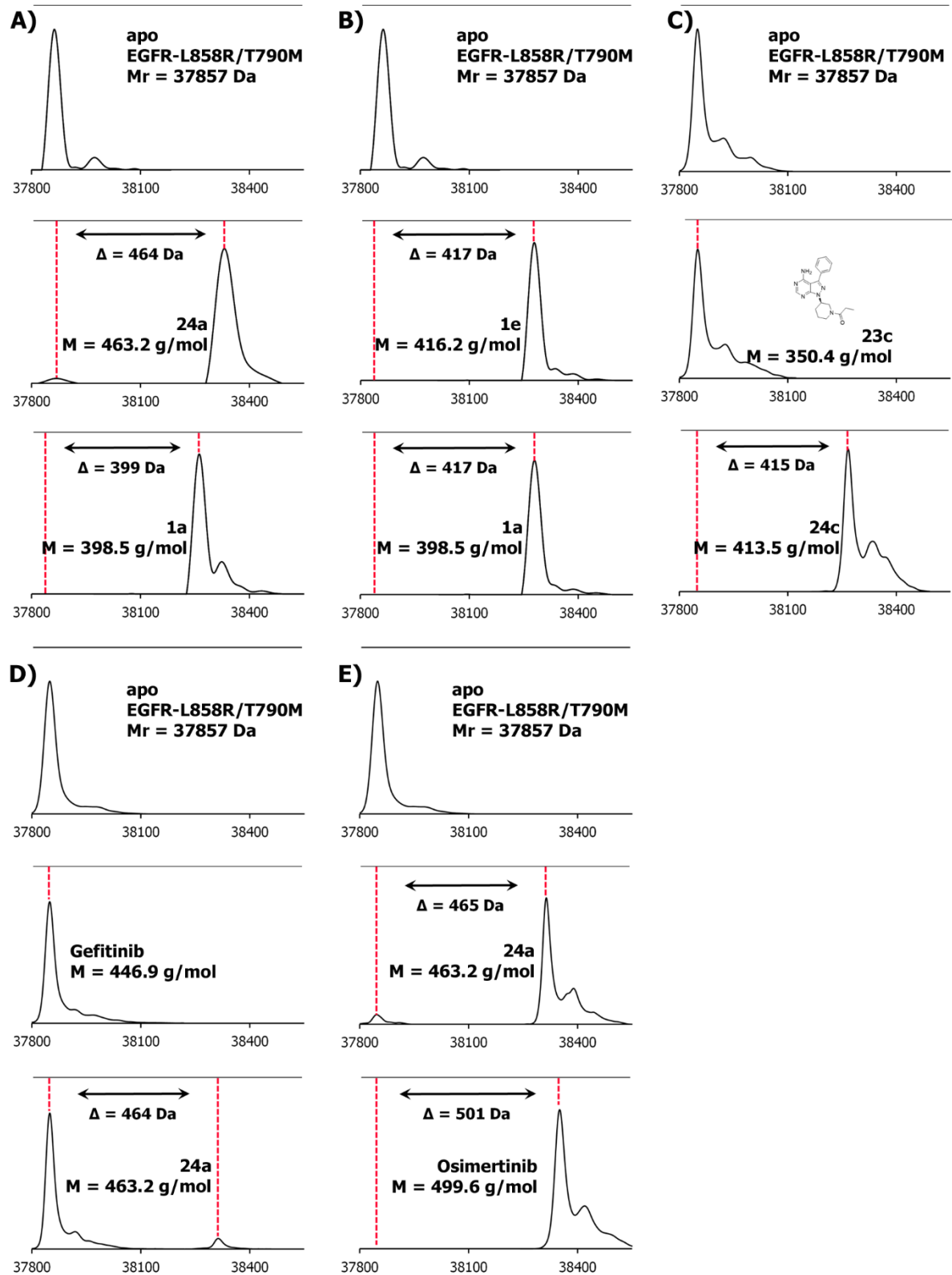


Abbildung 37 Dekonvolvierte MS-Spektren von EGFR^{T790M} inkubiert mit DMSO (jeweils oberes Spektrum **A – E**) und verschiedenen Kombinationen von Inhibitoren. **A)** kovalent-reversibler Inhibitor **24a** (mittleres Spektrum) und kovalenter Inhibitor **1a** (unteres Spektrum). **B)** kovalenter Inhibitor **1e** (mittleres Spektrum) sowie kovalenter Inhibitor **1a** (unteres Spektrum). **C)** reversibler Inhibitor **23c** (mittleres Spektrum) sowie kovalent-reversibler Inhibitor **24c** (unteres Spektrum). **D)** kommerziell verfügbarer reversibler Inhibitor Gefitinib (mittleres Spektrum) sowie kovalent-reversibler Inhibitor **24a** (unteres Spektrum). **E)** kovalent-reversibler Inhibitor **24a** (mittleres Spektrum) sowie der kommerziell verfügbare kovalente Inhibitor Osimertinib (unteres Spektrum).

Es zeigte sich sehr deutlich, dass der weitaus potentere Inhibitor **1a** im gewählten experimentellen Aufbau nicht in der Lage war den schwachen EGFR-Inhibitor **1e** zu verdrängen. Trotz des deutlichen Massenunterschieds beider Verbindungen sind in den aufgenommenen Spektren ausschließlich Proteinmassen zu finden die mit einer Bindung von **1e** korrelieren (38274 Da). Um auszuschließen, dass die synthetisierten Verbindungen durch eine starke reversible Bindung zum Protein massenspektrometrisch zu detektieren sind wurde eine rein reversibel bindende Verbindung (**23c**) im experimentellen Aufbau vermessen. Wie aus Abbildung 37C zu entnehmen, zeigt auch nach dreistündiger Inkubation mit Verbindung **23c** keine Änderung der apo-Proteinmasse. Durch die Zugabe der korrespondierenden kovalent-reversiblen Verbindung **24c** konnte eine vollständige Besetzung des Proteins beobachtet werden ($\Delta = 415$ Da, $M_{25c} = 413.5$ g/mol, nach Inkubation über 18 h auf Eis). Hierbei konnte ferner gezeigt werden, dass kovalent-reversible Inhibitoren reversible Inhibitoren aus der Proteinbindetasche verdrängen und nachhaltig inaktivieren können. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die hier synthetisierten kovalent-reversiblen Inhibitoren Inhibitoren mit einem abweichenden Grundgerüst verdrängen können. Hierfür wurde der reversible Inhibitor der ersten Generation, Gefitinib, mit EGFR^{T790M} inkubiert und massenspektrometrisch vermessen. Es zeigte erwartungsgemäß keine Verschiebung der zuvor aufgenommenen apo-Proteinmasse (Abbildung 37D). Nach Zugabe von **24a** und Inkubation auf Eis konnte eine Proteinspezies mit einer sehr niedrigen Intensität gefunden werden, welche eine Massendifferenz korrespondierend zu Masse von **24a** aufweist ($\Delta = 464$ Da, $M_{25a} = 463.2$ g/mol). Die sehr schwache Markierungseffektivität des CRI **24a** resultiert vermutlich aus der initial sehr hohen Affinität von Gefitinib zu EGFR^{T790M}. Abschließend wurde getestet, ob es möglich ist CRI der Pyrrolopyrimidin-Klasse durch klassisch kovalente Inhibitoren eines abweichenden Grundgerüsts zu verdrängen. Hierfür wurden die beiden Inhibitoren **24a** und Osimertinib in dem bekannten experimentellen Aufbau verwendet. Abbildung 37E zeigt deutlich die zunächst vollständige Markierung von EGFR^{T790M} durch **24a** (38322 Da, $\Delta = 465$ Da, $M_{25a} = 463.2$ g/mol) und die anschließende Verdrängung durch Osimertinib (38358 Da, $\Delta = 501$ Da, $M_{\text{Osimertinib}} = 499.6$ g/mol).

3.2 Akt-Inhibitoren

3.2.1 Besonderheiten des Aufbaus von Akt

Akt ist eine Ser-/Thr-spezifische Kinase, welche eine zentrale Rolle im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg einnimmt (siehe Abbildung 38). Durch die Lage inmitten des Signalwegs spielt Akt, auch Proteinkinase B oder PKB, eine entscheidende Rolle in den verschiedensten Zellprozessen, u. a. in der Proteinbiosynthese, der Proliferation oder im Glukose Metabolismus.¹⁸¹

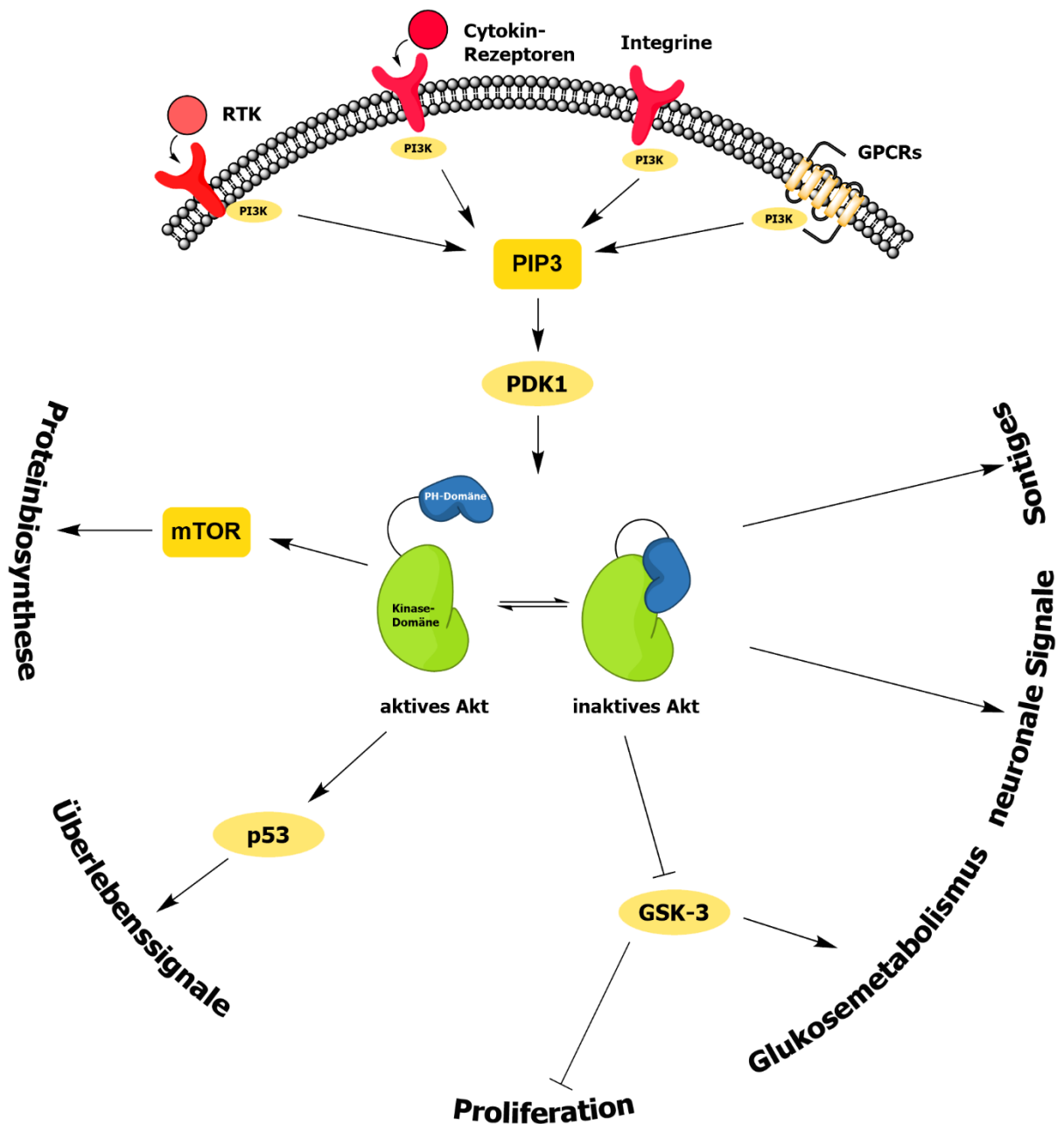


Abbildung 38 Schematische Darstellung der von Akt beeinflussten Signalwege. Abbildung frei nach NITULESCO *et al.*¹⁸²

Nachgewiesener Maßen spielt die Fehlregulierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in mehreren malignen Tumoren wie Lungen-, Prostata-, Gebärmutter-, Gebärmutterhals- und Hautumoren eine Rolle.¹⁸³ Neben diesen, nicht ursprünglich durch fehlreguliertes Akt hervorgerufenen, Krebsarten konnte eine Aktivierungsmutation (Akt^{E17K}) sowie Überexpression von Akt in einer speziellen Art von metastasierenden Brustkrebs identifiziert werden.¹⁸⁴ Zusätzlich wurde beobachtet, dass eine konstitutionelle Aktivität von Akt zu einer Resistenz gegenüber der klassischen Radio- und Chemotherapie führt.¹⁸⁵ Die Kombination aus der zentralen Rolle in einem wichtigen Signalweg und die direkte Beteiligung von Akt in Brustkrebs führten zu einem erhöhten Interesse an Akt als Adressierungsziel für wirksame und selektive Inhibitoren.¹⁸²⁻¹⁸³ Alle Kinasen der AGC-Superfamilie zeichnen sich durch einen sehr hohen Grad an Homologie der Kinasedomäne aus. Hierdurch erschwert sich die Entwicklung von Akt-selektiven Inhibitoren. Akt besitzt zudem drei strukturell sehr eng verwandte Isoformen, welche die Entwicklung von ATP-kompetitiven Inhibitoren zusätzlich erschweren.¹⁸⁶ Sehr potente ATP-kompetente Inhibitoren wie Ipatasertib¹⁸⁷ und Afuresertib¹⁸⁸ (Abbildung 39) sind bereits in klinischen Studien (Phase I/II) bei einer Vielzahl von Indikation untersucht worden.¹⁸⁹⁻¹⁹² Jedoch zeigten auch diese hoch-potenten Inhibitoren nur eine äußerst unbefriedigende Selektivität innerhalb der AGC-Familie.^{183,193}

Neben der Kinasedomäne besitzt Akt eine Pleckstrin-Homologie Domäne (PH-Domäne).^{181,194} Durch eine PIP3-vermittelte Konformationsänderung faltet sich die PH-Domäne auf die Kinasedomäne und blockiert die ATP-Bindetasche (PH-*in* Konformation; Abbildung 38). Dies ist gleichbedeutend mit der Inaktivierung der Kinase.¹⁹⁵ Für die Entwicklung von Inhibitoren ist dieser spezielle Aktivierungsmechanismus von Akt relevant, da durch die relative Lage von PH- und Kinasedomäne eine Bindetasche zwischen beiden Domänen entsteht, welche durch Bindung eines passenden allosterischen Antagonisten zur Stabilisierung des PH-*in*-Zustands führen kann, und damit Akt in seiner inaktiven Form arretiert.¹⁹⁶ Zusätzlich konnte kürzlich eine rein konformationsabhängige Wirkung von Akt identifiziert werden, welche zu einem erhöhten Überlebenssignal in Krebszellen führt.¹⁹⁷

Im Gegensatz zu ATP-kompetitiven Inhibitoren können allosterische Inhibitoren durch ihre Lokalisation weit abseits des aktiven Zentrums zu immensen Vorteilen bei der Selektivität führen, da diese Taschen in der Regel nicht stark konserviert im Kinom vorliegen.¹⁹⁸ Eine zielgerichtete Synthese solcher Inhibitoren wurde 2010 durch die erfolgreiche Kristallisation von Akt-1/2¹⁹⁹ in Akt ermöglicht.²⁰⁰ Des Weiteren konnten BARNETT *et al.* in einen Aktivitätsbasierten Assay feststellen, dass Akt-1/2 ausschließlich in Anwesenheit der PH-Domäne eine inhibitorische Aktivität aufweist, während Mutationsvarianten ohne PH-Domäne keinerlei Aktivität zeigten.²⁰⁰ Diese Vorarbeiten führten zu mehreren potenten und selektiven Inhibitoren, welche ihre Wirkung durch die Stabilisierung der geschlossenen Konformation erzielen. Im Besonderen sind hierbei die in der Klinik

befindlichen Kandidaten MK-2206²⁰¹ (Phase II abgeschlossen)²⁰² und ARQ 092²⁰³ (laufende Phase I)²⁰⁴ genannt.

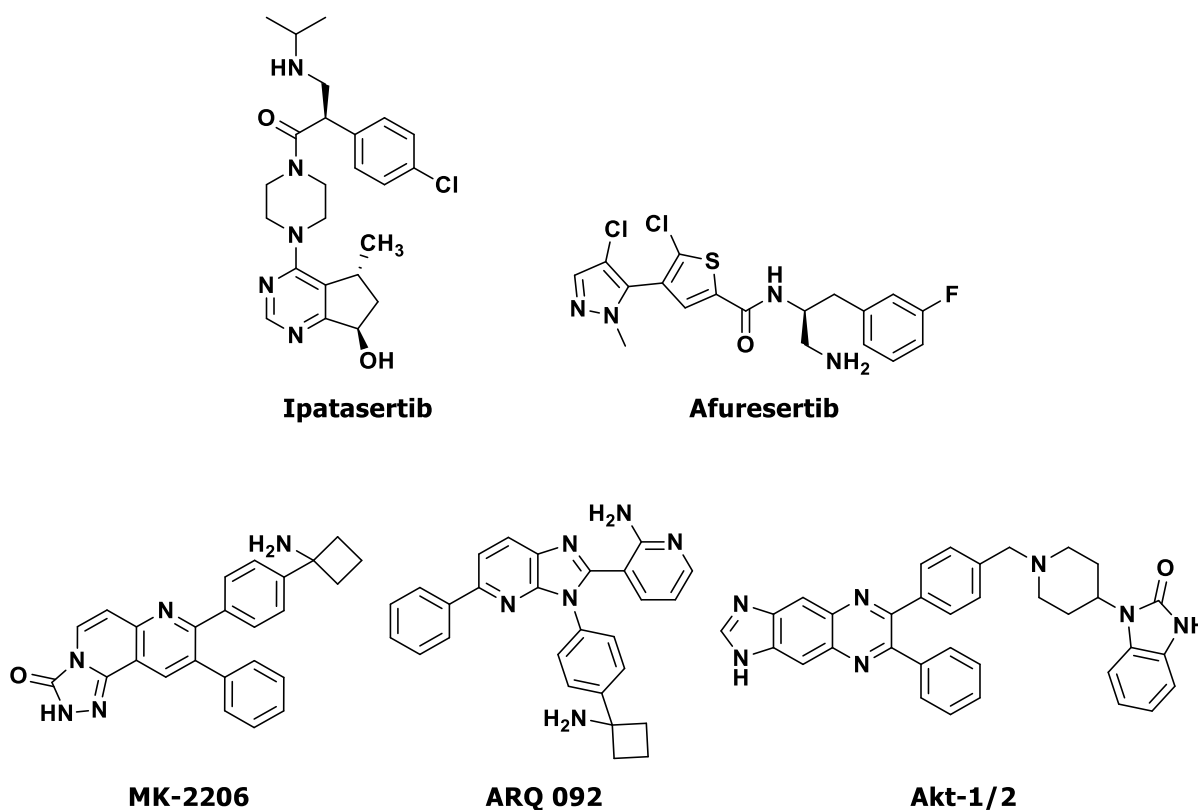


Abbildung 39 Übersicht der in der Klinik befindlichen Akt-Inhibitoren.

Eine Untersuchung der Kristallstruktur von Akt in Komplex mit Akt-1/2 zeigt ein durch kovalente Inhibitoren adressierbares Cystein (Position 296, Abbildung 40). Ausgehend von dieser Beobachtung konnten WEISNER und GONTLA *et al.* ein, auf dem 1,6-Naphthyridon-Grundgerüst basierenden, neuartigen allosterischen Inhibitor entwickeln, welcher Akt in seiner PH-*in* Konformation durch kovalente Modifikation von Cys296 fixiert. In biochemischen und zellbiologischen Untersuchungen konnte zudem bereits eine überlegene Aktivität verglichen mit MK-2206 gezeigt werden (**3a** vs. MK-2206, $IC_{50} = 0.2$ vs. 10 nM).¹¹⁷

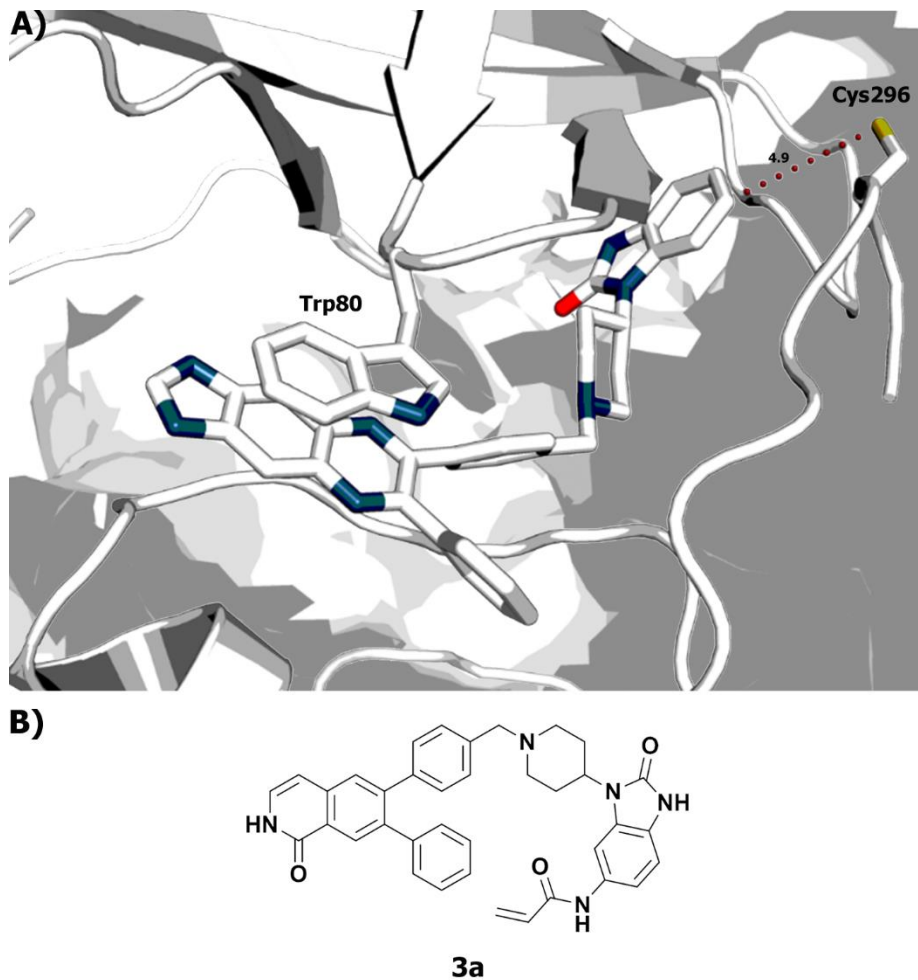


Abbildung 40A) Kristallstruktur von Akt-1/2 in Akt^{WT} (PDB: 3o96). In roten Punkten ist der Abstand (4.9 Å) zu Cys296 dargestellt, welches durch Michael-Akzeptoren adressiert werden kann. **B)** Auf dieser Beobachtung aufbauender kovalenter Akt Interdomänen-Inhibitor **3a** erstmals synthetisiert von WEISNER und GONTLA *et al.*¹¹⁷

Neben einer genauen Kenntnis des Aufbaus der zu adressierenden Bindetasche ist die Auswahl eines passenden Assays zur Detektion der allosterischen Bindung von grundlegender Bedeutung bei der Entwicklung von allosterischen Interdomänen-Inhibitoren. Durch den von FANG *et al.* entwickelten *interface-Fluorescent Labels in Kinases* (iFLiK) Assay ist es möglich diese Bindung direkt zu detektieren.^{116,205} In ein künstlich hergestelltes Akt-Konstrukt (Akt^{E49C/C296S/C310S/C344S}) wird PyMPO über eine Michael-Addition an Cys49 eingebracht. Der an der PH-Domäne eingebrachte Fluorophor reagiert äußerst sensitiv auf Änderungen in der mikrochemischen Umgebung. Im Falle der Konformationsänderung nach Bindung eines allosterischen Inhibitors von PH-*in* zu PH-*out* ist demnach eine Verschiebung des Emissionsspektrums zu beobachten (Abbildung 41).¹¹⁶ Da ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren eine solche Konformationsänderung nicht induzieren kommt es zu einer zuverlässigen Diskriminierung dieser beiden Inhibitorarten. Dadurch ermöglicht der iFLiK-Assay das Durchmustern großer Substanzbibliotheken nach Interdomänen-Inhibitoren.

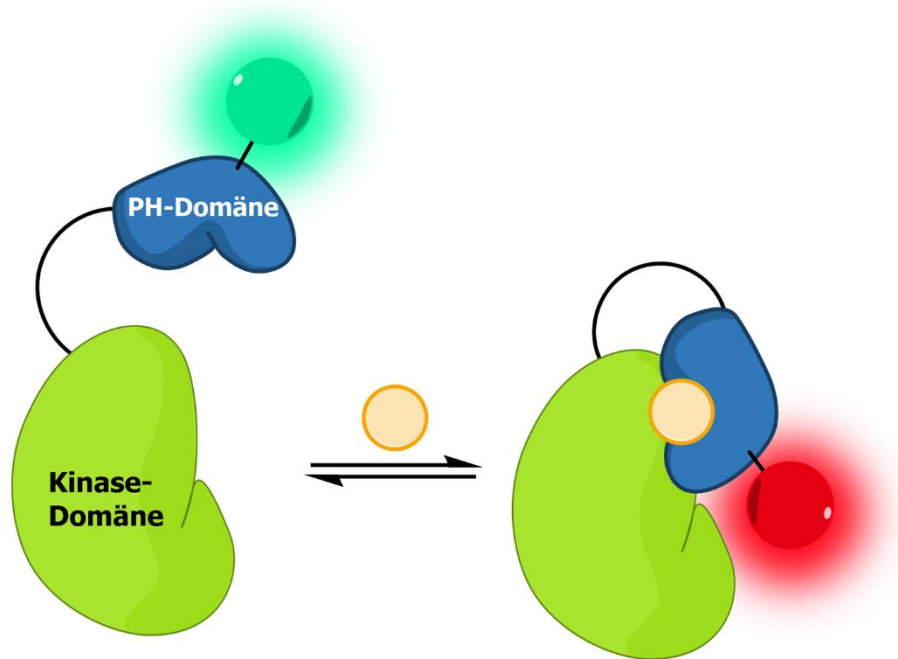
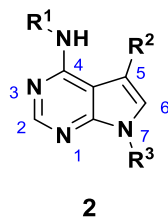


Abbildung 41 Prinzip des iFLiK-Assays: Die Detektion der direkten Bindung eines allosterischen Interdomänen-Inhibitors (orange) erfolgt über eine Änderung des Emissionsspektrums des umgebungssensitiven Fluorophors durch die Konformationsänderung zwischen PH-*out* (blau-grün) und PH-*in* Konformation (rot).

3.2.2 Design und Synthese neuartiger allosterischer PH-Domänen abhängiger Akt-Inhibitoren²⁰⁶

In einer von ZHIZHOU FANG durchgeführten Durchmusterung unter Anwendung des iFLiK-Assays von ~41.000 Verbindungen wurden insgesamt sieben Verbindungen identifiziert, welche einen inhibitorischen Effekt auf Akt ausschließlich in Volllänge aufweisen (Tabelle 9).²⁰⁵ Durch das experimentelle Design des Assaysystems konnten diese Verbindung zweifelsfrei als allosterische Inhibitoren ausgemacht werden.

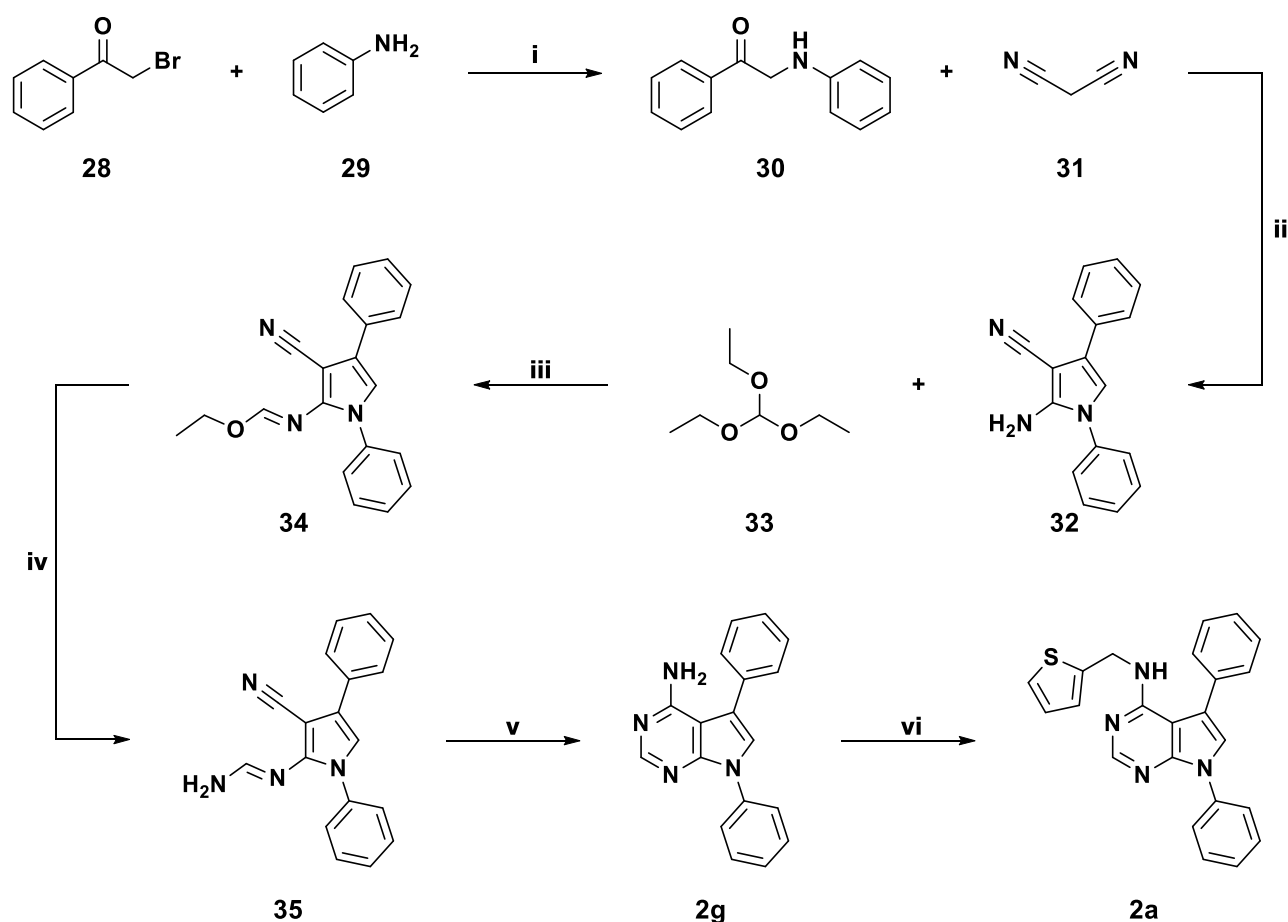
Tabelle 9 Übersicht der durch ZHIZHOU FANG identifizierte allosterischen Akt Inhibitoren **2**.²⁰⁵

N°	R ¹	R ²	R ³
a			
b			
c			
d			
e			
f			
29			

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich haben diese initialen Verbindungen, in ihrem 4,5,7-trisubstituierten Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-Kern (**2**), ein gemeinsames Strukturmotiv. Diese sehr kleinen hydrophoben Verbindungen sollten zu Beginn dieser Arbeit resynthetisiert werden. Anschließend sollte eine Validierung der in der Durchmusterung gemessenen Aktivitäten durchgeführt werden.

Die von MISSBACH entwickelte fünfstufige Syntheseroute zur Generierung von 4-Aminopyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin (**2g**) sollte im Rahmen dieser Arbeit mit einer Substitution an 4-Position erweitert werden um die gewünschten initialen *Hit*-Strukturen zu generieren (Schema 8).²⁰⁷

Schema 8 Reaktionskaskade zur Synthese von Pyrrolopyrimidinen nach MISSBACH erweitert durch eine abschließende *N*-Alkylierung.^{a, 207}



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) ACN, rt; (ii) Na, EtOH, 55 °C; (iii) reflux; (iv) NH₃ (8 %) in EtOH, rt; (v) NH₃ (8 %) in EtOH, Druckgefäß, 140 °C; (vi) 2-(Chlormethyl)thiophen (**36**), DIPEA, DMF, 80 °C.

Im ersten Schritt wurde 2-Bromoacetophenon (**28**) mittels nukleophiler Substitution mit Anilin (**29**) verknüpft. Durch die basischen Eigenschaften von Anilin konnte diese Substitution unkatalysiert in Acetonitril bei Raumtemperatur erfolgreich durchgeführt werden. Angelehnt an die HANTZSCHE Pyrrolsynthese²⁰⁸ wurde **30** mit Malonsäuredinitril (**31**) in ethanolischer Natrium-Lösung auf 55 °C erhitzt. Der so geschlossene Pyrrolring (**32**) sollte nun in weiteren drei Schritten oxidativ zum Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin **2g** aufgebaut werden. Hierfür wurde der Pyrrolring **32** sequentiell mit

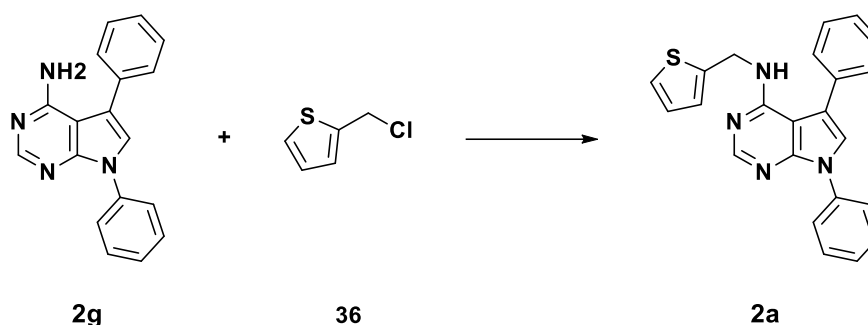
Orthoameisensäuretriethylester (**33**) und Ammoniak umgesetzt. Die entstehenden Produkte **34** und **35** können dabei, teilweise *in situ* weiter zu **2g** umgesetzt werden. Als finalen Schritt sollte abweichend der Vorschrift von MISSBACH eine *N*-Alkylierung der 4-Position durchgeführt werden um das gewünschte Produkt **2a** zu erhalten.

Die Triebkraft der S_N2-Reaktion von α -Bromoacetophenon (**28**) und Anilin (**29**) ist die Präzipitation von Aniliniumbromid während der Reaktion über Nacht. Durch das dauerhafte Entfernen des Salzes aus der Reaktion konnte die eigentliche Gleichgewichtsreaktion stark auf die Produktseite verschoben werden und somit Ausbeuten von bis zu 96 % erzielt werden. Im zweiten Reaktionsschritt wurde mit Hilfe von *in situ* hergestelltem Natriummethanolat Malonsäuredinitril (**31**) deprotoniert. Das so dargestellte Carbanion konnte nun nukleophil die Carbonylgruppe von **30** angreifen. Durch einen zweiten nukleophilen Angriff des Amins aus **30** an der Nitrilgruppe von **31** wurde der Pyrrolring geschlossen. Trotz mehrerer Nebenprodukte in geringen Mengen, welche im LC-MS-Spektrum observiert werden konnten, wurde eine akzeptable Ausbeute von 54 % erzielt. Daran anschließend wurde das vierfach substituierte Pyrrollderivat **32** mit Orthoameisensäuretriethylester (**33**) als Lösemittel und Reagenz bis zum Siedepunkt erhitzt und mehrere Stunden refluxiert. Die Identität des entstandenen *O*-Ethylformimidat-Intermediats **34** konnte aufgrund der nur sehr schlechten Ionisierbarkeit des Produkts nicht über LC-MS bestätigt werden. Durch den deutlich höheren R_F-Wert bei Betrachtung in der Dünnschichtchromatographie konnte trotzdem eine ausreichende Trennung vom Startmaterial erzielt werden. Anschließend wurde von der aufgereinigten Verbindung ein NMR-Spektrum aufgenommen, welches die Identität des gewünschten Produkts zweifelsfrei bestätigte. Verbindung **34** konnte hierbei mit einer Ausbeute von 76 % erhalten werden. Um das für den Ringschluss zum Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-Grundgerüst nötige zusätzliche Amin einzuführen wurde **34** erneut einer Nukleophilen Substitution unterzogen. Als Nukleophil diente dieses mal Ammoniak, welches in ethanolischer Lösung in die Reaktion eingebracht wurde. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 18 h gerührt. Entgegen der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse konnte hierbei in der LC-MS schon ein Umsatz zum Folgeprodukt **2g** beobachtet werden, jedoch nur in äußerst geringen Mengen, **35** stellte weiter hin das Hauptprodukt dar. Daraufhin wurde die Reaktionslösung in ein druckfestes Gefäß überführt und bei 140 °C für drei Stunden gerührt. Eine Vielzahl von Nebenprodukten konnte beobachtet werden, sodass nur eine Gesamtausbeute über zwei Stufen von 32 % erreicht werden konnte. Die entstandenen Nebenprodukte wurden nicht weiter charakterisiert, da sie gehäuft im stark unpolaren Bereich des LC-MS-Spektrums auftraten und demnach nur äußerst schwer zu isolieren waren. Vielmehr wurde versucht über eine geänderte Reaktionsführung einen selektiveren Umsatz zu erzielen. Hierzu wurde die Temperatur der Reaktion auf 90 °C gesenkt und die Reaktionszeit auf 6 h verdoppelt. Diese Maßnahme erbrachte den erwünschten Erfolg. Produkt **2g** konnte nun mit einer

Gesamtausbeute von 63 % mit wenigen Nebenprodukten erhalten werden. Die letztendlich vierstufige Synthesesequenz konnte mit einer Ausbeute von 25 % durchgeführt werden um das gewünschte Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-Grundgerüst zu erhalten.

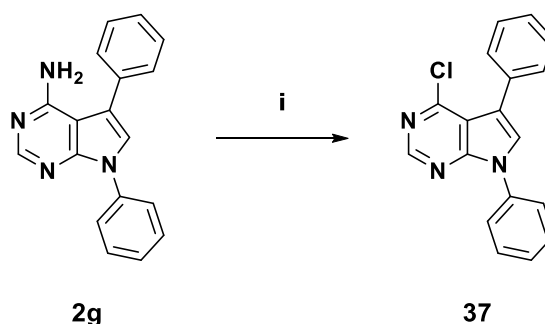
Im nächsten Schritt sollte nun die finale Substitution des an 4-Position befindlichen Amins durchgeführt und die zu Beginn gewünschte initiale *Hit*-Verbindung **2a** generiert werden. Das, durch den Reaktionsweg gegebene Amin an 4-Position, macht es nötig für eine nukleophile Substitution das Thiophen über ein Alkylhalogenid einzuführen (Schema 9).

Schema 9 Theoretische Syntheseroute zur Generierung von **2a**.



2-(Chlormethyl)-thiophen (**36**) oder ähnliche Halogenide sind jedoch äußerst instabil durch die besondere Position des Halogenids am aromatischen Ring. Um diese Instabilität zu umgehen wurde nach Wegen gesucht, die reaktiven Motive der einzelnen Komponenten zu invertieren. Hierfür wurde das aromatische Amin in **2g** mittels einer SANDMEYER-artigen Reaktion in ein Chlorid (**37**) umgewandelt.²⁰⁹ Um anschließend den nukleophilen Angriff mit 2-Thiophenmethylamin (**38**) durchzuführen (Schema 11).

Schema 10 SANDMEYER-artige Halogenierung von **2g**.^a

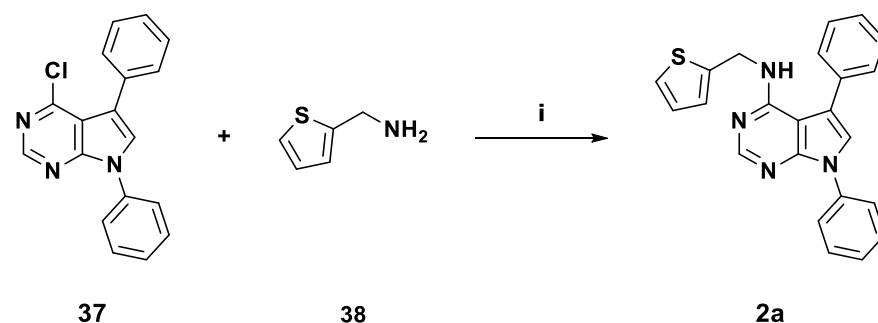


^a Reagenzien und Bedingungen: (i) 1. NaNO₂, HCl in Dioxan/H₂O, 0 °C; 2. CuCl, 60 °C.

Die Diazotierung des Amins wurde mit Natriumnitrit durchgeführt. Die bei 0 °C schnell fortschreitende Reaktion konnte leicht durch die Präzipitation einen gelblichen Salzes aus der Reaktionsmischung verfolgt werden. Die anschließende Umwandlung in das Chlorid konnte unter

Einsatz von Kupfer(I)-chlorid bei 60 °C durchgeführt werden. Die Reaktionsmischung wurde ohne weitere Aufarbeitung weiterverarbeitet, da durch die schlechte Ionisierbarkeit von Chlorid **37** keine fundierten Aussagen über die Identität und Reinheit getroffen werden konnten. Es wurde spekuliert, dass durch die Einführung des sekundärenamins im finalen Schritt die Detektierbarkeit der Verbindung deutlich erhöht wird und dadurch Aufreinigung und Charakterisierung deutlich erleichtert werden würden. Hierfür wurden nun basenkatalysiert 2-Thiophenmethylamin (**38**) und **37** bei 80 °C über Nacht gerührt (Schema 11).²¹⁰ Leider konnten hierbei nur Spuren des gewünschten Produkts **2a** nachgewiesen werden. Da diese Spuren noch mit weiteren Verunreinigungen einhergingen wurde gefolgert, dass die Substitution über die chlorierte Zwischenstufe **37** für dieses Konstrukt keine bzw. nur eine sehr schlechte Alternative darstellt.

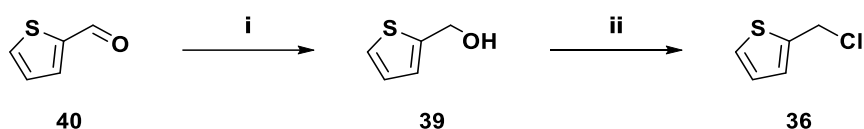
Schema 11 Darstellung von **2a** über die chlorierte Zwischenstufe **37**.^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) DIPEA, DMF, 80 °C.

Nachdem die Inversion der Reaktivitäten nicht erfolgreich war, wurde versucht die ursprüngliche Synthesestrategie zu nutzen. Eine ausgedehnte Recherche zur kommerziellen Verfügbarkeit von 2-(Chlormethyl)thiophen (**36**) lieferte jedoch nur einen europäischen Anbieter, welcher **36** für 312 €/g anbot. CALIENDO *et al.* konnten zeigen, dass 2-Hydroxymethylthiophen (**39**) mit Thionylchlorid unter Mikrowellenbestrahlung zum korrespondierenden Chlorid **36** umgesetzt werden kann.²¹¹ Um den nötigen Alkohol zu generieren wurde das Aldehyd **40** mit Natriumborhydrid bei 60 °C für 1 h reduziert.

Schema 12 Synthesekaskade zur Darstellung von 2-(Chlormethyl)thiophen (**36**) nach CALIENDO *et al.*^a



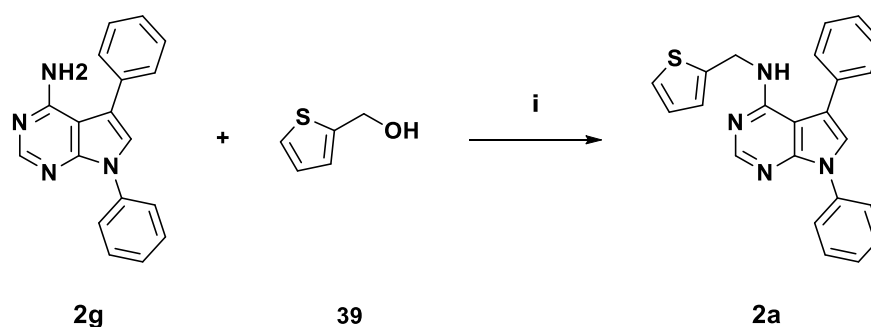
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) NaBH₄, THF, 60 °C; (ii) SOCl₂, Toluol, 55 °C, MW, 30 W.

Reduktion und Chlorierung konnten hierbei mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt werden und zeigten jeweils einen vollständigen Umsatz. Die Kupplung mit dem Amin des Pyrrolopyrimidins

2a (vgl. Schema 9) konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Substitution an der 4-Position des Pyrrolopyrimidins über die klassischen Nucleophilen Substitutionen nicht zugänglich war. Eine Erklärung hierfür könnte der positive mesomere Effekt des Amins sein. Dieser führt im Zusammenspiel mit einem elektronenarmen Aromaten, wie ihn Pyrimidin darstellt, zur Verschiebung der Elektronendichte des Amins in den aromatischen Ring, was eine deutliche Reduktion der Nucleophilie des extrazyklischen Amins zur Folge hat.

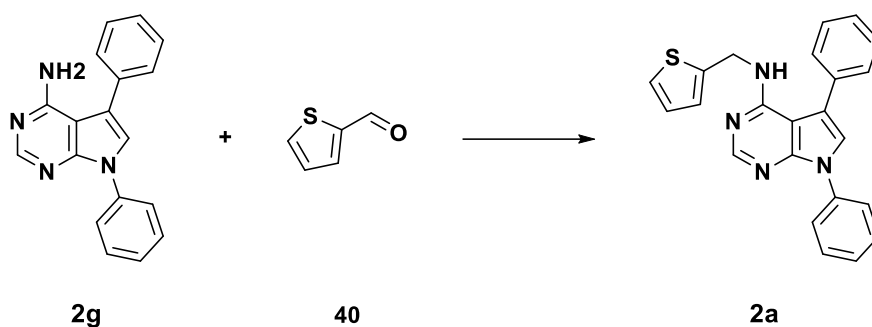
Um die niedrige Nucleophilie des Amins auszugleichen wurde versucht über aktivierte Reagenzien die Kupplung zu erzielen. Hierfür wurde in einem ersten Versuch die MITSUNOBU-Reaktion ausgewählt, welche unter Zugabe von DIAD und Triphenylphosphin bei 40 °C unter Ultraschallbehandlung, die gewünschte *N*-Alkylierung liefern sollte.²¹² Leider konnte auch hier chromatographisch kein Umsatz nachgewiesen werden.

Schema 13 MITSUNOBU *N*-Alkylierung von **2g** zur Darstellung von **2a**.^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) PPH₃, DIAD, THF, 40 °C, Ultraschall.

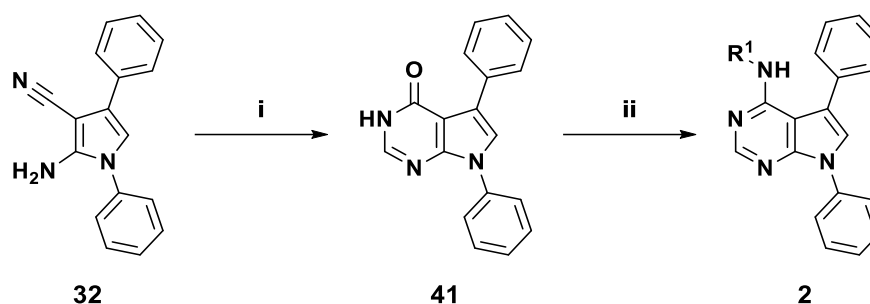
Um eine Derivatisierung über die Zwischenstufe des Amins **2g** doch zu realisieren wurden unterschiedliche Methoden der reduktiven Aminierung durchgeführt. Eine Variation der Katalyse (sauer/basisch) sowie der Reduktionsagenzien wurden unternommen und in Tabelle 10 zusammengefasst.²¹³⁻²¹⁴

Tabelle 10 Übersicht der verschiedenen Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **2a**.

Ansatz	Reduktionsagensz	Katalysator	Ausbeute*
1	NaBH ₄	Piperidin	Spuren
2	NaBH ₄	Essigsäure	Spuren
3	NaCNBH ₃	Schwefelsäure	Spuren
4	NaCNBH ₃	Essigsäure	6 %

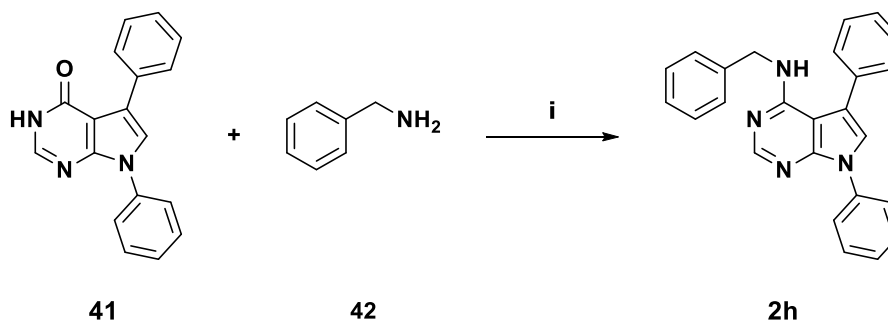
*Ausbeuten der Ansätze 1 – 3 durch LC-MS Analyse, isolierte Ausbeute als Feststoff in Ansatz 4.

Nur bei der Essigsäure-katalysierten Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid konnten kleinstmengen des gewünschten Produkts bei einer Ausbeute von 6 % erhalten werden. Trotz erfolgreicher Synthese der initialen *Hit*-Verbindung konnte durch die oben aufgeführten Versuche deutlich gemacht werden, dass die vorgestellte Syntheseführung nicht zur Generierung einer größeren Substanzbibliothek geeignet ist. Zwar findet, wie in solchen Fällen von Vorteil, die Diversifizierung im letzten Syntheseschritt statt, jedoch nur mit äußerst geringen Substanzmengen. Dies ist zur Generierung einer größeren Bibliothek äußerst unökonomisch und mit einem nicht zu rechtfertigenden Mehraufwand in der Synthese des Vorläufermoleküls verbunden. Es konnte gezeigt werden, dass die geringe Nukleophilie des Amins zu großen Einschränkungen im weiteren Syntheseweg führt. Dadurch wurde deutlich, dass über eine Änderung der Syntheseroute entschieden werden muss. Eine ausgiebige Literaturrecherche lieferte die Arbeiten von MOHAMED *et al.* welche zeigen konnte, dass ausgehend von **32** durch Ameisensäurekatalyse das zweifach substituierte Pyrrolopyrimidon **41** dargestellt werden kann (Schema 14).²¹⁵ Anschließend sollte nun eine Substitution mit verschiedenen Aminen durchgeführt werden. Die Substitution sollte nach den Erfahrungen der oben gezeigten Syntheseroute möglichst über die Bildung von aktivierten Zwischenstufen erfolgen.²¹⁶

Schema 14 Alternative Syntheseroute für **2** über eine PyBOP-aktivierte Zwischenstufe.^a

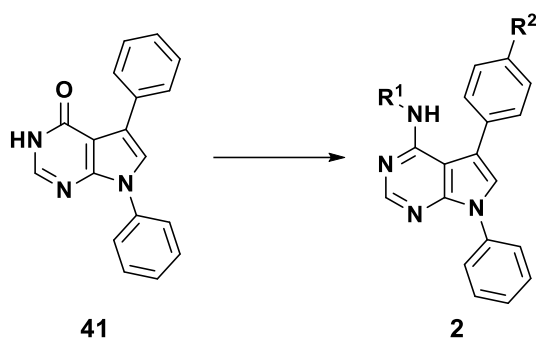
^aReagenzien und Bedingungen: (i) Ameisensäure, reflux, 6 h; (ii) R¹-NH₂, PyBOP, DBU, DCM, rt, 18 h.

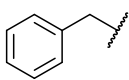
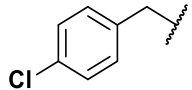
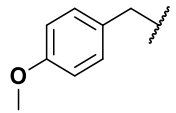
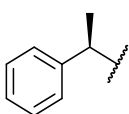
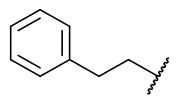
Neben der erwarteten erleichterten Substitution an 4-Position birgt diese Syntheseroute weitere Vorteile. Durch die geänderte Syntheseführung werden drei Schritte obsolet, in welchen die Zwischenprodukte nur müßig aufgereinigt und charakterisiert werden konnten. Zudem stellten diese Schritte eine besondere Herausforderung an die Sicherheitsvorkehrungen während der Synthese dar, da teilweise mit stark erhöhten Drücken gearbeitet wurde. Erste Versuche mit der neuen Syntheseroute lieferten sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Durch Erhitzen zum Rückfluss von **32** in konzentrierter Ameisensäure konnte **41** in einer sehr sauberen Reaktion mit Ausbeuten von bis zu 83 % erhalten werden. Anschließend wurde das Laktam **41** mit PyBOP aktiviert und Amin **42** mit DBU als Base versetzt. Durch die Aktivierung des Laktams und die zugegebene Base reichte die Nukleophilie desamins aus um das erhoffte Produkt **2h** in moderaten Ausbeuten von 51 % zu erhalten (Schema 15).

Schema 15 Direkte PyBOP-vermittelte Aminierung von **41** zu **2h**.^a

^aReagenzien und Bedingungen: (i) PyBOP, DBU, DCM, rt, 18 h.

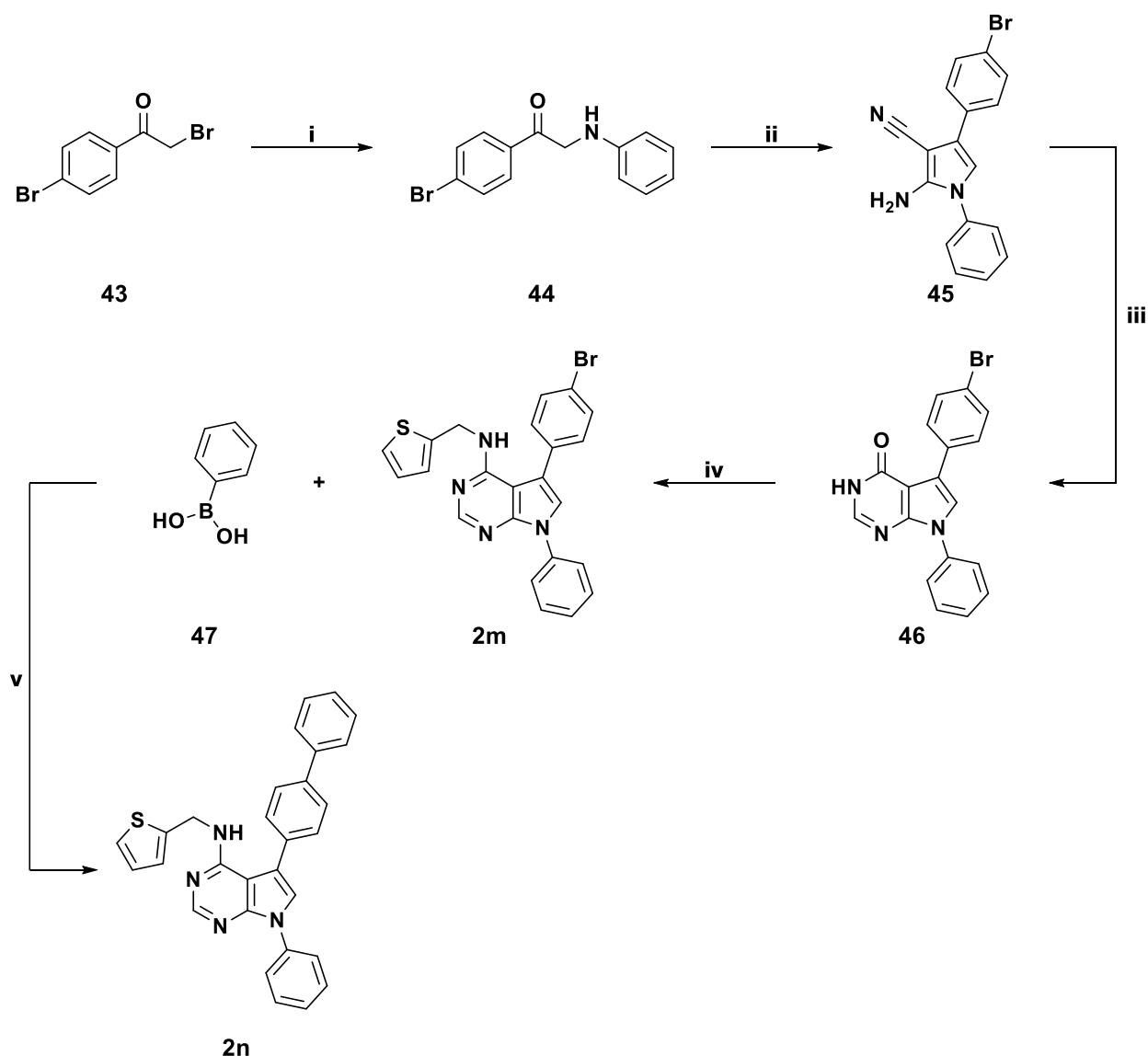
Nach dieser erfolgreichen Machbarkeitsstudie wurde nun eine kleine Auswahl an Verbindungen generiert, welche verschiedene Substituenten an Position 4 führen. Hierfür wurden insgesamt fünf Amine ausgewählt. Ausgehend vom gemeinsamen Vorläufermolekül **41** wurden die Verbindungen **2h – I** anhand des in Schema 15 eingeführten Syntheschemas mit stark variierenden Ausbeuten von 15 – 52 % synthetisiert. Die stark variierenden Ausbeuten sind zumeist auf die sehr schlechte Löslichkeit von **41** zurückzuführen.

Tabelle 11 Übersicht der erfolgreich synthetisierten Derivate **2h – l**.

N°	R ¹	R ²	Ausbeute
h		H	52 %
i		H	15 %
j		H	35 %
k		H	19 %
l		Br	26 %

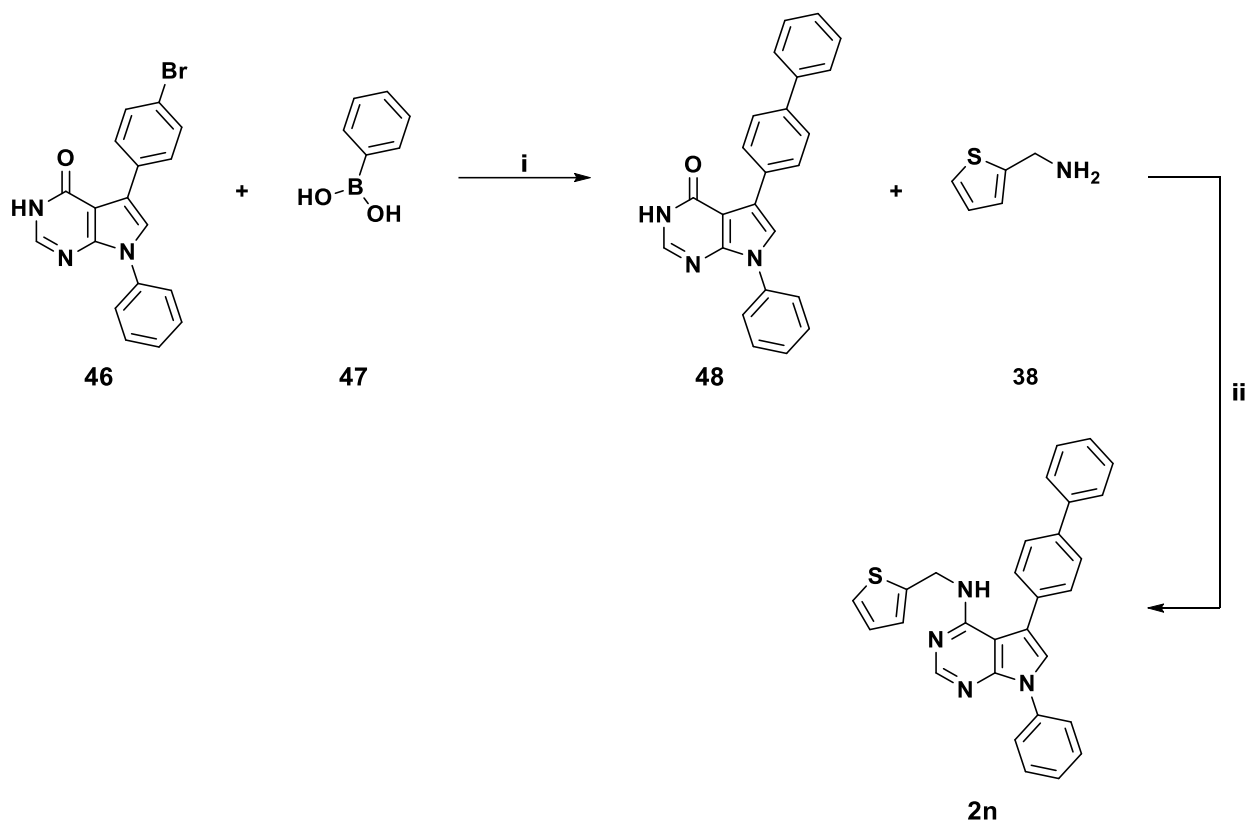
Um weitere Derivatisierungsstellen in das Grundgerüst einzuführen wurde nach modifizierbaren Gruppen gesucht, welche die in Schema 14 und Schema 15 vorgestellte Route nicht negativ beeinflussen und in einem späten Zeitpunkt mit einfach zugänglichen Reaktionen weiter substituiert werden können. Die Wahl fiel zu Beginn auf Halogenide, welche mit Nucleophilen Substitutionen, SUZUKI-Kupplungen oder durch BUCHWALD-HARTWIG Aminierung^{159,217-218} schnell zu neuen Derivaten führen können. Ausgehend von 2,2'-Dibromacetophenon (**43**) konnte über die oben beschriebene Syntheseroute die brominierte Verbindung **2m** dargestellt werden (Schema 16). Die nachfolgende palladium-katalysierte Suzuki-Kupplung mit Phenylboronsäure (**47**) lieferte nicht das gewünschte Zielprodukt **2n**. Dies konnte auf die Eigenschaft des Thiophens Metalle zu komplexieren und dadurch den Katalysezyklus der SUZUKI-Reaktion zu stören, zurückgeführt werden.²¹⁹

Schema 16 Alternative Reaktionskaskade zur Synthese von Pyrrolopyrimidin **2n**.^a



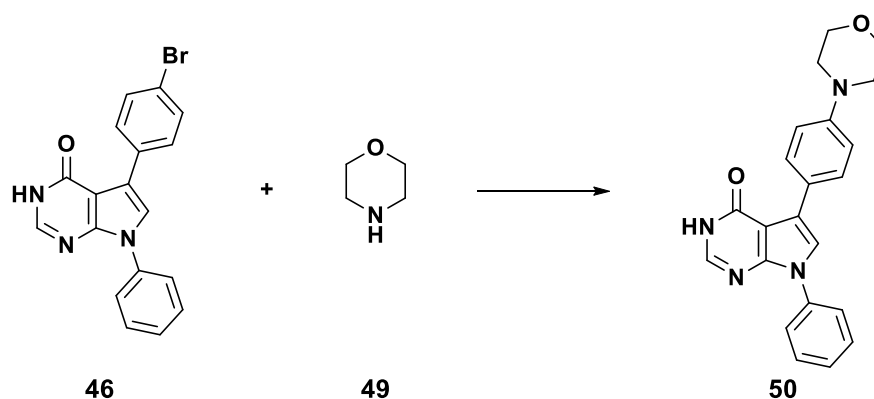
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Anilin, rt; (ii) Malonsäuredinitril (**31**), Na, EtOH, 55 °C; (iii) Ameisensäure, reflux, 6 h; (iv) R¹-NH₂, PyBOP, DBU, DCM, rt, 18 h; (v) Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DME/H₂O (3:1, v/v), 150 °C, MW, 30 W.

Um dennoch die angestrebte Verbindung **2n** zu generieren wurde nun zuerst die Suzuki-Kupplung auf der Stufe des zyklischen Amids **46** durchgeführt, was mit einer moderaten Ausbeute von 32 % gelang. Anschließend wurde **48** über die bereits etablierten Kupplungsbedingungen mit PyBOP und DBU in Reaktion gebracht um Verbindung **2n** mit einer Ausbeute von 36 % zu erhalten (Schema 17).

Schema 17 Syntheseroute zur Darstellung Thiophen-haltiger Pyrrolopyrimidine.^a

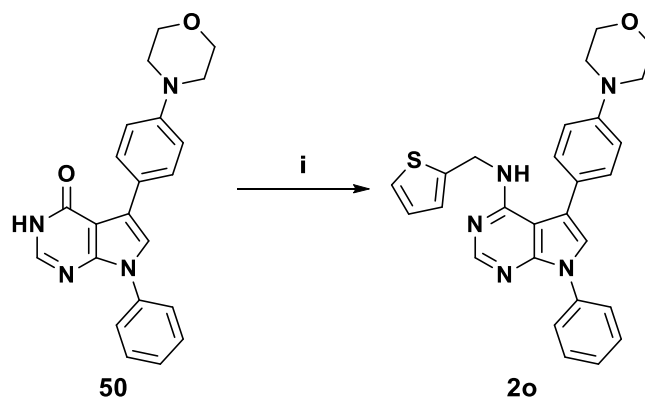
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DME/H₂O (3:1, v/v), 150 °C, MW, 30 W; (ii) PyBOP, DBU, DCM, rt, 18 h.

Um einen Zugang zu hydrophileren Verbindungen zu erhalten wurde versucht über die BUCHWALD-HARTWIG Reaktion Morpholin (**49**) in das bestehende Grundgerüst einzuführen. Zu diesem Zweck wurden ausgehend von **46** verschiedene Reaktionsbedingungen getestet. Vor allem im verwendeten Katalysatorsystem und der Methode der Energiezufuhr wurden Variationen durchgeführt welche in Tabelle 12 zusammengefasst wurden.

Tabelle 12 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten BUCHWALD-HARTWIG Bedingungen zur Synthese von **50**.

Ansatz	Katalysator/Ligand	Base	LM	Bedingungen	Ausbeute
1	Pd(dppf)Cl ₂ /XPhos	NaO ^t Bu	Dioxan	100 °C, 18 h	-
2	Pd(dppf)Cl ₂ /XPhos	NaO ^t Bu	Dioxan	150 °C, 3 h, MW	-
3	Pd(dba) ₂ /XPhos	NaO ^t Bu	Dioxan	100 °C, 18 h	57 %
4	Pd(dba) ₂ /XPhos	NaO ^t Bu	Dioxan	150 °C, 3 h, MW	-

Leider konnte nur bei einer Reaktionsbedingung (Ansatz 3) das erhoffte Produkt **50** nachgewiesen werden. Die so erhaltene Verbindung **50** sollte nun per direkter Aminierung zur Zielverbindung **2o** umgesetzt werden. Es konnte mit den bisher angewendeten Synthesemethoden keinerlei Produktbildung beobachtet werden. Hier zeigte sich wieder deutlich, dass der Aufbau von dreifach substituierten Pyrrolopyrimidinen eine große Herausforderung darstellt.

Schema 18 Schematische Darstellung der direkten Aminierung von **50** zu **2o**.^a

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) PyBOP, DBU, DCM, rt, 18 h.

Wie bereits angesprochen, sollte durch Nutzung von verschiedenen derivatisierten Acetophenonen eine Auswahl von einfach substituierten Zielverbindungen generiert werden. Hierzu wurden die in Abbildung 42 aufgeführten Acetophenone **51** – **53** genutzt. Von den drei vorgestellten Verbindungen konnte nur **51** bis zur finalen Stufe der Syntheseroute genutzt werden. Die Nitroverbindung **52** führte zu keinerlei Produktbildung im ersten Schritt wohingegen das Dimethoxyphenyl-Derivat **53** an der Pyrrol-Ringschlussreaktion scheiterte.

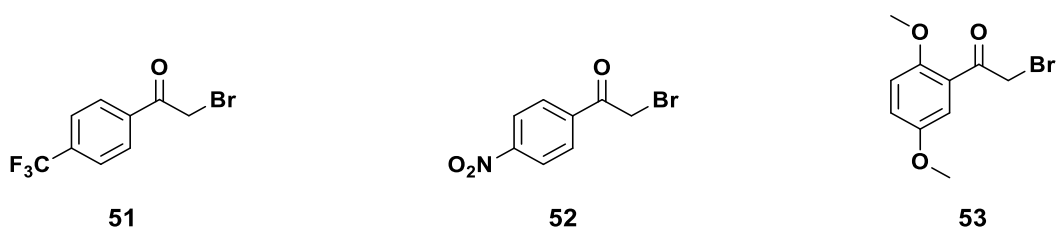
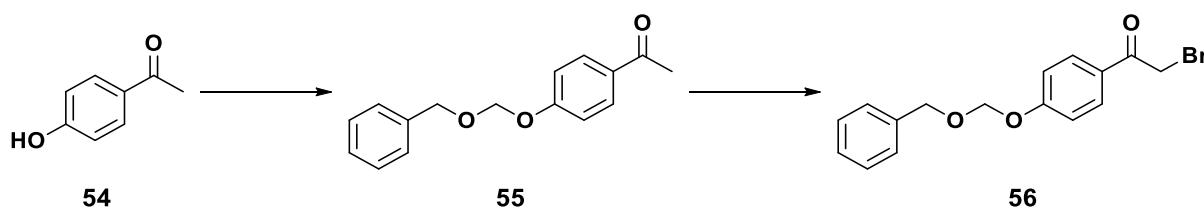


Abbildung 42 Übersicht der analog zu Schema 16 für die Derivatisierung genutzten Acetophenone.

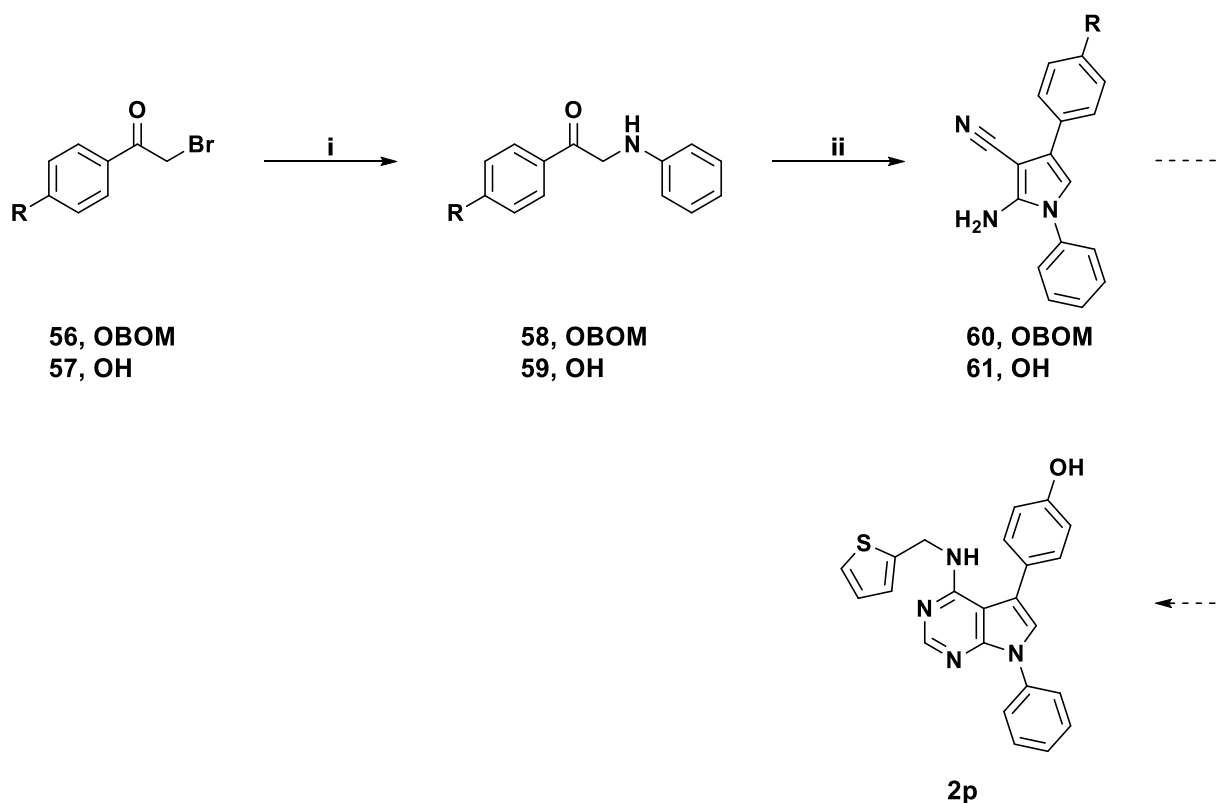
Durch eine geringe kommerzielle Verfügbarkeit von α -Bromoacetophenon-Derivaten war es nötig Bedingungen zu finden, um diese selbst darzustellen. Hierfür sollte zu Beginn der Fokus auf Gruppen gelegt werden, welche zu einer Erhöhung der Hydrophilie der Endverbindungen führen würden. Aus diesem Grund wurde nach einer Möglichkeit gesucht *p*-Hydroxyacetophenon (**54**) gezielt zu bromieren. Um mögliche Nebenreaktionen zu vermeiden wurde zunächst nach einer basen- und säurestabilen Schutzgruppe für Hydroxy-Verbindungen gesucht. Die Wahl fiel letztendlich auf die Benzyloxymethylacetal-Schutzgruppe (BOM-Schutzgruppe). Diese wird über nukleophile Substitution eingeführt und reduktiv wieder abgespalten.²²⁰⁻²²² Die Einführung der Schutzgruppe konnte mit DIPEA als Base mit Ausbeuten bis zu 80 % durchgeführt werden. Im Anschluss wurden verschiedene Bedingungen zur Bromierung getestet (Tabelle 13). Bei Bedingungen 1 – 3 konnte in der LC-MS nur eine Polybromierung und keine Bildung des gewünschten Produkts festgestellt werden. Wohingegen unter Bedingung 4 eine komplette Zersetzung der Startmaterialien zu beobachten war. Nur die milde Kupfer-katalysierte Reaktionsbedingung unter Punkt 5 lieferte die gewünschte Verbindung **56** in einer Ausbeute von 40 %. Die von KING *et al.* vorgestellten Reaktionsbedingungen stellten sich als so selektiv heraus, dass selbst das nicht-geschützte Hydroxid **54** mit einer Ausbeute von 76 % bromiert werden konnte.²²³

Tabelle 13 Übersicht der für die Bromierung von **55** getesteten Bedingungen.^a

Ansatz	Bromquelle	LM	Bedingungen	Ausbeute
1	Br ₂	Essigsäure	RT	Polybromierung
2	NBS	DCM	UV-Bestrahlung, RT, 1 h	Polybromierung
3	NBS	DCM	MW, 150 °C	-
4	Trimethylphenylammonium- tribromid	THF	RT	Polybromierung
5	CuBr ₂	EtOAc, CHCl ₃ ,	reflux, 2 h	40 %

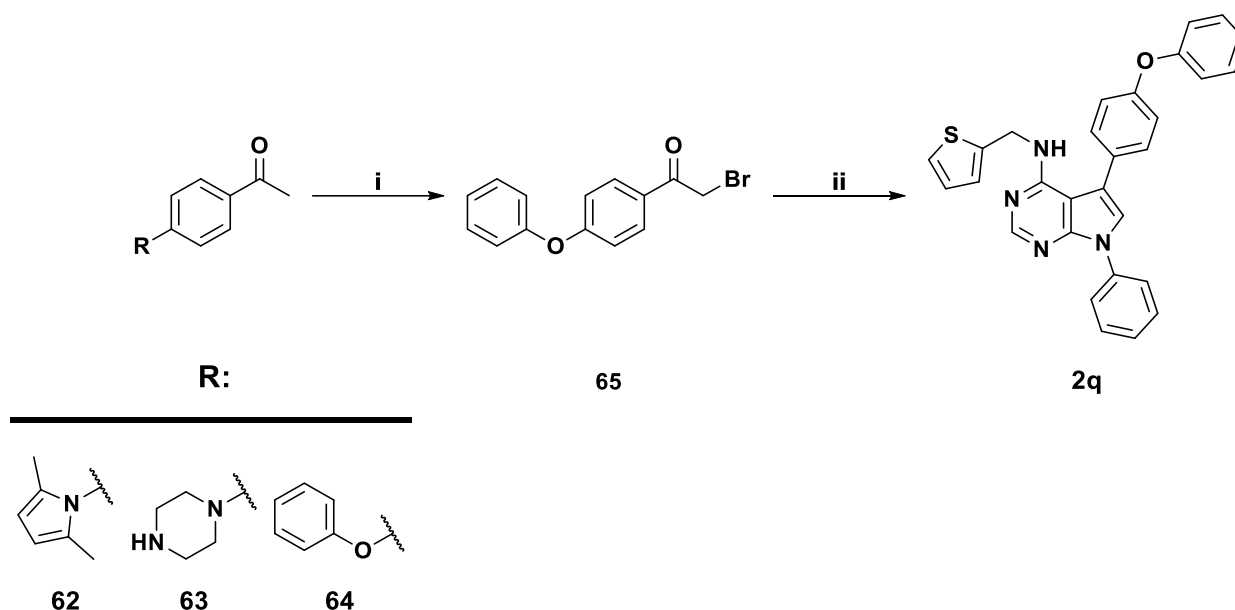
Anschließend wurde versucht die so bromierten Verbindungen **56** und **57** analog des in Schema 19 gezeigten Syntheschemas zu Verbindung **2o** umzusetzen. Bei ungeschützter und geschützter Hydroxygruppe konnte jedoch jeweils keine erfolgreiche Darstellung des Produkts beobachtet werden. Im Falle der ungeschützten Hydroxygruppe scheiterte die Synthese von **2o** am Pyrrolringschluss. Zwar konnte dieser mit einer Ausbeute von 6 % durchgeführt werden, jedoch zeigte sich schon hier dass die erhöhte Basizität von Verbindung **59** nicht kompatibel mit der etablierten Syntheseroute war. Der darauf folgende zweite Ringschluss konnte anschließend nicht erfolgreich durchgeführt werden. Durch die BOM-geschützte Hydroxygruppe von **56** wurde versucht dieses Problem zu umgehen. Es zeigte sich aber, dass auch hier erhebliche Probleme in den Ringschlussreaktionen auftraten.

Schema 19 Angedachte Syntheseroute des Hydroxysubstituierten Pyrrolopyrimidins **2p**.^a



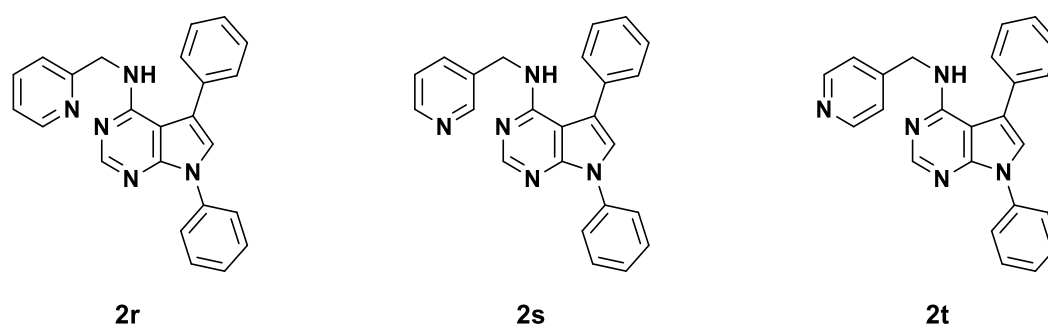
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Anilin, rt; (ii) Malonsäuredinitril (**31**), Na, EtOH, 55 °C.

Um den Einfluss von sterisch anspruchsvollen Substituenten genauer zu beleuchten wurde versucht verschiedene Acetophenone mit solchen Substituenten (**62 – 64**) analog den oben gezeigten Reaktionsbedingungen zu bromieren. Von den drei untersuchten Verbindungen konnte nur 1-(4-Phenoxyphenyl)ethan-1-on (**64**) erfolgreich bromiert werden. Die Bromierung zu **65** ermöglichte es über die vorgestellte Syntheseroute (Schema 16) Verbindung **2q** bei einer Gesamtausbeute von 2 % zu generieren. Anhand **2q** konnte demnach gezeigt werden, dass große Substituenten an 5-Position durchaus in der Syntheseroute toleriert werden, auch wenn im Hinblick auf Ausbeute und Diversität noch deutlich Optimierungsbedarf besteht.

Schema 20 Syntheseweg zur Darstellung des an 5-Position sterisch anspruchsvollen Derivats **2q**.^a

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) (Chloromethoxymethyl)benzol, DIPEA, TBAB, rt, 18 h; (ii) alle folgenden Reaktionsschritte analog Schema 16.

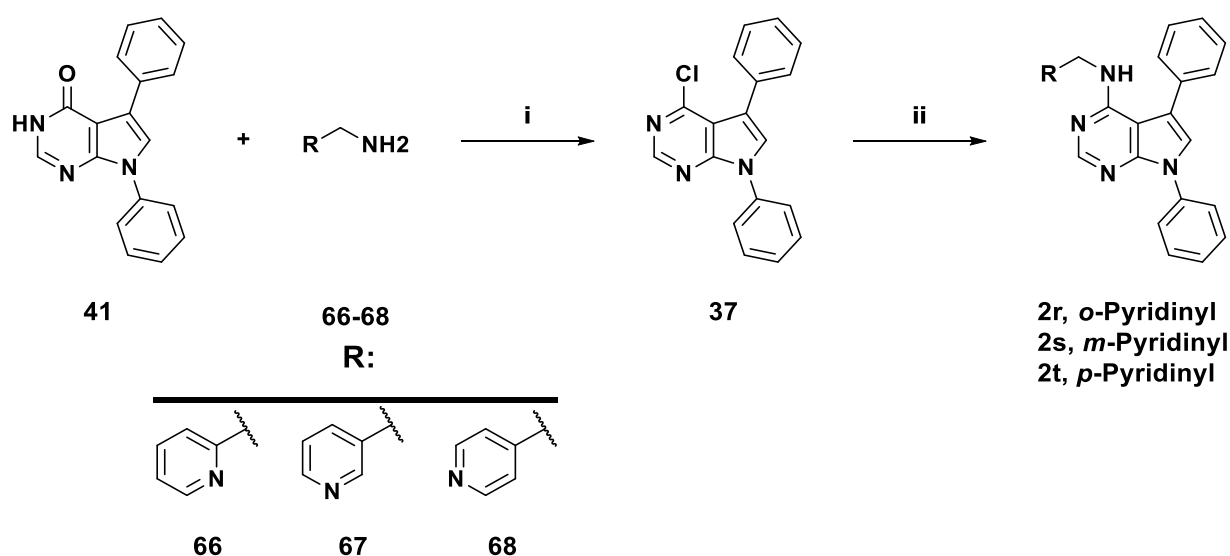
Die Synthese von Verbindungen die einen vergleichswisen hydrophilen Charakter besitzen (**2o**, **p**) konnte mit der etablierten Syntheseroute nicht realisiert werden, jedoch besteht ein deutlicher Bedarf solche Verbindungen zu generieren, da stark lipophile Verbindungen meist mit einer verminderten Löslichkeit und einem ungünstigen pharmakokinetischen Profil einhergehen. Die Derivatisierung der 4-Position, scheint in der vorliegenden Syntheseroute die erfolgsversprechende Möglichkeit darzustellen löslichkeitsvermittelnde Substituenten einzuführen. Zu diesem Zweck sollte ausgehend von Verbindung **41** durch die Einführung verschiedener Pyridinyl-Substituenten (**2r – u**) eine bessere Löslichkeit erzielt werden.

**Abbildung 43** Chemische Struktur der angestrebten Pyridinyl-Derivate **2r – t**.

Unter Anwendung der bereits vorgestellten direkten Aminierung (Schema 15) konnte jedoch keinerlei Produktbildung beobachtet werden. Es zeigte sich zum wiederholten Male, dass die direkte Aminierung von **41** eine wenig robuste und einsetzbare Methodik darstellt und ein alternativer Ansatz gesucht werden muss. Rückblickend wurde bereits versucht die Reaktivität des angreifenden

Nukleophils zu erhöhen. Dies konnte trotz mehrerer Versuche nicht bewerkstelligt werden. Angelehnt an eine Synthesevorschrift von BOARLAND *et al.* konnte jedoch eine Chlorierung des zyklischen Laktams erfolgen.²²⁴ Die Chlorierung mittels Phosphorylchlorid für eine Stunde lieferte das gewünschte Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-4-chlorid (**37**) bei einer Ausbeute von 88 % mit einem sehr sauberen Reaktionsverlauf. Chlor-Substituenten an 4-Position eines Pyrimidin-Grundgerüsts sind hochreaktiv gegenüber nukleophilen Substitutionen, weswegen die vorher in der direkten Aminierung verwendeten Pyridin-Derivate (**66** – **68**) verwendet wurden um die angestrebten Verbindungen **2r** – **t** zu generieren.²²⁵

Schema 21 Syntheseweg zur Darstellung Pyridinyl-derivatisierter Verbindungen **2r** – **t**.^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) PyBOP, DCM, rt, 15 min; (ii) R¹-NH₂ (**66** – **68**) DBU, rt, 18 h.

Die drei angestrebten Verbindungen (**2r** – **t**) konnten mit moderaten Ausbeuten zwischen 23 % – 28 % letztendlich generiert werden. Die somit etablierte Synthesekaskade zeigte vielversprechende Ergebnisse, vor allem im Hinblick auf die Derivatisierung mit verschiedensten Aminen.

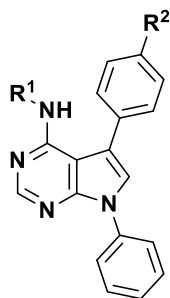
3.2.3 Biochemische Charakterisierung neuartiger Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin Akt-Inhibitoren

Die biochemische Charakterisierung der synthetisierten Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-Derivate erfolgte parallel über die Bestimmung des IC₅₀-Wertes durch den bereits in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen KinEASE HTRF-Assay sowie durch die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d mittels iFLiK (vgl. Abschnitt 3.2.1, Abbildung 41). Das von FANG *et al.* entwickelte Assaysystem detektiert hierbei die Änderung des Emissionsspektrums eines umgebungssensitiven Fluorophors während der Konformationsänderung von Akt von PH-*out* zur PH-*in* Konformation.¹¹⁶ Durch die Mutation aller Oberflächencysteine sowie der Punktmutation G49C in der PH-Domäne von Akt kann

PyMPO über eine Michael-Addition selektiv eingebracht werden. PyMPO unterliegt bei einem Wechsel von PH-*out* zu PH-*in* Konformation einer Änderung der mikrochemischen Umgebung was zu einer beobachtbaren Änderung des Emissionsmaximums (batochrome Verschiebung, Abbildung 41) führt.

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Als Kontrollen wurden die ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren GSK690963 und Ipatasertib sowie der allosterische Akt-Inhibitor MK-2206 verwendet. Wie erwartet zeigten hierbei die ATP-kompetitiven Inhibitoren keinerlei Aktivität bei der Messung des K_d -Wertes, wohingegen MK-2206 durch seine Bindung in der allosterischen Bindetasche einen Wert von ca. 160 nM aufweist. Wie bereits durch FANG *et al.* und WEISNER und GONTLA *et al.* gezeigt, eignet sich das iFLiK Assaysystem sehr gut um zwischen ATP-kompetitiven und allosterischen Interdomänen-Inhibitoren zu diskriminieren.¹¹⁶⁻¹¹⁷

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen zeigten (bis auf **2k**, **2l**, **2n**, **2q** und **2u**) die Fähigkeit Akt in Volllänge durch die Bindung in der allosterischen Bindungstasche zu adressieren. Im Vergleich zu MK-2206 ist jedoch eine mindestens 14-fach schwächere Affinität zu beobachten (**2a** vs. MK-2206, $K_d = 2.8$ vs. $0.2 \mu\text{M}$). Des Weiteren bleibt festzuhalten, dass eine sterisch anspruchsvolle Substitution an 5-Position (vgl. **2n**, **2q** und **2u** $K_d > 50 \mu\text{M}$) für die Bindung in der allosterischen Tasche nicht toleriert wird. Verbindungen **2a** und **2h** zeigen biochemisch sehr ähnliche Werte ($K_d = 2.8 \mu\text{M}$ vs. $3.7 \mu\text{M}$ sowie $\text{IC}_{50} = 3.2 \mu\text{M}$ vs. $3.9 \mu\text{M}$), was durch das hier angewendete Bioisosterie-Konzept den Erwartungen entsprach. Im Allgemeinen konnte durch die Synthese der verschiedenen Derivate keine Verbesserung der Ursprungsverbindung **2a** erreicht werden. Die Verlängerung der Substitution an 4- oder 5-Position führte in keinem Fall zu einer höheren Affinität oder Aktivität gegenüber Akt. Die Derivatisierung der Phenylgruppe an 6-Position war durch die ausgewählte Syntheseroute zudem nicht zugänglich. Ein weiteres Problem dieser Klasse an Inhibitoren, war die sehr geringe Löslichkeit in DMSO. Hierdurch wiesen alle Inhibitoren ein sehr geringes Assayfenster bei der Bestimmung des K_d -Wertes auf. Die designten Verbindungen **2r – t** mit erhöhter Hydrophilie zeigten jedoch auch keine nennenswerte Verbesserung in Affinität oder Aktivität. Interessanterweise, zeigten die verschiedenen Regioisomere aber eine unterschiedliche Aktivität. Während das *ortho*- (**2r**, $\text{IC}_{50} = 5.5 \mu\text{M}$) und *meta*-Pyridinyl (**2s**, $\text{IC}_{50} = 5.8 \mu\text{M}$) eine vergleichbare Aktivität wie **2a** ($\text{IC}_{50} = 3.2 \mu\text{M}$) aufweisen, besitzt das *para*-Pyridinyl (**2t**, $\text{IC}_{50} = 9.4 \mu\text{M}$) eine um den Faktor 3 geringere Aktivität.

Tabelle 14 Bestimmung der IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren und literaturbekannter Referenzverbindungen gegenüber Akt^{WT}.^a**2**

N°	R ¹	R ²	iFLiK	Akt ^{WT}
			Akt ^{E49C/C296S/C310S/C344S} K _d [μM]	IC ₅₀ [μM]
2a		H	2.8 ± 0.4	3.2 ± 0.4
2g	H	H	15 ± 9.6	20 ± 0.7
2h		H	3.7 ± 1.4	3.9 ± 0.2
2i		H	3.1 ± 0.8	>50
2j		H	4.3 ± 1.9	7.2 ± 1.6
2k		H	>50	>50
2l		Br	>50	38 ± 37
2m		Br	3.4 ± 1.3	9.3 ± 3.7
2n			>50	>50

2q			>50	>50
2r		H	6.5 ± 0.9	5.5 ± 1.7
2s		H	4.9 ± 2.1	5.8 ± 0.3
2t		H	4.9 ± 0.5	9.4 ± 0.8
2u		CF₃	>50	>50
GSK690963	-	-	>50	0.009 ± 0.003
Ipatasertib	-	-	>50	0.005 ± 0.0003
MK-2206	-	-	0.2 ± 0.02	0.009 ± 0.0003

^a Die ermittelten K_d - und IC_{50} -Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die hier gezeigten Werte wurden von M. Sc. Jörn Weisner bestimmt.

3.2.4 Naphthyridon-basierte Inhibitoren

Basierend auf Vorarbeiten von WEISNER und GONTLA *et al.* wurde eine Vielzahl von Derivaten synthetisiert, die ein tieferes Verständnis für die Struktur-Wirkungsbeziehung bei kovalent-allosterischen Inhibitoren generieren sollte.¹¹⁷ Die in diesem Arbeitskreis gelöste Kristallstruktur von **3a** in Akt zeigte deutlich die Ausbildung der kovalenten Bindung mit Cys296 und die Positionierung des Inhibitors in der Region zwischen Kinasedomäne und PH-Domäne (Abbildung 44).²²⁶ Auffallend ist, dass abseits der bereits literaturbekannten π - π -Wechselwirkung des 1,6-Naphthyridon-Grundgerüsts mit Trp80 wenige zusätzliche Wechselwirkungen existieren, welche **3a** in der Bindetasche stabilisieren.^{200,203,227} Der Phenylring an 3-Position des Naphthyridon-Grundgerüsts befindet sich in einer stark hydrophoben Umgebung aufgebaut durch Leu210, Leu264 und Ile290 und stabilisiert dadurch die Positionierung des Inhibitors in der Proteinbindetasche. Eine, für spätere Entwicklungen, interessante Orientierung ist die Ausrichtung des freien Amid-Stoffstoff der Imidazolone-Gruppe. Diese zeigt in eine hydrophile Substasche in der sich ein konserviertes Wassermolekül in 3.9 Å Entfernung befindet (Abbildung 44B).

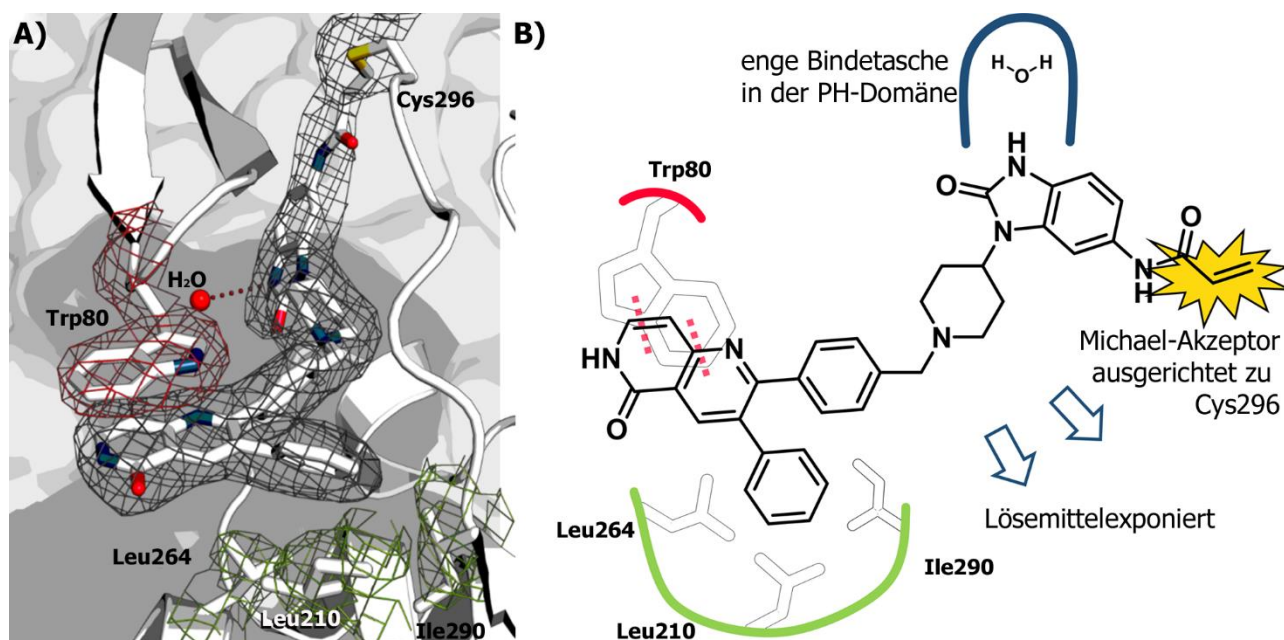
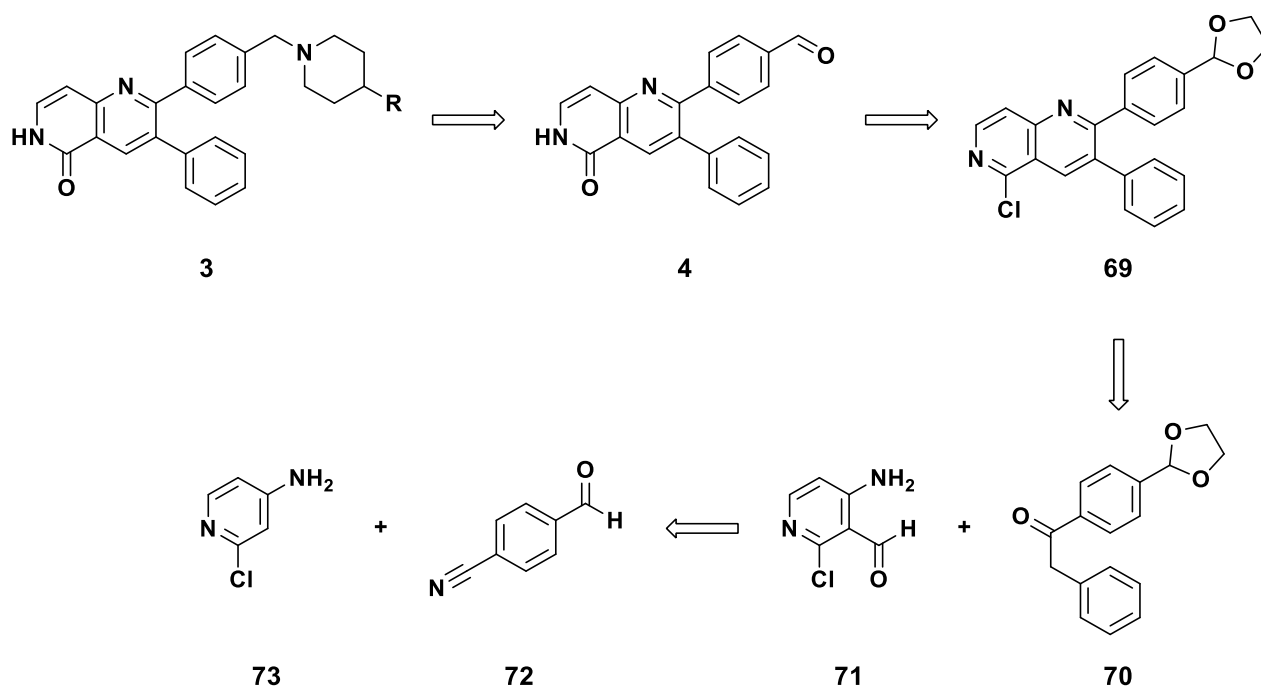


Abbildung 44A) unveröffentlichte Kristallstruktur von **3a** im Komplex mit Akt^{WT}. **B)** Schematische Darstellung der beobachteten Wechselwirkungen zwischen **3a** und Akt^{WT}.

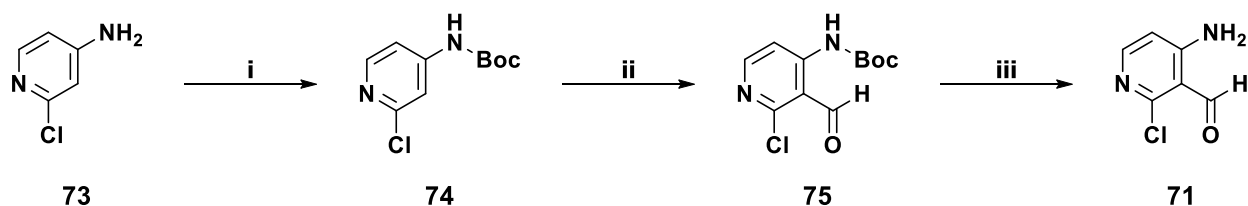
Die bereits durch FANG und WEISNER und GONTLA *et al.* etablierte Syntheseroute sollte im Hinblick auf erhöhte Ausbeute und einfachere Handhabung optimiert werden.^{117,205} Die Synthese von **3a** basiert auf einer mehrstufigen konvergenten Synthese. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden Moleküle dieser Klasse in einen westlichen und östlichen Teil unterteilt (Abbildung 21). Die Synthese der beiden Molekülhälften sollte hierbei über eine reduktive Aminierung in einem der letzten Schritte erfolgen. Das 1,6-Naphthyridon (**4**) wird hierbei über das weniger reaktive Chloro-Naphthyridin (**69**) dargestellt, wobei der terminale Aldehyd durch eine Acetalgruppe maskiert ist. Um das bityklische Strukturmotiv aufzubauen wurde eine FRIEDLÄNDER-Chinolin-Synthese²²⁸⁻²²⁹ herangezogen. FANG konnte zeigen, dass hier eine Basenkatalysierte Reaktionsführung zu den besten Ergebnissen führte.²⁰⁵ Die für die FRIEDLÄNDER-Chinolin-Synthese notwendigen Bausteine sind ein α -C-acides Keton **70** und ein *ortho*-formylierte Aminopyridine **71**. Diese werden in diesem Fall aus 4-Cyanbenzaldehyd (**72**) und 4-Amin-2-chlorpyridin (**73**) dargestellt.

Schema 22 Retrosynthetische Analyse der gewünschten Zielverbindung **3**.²⁰⁵



Ausgehend von 4-Amin-2-chlorpyridin (**73**) wurde **74** über DMAP und Triethylamin katalysierte Boc-Schützung in Dichlormethan gewonnen (Schema 23). **74** konnte nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur mit einer Ausbeute von 68 % erhalten werden.²⁰⁵ Anschließend wurde **74** mit *t*-BuLi bei -78 °C lithiiert und *in situ* elektrophil mit DMF gequentscht.²⁰⁵ **75** konnte mit Ausbeuten von bis zu 54 % erhalten werden. Die abschließende Boc-Entschützung zur Generierung der Aminkomponente **71** für die nachfolgende FRIEDLÄNDER-Chinolin-Synthese erfolgte mit 4 N HCl in 1,4-Dioxan in quantitativen Ausbeuten.²⁰⁵

Schema 23 Synthesekaskade zur Darstellung von 4-Amino-2-chloro-3-pyridincarboxaldehyd (**71**).^a

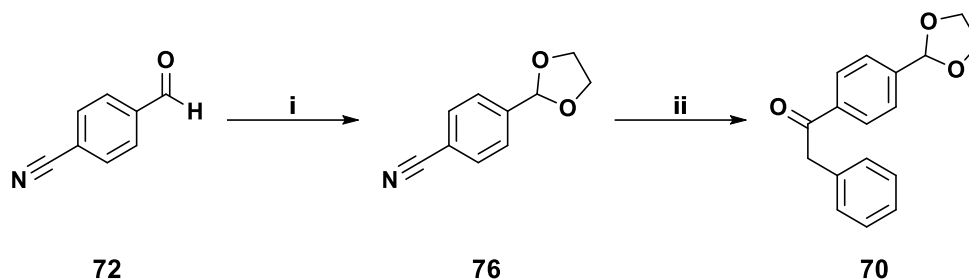


^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Di-*tert*-butyldicarbonat, DMAP, Et₃N, DCM, rt, 18 h, (ii) DMF, *t*-BuLi, THF, -78 °C, 4 h auf rt, 18 h; (iii) HCl in Dioxan (4 N), 0 °C auf rt, 18 h.

Die noch fehlende Keto-komponente **70** wurde in einer zweistufigen Synthese ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4-Cyanobenzaldehyd (**72**) durchgeführt. Zuerst wurde der Aldehyd säurekatalysiert mit Ethylenglykol als zyklisches Acetal (**76**) geschützt. Die Acetalschützung konnte unter Verwendung eines Wasserabscheiders (mit Toluol als Löse- und Schlepplmittel) mit einer

Ausbeute von 98 % durchgeführt werden.²⁰⁵ Abschließend wurde die Nitril-Gruppe über eine Grignard-Reaktion und *in situ* Hydrolyse in das gewünschte Keton **70** überführt.²⁰⁵

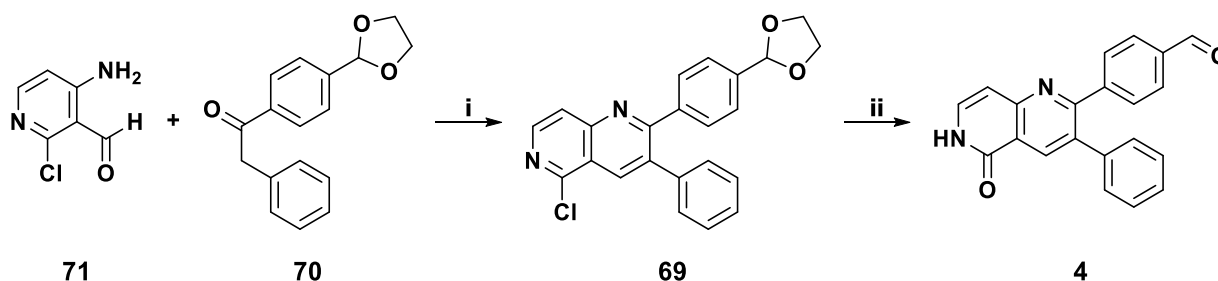
Schema 24 Zweistufige Synthese der α -C-aciden Ketospezies **70**.^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Ethylenglykol, Toluol, TsOH, 120 °C, 18 h; (ii) Benzylmagnesiumchlorid, THF, -4 °C, 1 h auf rt, 4 h.

Die FRIEDLÄNDER-Chinolin-Synthese wurde nun mit **70** und **71** mit NaO^tBu als Base in 1,4-Dioxan durchgeführt. **69** konnte hierbei jedoch nur mit einer eher moderaten Ausbeute von 16 % erhalten werden (Schema 25).^{117,205} Als letzter Schritt wurde die Freisetzung des Acetal-geschützten Ketons und die Hydrolyse des Chlor-Substituenten durch Erhitzen in wässriger 4 N HCl realisiert. Dieser Schritt lieferte **4** in quantitativer Ausbeute.^{117,205}

Schema 25 FRIEDLÄNDER-Chinolin-Synthese und anschließende saure Entschützung zu 4-(1-Oxo-7-phenyl-1,2-dihydroisochinolin-6-yl)benzaldehyd (**4**).^a

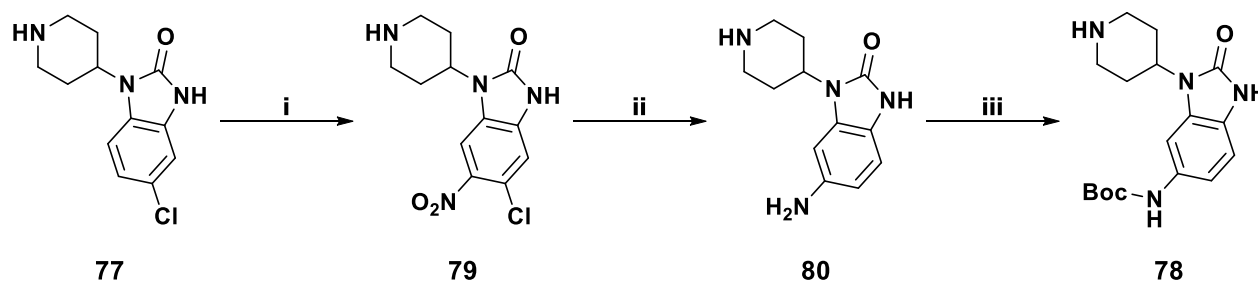


^a Reagenzien und Bedingungen: (i) NaO^tBu, Dioxan, rt, 3 h; (ii) HCl (35 %), 90 °C, 3 h.

Die Synthese des östlichen Teils von **3a** startet vom kommerziell erhältlichen 5-Chlor-1-(4-piperidyl)-2-benzimidazolinon (**77**) und kann nach dreistufiger Synthese als sekundäres Amin (**78**) in der reduktiven Aminierung eingesetzt werden (Schema 26).¹¹⁷ WEISNER und GONTLA *et al.* nutzten die *ortho*-dirigierende Wirkung des Chlors in **77** um Verbindung **79** mit Hilfe von 70 %iger Salpetersäure in 1,2-Dichlorbenzol (60 °C für 2 Stunden) mit einer Ausbeute von 64 % zu synthetisieren. Die anschließende Reduktion und Dehalogenierung konnte erfolgreich mit 10 % Palladium auf Kohle und Ammoniumformiat als Wasserstoffdonor durchgeführt werden.¹¹⁷ Verbindung **80** besitzt nun ein anillinisches primäres Amin und ein aliphatisch sekundäres Amin. Um eine selektive reduktive Aminierung zu gewährleisten wurde das anillinische Amin selektiv mit *tert*-

Butyloxycarbonyl geschützt. Auf Grund der stark unterschiedlichen pK_a -Werte (Anilin-NH₂: ~ 5 ; Piperidin-NH: ~ 10)²³⁰ konnte dies mit sehr guten Ausbeuten von 79 % unter Verwendung von 10 % Essigsäure in 1,4-Dioxan bei Raumtemperatur erreicht werden.¹¹⁷

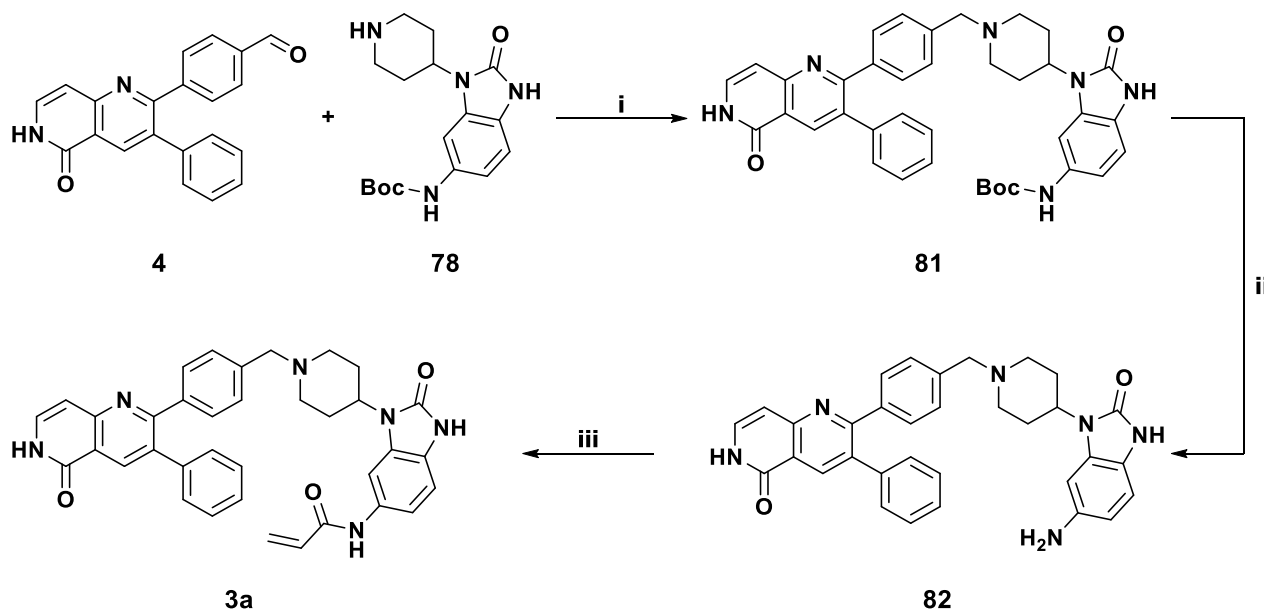
Schema 26 Synthesekaskade zur Darstellungen des östlichen Vorläufermoleküls *tert*-Butyl-(2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)carbammat (**78**).^a



^aReagenzien und Bedingungen: (i) HNO₃, Dichlorbenzol, 60 °C, 1 h; (ii) Ammoniumformiat, Pd/C, MeOH, 80 °C, 18 h; (iii) Di-*tert*-butyldicarbonat, Essigsäure, Dioxan, rt, 18 h.

Die anschließende Syntheseabfolge aus reduktiver Aminierung mit NaBH(OAc)₃ als Reagenz, Entschützung des anilinschen Amins und Reaktion mit Acrylylchlorid (**21**) wurde von WEISNER und GONTLA *et al.* mit einer Gesamtausbeute von 20 % über drei Syntheseschritte berichtet.¹¹⁷

Schema 27 Syntheseabfolge zur Darstellung von Inhibitor **3a**, nach WEISNER und GONTLA *et al.*^a



^aReagenzien und Bedingungen: (i) NaBH(OAc)₃, Et₃N, Essigsäure, MeOH, rt, 18 h; (ii) HCl in Dioxan (4 N), MeOH, rt, 12 h; (iii) **21**, DIPEA, DCM, 0 °C, 30 min.

Bei der Optimierung des Syntheseweges wurde besonderer Wert darauf gelegt die kritischen Schritte, wie die FRIEDLÄNDER-Chinolin-Synthese und die reduktive Aminierung zu verbessern. Im Zuge einer Evaluierung der einzelnen Syntheseschritte zeigte sich, dass Probleme in der Handhabung

(vor allem Lagerstabilität und Degradation) von Verbindung **71** und damit zusammenhängend niedrige Ausbeuten bei der FRIEDLÄNDER-Chinolin-Synthese vorliegen. Durch die Entschützung zum freien Amin in **71** kommt es zu einer deutlichen Veränderung der Lagerstabilität, ist das geschützte Amin **75** noch problemlos für mehrere Monate nutzbar, zeigte sich beim freien Amin **71** nach einigen Tagen leichte Veränderungen in der Farbe und geringere Ausbeuten bei der nachfolgenden Ringschlussreaktion. Der sequentielle Wechsel von sauren Bedingungen zur Entschützung und anschließende stark basische Verbindungen in der Ringschlussreaktion führten dazu, dass der pH-Wert dauerhaft angepasst werden musste. Durch mehrmaliges Waschen mit Wasser und anschließendes Trocknen im Hochvakuum sollte gewährleistet werden, dass keinerlei Rückstände von Säure oder Base in den verschiedenen Stufen zurückbleiben. Durch diese intensive Aufarbeitung kam es jedoch zu Ausbeuteverlusten, sowie zu einer zeitraubenden Synthesekaskade. Dementsprechend wurde nach Möglichkeiten gesucht, die pH-Bedingungen beider Reaktionen anzugleichen. FANG konnte zeigen, dass eine durch Essigsäure katalysierte Ringschlussreaktion nur zu einer Entschützung an **70** führte. Auch der Wechsel der Säure zu TsOH führte nicht zur gewünschten 1,6-Naphthyridon Formierung.²⁰⁵

Die Boc-Schutzgruppe ist eine der am häufigsten verwendeten Amin-Schutzgruppen. Diese Schutzgruppe zeichnet sich durch eine hohe Hydrolyse-stabilität in basischen Bedingungen und gegen andere Nukleophile aus. Eine Abspaltung erfolgt jedoch relativ leicht unter sauren Bedingungen mit sehr guten bis quantitativen Ausbeuten.²³⁰⁻²³¹ Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Entschützung unter basischen Bedingungen bei stark aktivierten Aminen und eine thermische Entschützung in speziellen Fällen möglich ist.²³²⁻²³⁴ TOM *et al.* beschrieben, dass primäre Amine mittels Natrium-*tert*-butanolat in nassem THF entschützt werden können.²³⁴ Sie postulierten, dass diese Entschützung nach Abstraktion des Amin Protons durch die ^tBuO⁻-Gruppe über eine Umlagerung zum Isocyanat und anschließende Decarboxylierung stattfindet (Abbildung 45).²³⁴

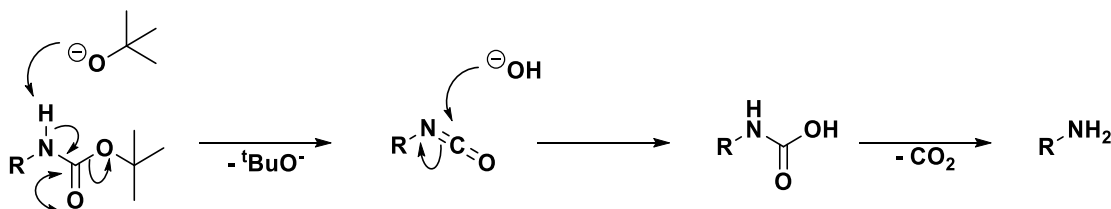
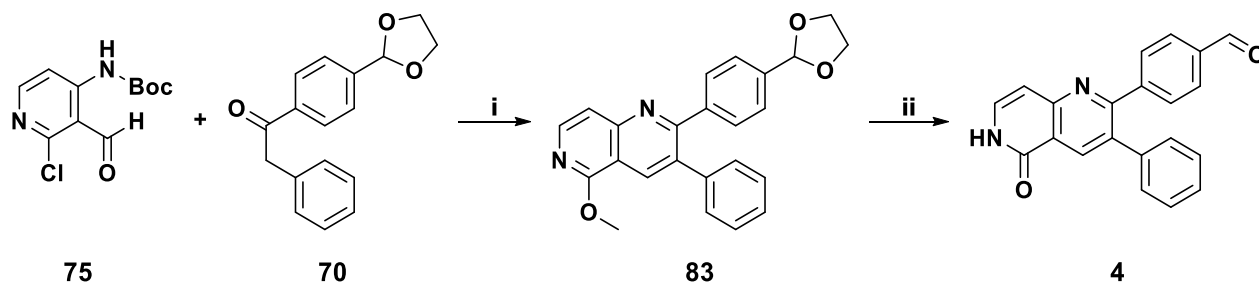


Abbildung 45 Von TOM *et al.* postulierter Reaktionsmechanismus zur basischen Entschützung Boc-geschützter primärer Amine mittels NaO^tBu.²³⁴

Dies wurde genutzt um die Synthese von 1,6-Naphthyridon **4** über eine Natriummethanolat katalysierte FRIEDLÄNDER-Chinolin Synthese aus **70** und **75** durchzuführen.²³⁵ Auch hierbei müsste die Entschützung des primärenamins von **75** über die von TOM *et al.* postulierte Isocyanat-Zwischenstufe verlaufen (Abbildung 45).²³⁴⁻²³⁵ Das so entstehende 5-Methoxy-1,6-naphthyridin **83**

konnte über eine Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure nach 3 h bei 90 °C in gewünschte Produkt **4**, mit Ausbeuten bis zu 74 %, umgewandelt werden.

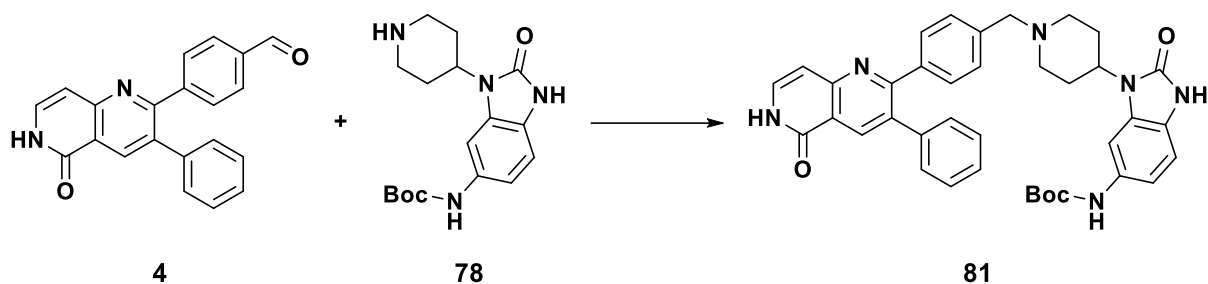
Schema 28 Synthese von **4** über die durch NaOMe dargestellte Zwischenstufe **83**.^a



^aReagenzien und Bedingungen: (i) NaOMe, MeOH, 65 °C, 4 h; (ii) HCl (35 %), 90 °C, 3 h.

Durch die erhebliche Zeitersparnis von über 40 h wurde im weiteren Verlauf der Arbeit bevorzugt die Reaktionsführung über das 5-Methoxy-1,6-naphthyridin **83** gewählt. Zudem konnten auf dieser Route deutlich höhere Ausbeuten generiert werden im Vergleich mit der Route über die vorherige Boc-Entschützung (40 % über zwei Stufen verglichen mit 22 % über drei Stufen).

Neben der Optimierung der FRIEDLÄNDER-Chinolin Synthese wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht die mäßigen Ausbeuten der reduktiven Aminierung zu verbessern. Hierfür wurde eine Variation verschiedener Bedingungen in Zusammenarbeit mit M.Sc. Niklas Uhlenbrock getestet (Tabelle 15).

Tabelle 15 Übersicht der für die Optimierung der reduktiven Aminierung zu **81** genutzten Reaktionsbedingungen.

Ansatz	Reduktionsmittel	Additive	Lösemittel	Bedingungen	Ausbeute
1	NaCNBH ₃	Triethylamin, Essigsäure	MeOH	1. 4 h, 75 °C 2. 15 h	33 %
2	NaCNBH ₃	Triethylamin, Essigsäure	DMF	1. 18 h, 100 °C 2. 15 h	54 %
3	NaCNBH ₃	Essigsäure	DME:EtOH (3:1, v/v)	1. 2 h, MW 2. 2 h, MW	-
4	NaBHOAc ₃	Essigsäure	THF	1. 1 h, rt 2. 12 h, rt	-
5	NaBHOAc ₃	Essigsäure	DCE:EtOH (3:1, v/v)	1. 1 h, rt 2. 12 h, rt	-
6	NaBHOAc ₃	Essigsäure, Molekularsieb 4 Å	MeOH	1. 1 h, 60 °C 2. 12 h, rt	-
7	NaBHOAc ₃	Triethylamin, Essigsäure	MeOH	1. 4 h, 75 °C 2. 15 h	-
8	Orthoameisen- säuretriethylester	Ameisensäure	Acetonitril	12 h, 80 °C	27 %
9	Ameisensäure	-	Acetonitril	12 h, 80 °C	54 %

^a Experimente durchgeführt in Zusammenarbeit mit M.Sc. Niklas Uhlenbrock.

Es zeigte sich, dass die klassischen LEUCKART-WALLACH-Bedingungen²³⁶⁻²³⁸ die besten Ergebnisse lieferten (Ansatz 9, Tabelle 15). Zwar konnten keine gravierenden Erhöhungen der Ausbeute erzielt werden, jedoch verlief die Reaktion unter den hier präsentierten Bedingungen deutlich sauberer ab, was die säulenchromatographische Aufreinigung erheblich erleichterte, da die jeweiligen nicht abreagierten Edukte vollständig wiedergewonnen werden konnten. FREDERICK *et al.* zeigten, dass bei einer reduktiven Aminierung die Reduktion zum Alkohol vor Formung des Imins zu immensen Ausbeuteverlusten führen kann.²³⁹ Bei der LEUCKART-WALLACH-Reaktion wird Ameisensäure als Reduktionsmittel verwendet, dadurch sollte die Bildung von evtl. störenden Alkoholen umgangen werden können.²⁴⁰ Durch die Nutzung von Mikrowellenbestrahlung als Energiezufuhr konnte die Reaktionszeit im weiteren Verlauf der Arbeit von 12 h auf 30 min (bei 120 °C und ca. 80 W) bei gleichbleibenden Ausbeuten gesenkt werden.

Nach erfolgreicher Optimierung der kritischen Reaktionsschritte konnte die Synthese von Derivaten ins Auge gefasst werden welche tieferen Einblick in die Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Wirkstoffklasse erlauben. Die von WEISNER und GONTLA synthetisierten Derivate **3a** und **3b** sowie die erfolgreiche Lösung der jeweiligen Komplexstruktur in Akt durch SCHEINPFLUG dienten hierbei als Startpunkt für weitere Entwicklungen.^{117,226}

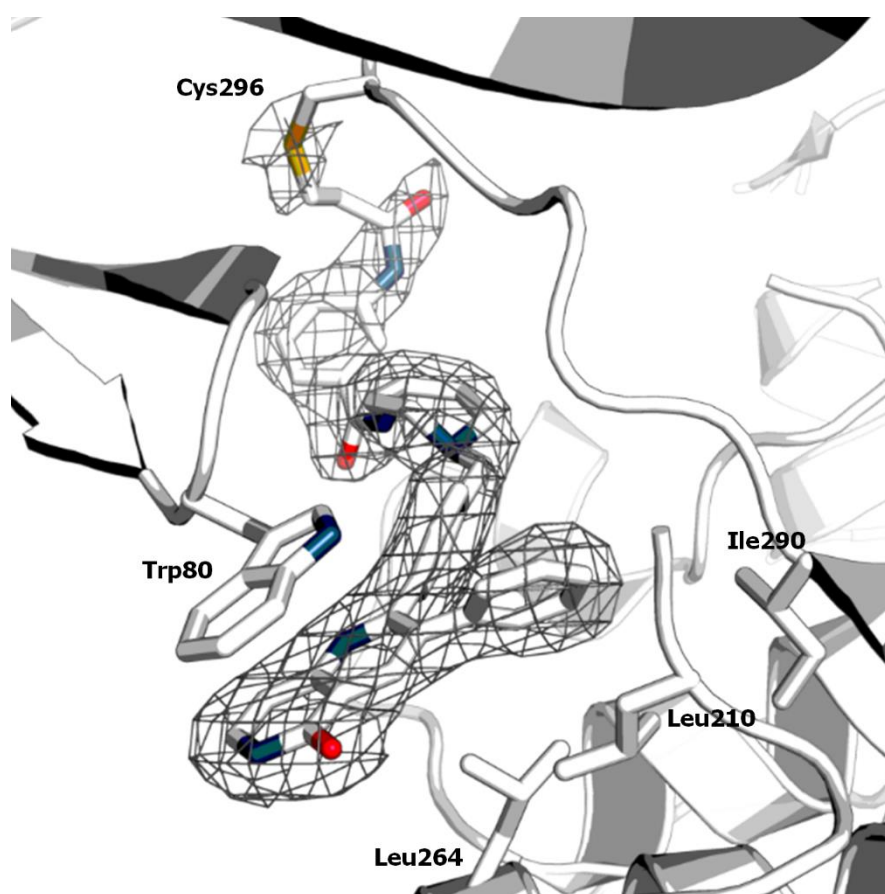
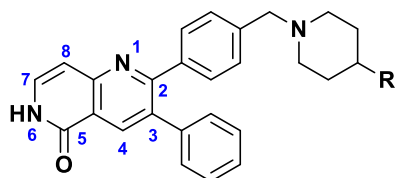


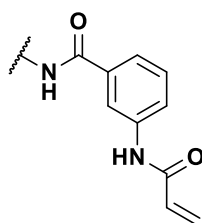
Abbildung 46 Unveröffentlichte Kristallstruktur von **3b** im Komplex mit Akt^{WT}.

Wie bereits besprochen, konnten in den Kristallstrukturen von **3a** und **3b** im Komplex mit Akt^{WT} wenige zusätzliche Wechselwirkungen und adressierbare Aminosäureseitenketten identifiziert werden, welche eine Erhöhung der Affinität der Inhibitoren in die Bindetasche zur Folge hätten (Abbildung 44A, Abbildung 46). Bei der Betrachtung der Kristallstruktur lässt sich spekulieren, dass die globale Struktur der Inhibitoren eine übergeordnete Rolle bei der Affinität zu Akt^{WT} spielt. Um zu untersuchen welchen Einfluss die Positionierung des Michael-Aktzeptors auf die Aktivität und Reaktivität der Inhibitoren ausübt, sollten die beiden korrespondierenden Konsstitutionsisomere zu **3b** synthetisiert werden (**3c – d**; Abbildung 47). Zusätzlich sollte ein Derivat synthetisiert werden, welches in *meta*-Position zum Michael-Akzeptor ein Fluor-Atom besitzt (**3e**). Das Konzept der Bioisosterie besagt, dass Moleküle mit einer ähnlichen Raumauffüllung und Elektronenverteilung auch eine vergleichbare Wirkung auf biologische Systeme haben werden.²⁴¹ In der Arzneimittelforschung gibt es eine Vielzahl von bekannten Bioisosteren welche auch in verschiedensten Medikamenten zugelassen sind.²⁴²⁻²⁴³ Um dieses Konzept auf die hier gezeigten Strukturen zu übertragen sollte versucht werden die in **3b** vorhandene Benzolstruktur durch das bioisostere Thiophen unter Erhaltung der räumlichen Ausrichtung des Michael-Akzeptors zu ersetzen (**3f**). Durch seine sehr geringe Größe bei maximaler Elektronegativität konnten bei der Einführung von Fluor bei einer Vielzahl von Inhibitoren positiven Auswirkungen beobachtet werden.²⁴⁴⁻²⁴⁵ Abschließend sollte geklärt werden welche Auswirkungen die Erhöhung der Rotationsflexibilität durch Ersetzen der Amid- durch eine Amin-Verbrückung hat (**3g**).

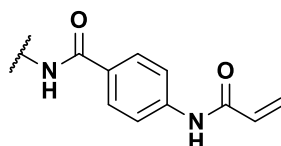


3

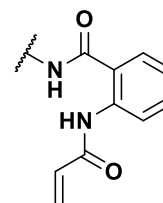
R:



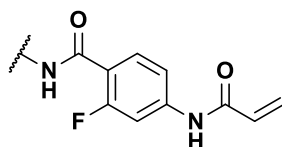
b



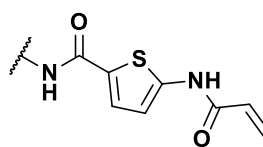
c



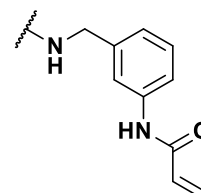
d



e



f

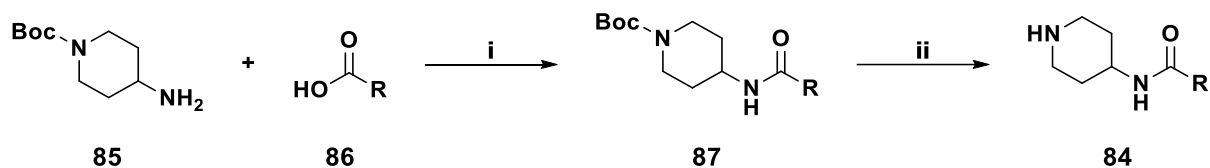


g

Abbildung 47 Dem rationalen Design zugrunde liegendes Grundgerüst **3** und die einzuführenden Substituenten zur kovalenten Inhibition von Akt.

Für die Synthese des östlichen Vorläufermoleküls **84** wurde *N*-Boc-4-Aminopiperidin (**85**) mit den verschiedenen Nitrobenzoesäurederivaten **86b – e** und 5-Nitrothiophen-2-carbonsäure (**86f**) in einer HATU vermittelten Amidkupplung mit Lutidin als Base zur Reaktion gebracht (Tabelle 16). Die entstanden Amide **87b – f** konnten alle unter Wasserzugabe ausgefällt werden. Nach Trocknung konnten Amide **87b – f** mit Ausbeuten zwischen 53 – 99 % erhalten werden. Um die für die LEUKART-WALLACH-Reaktion nötigen sekundären Amine zu erzeugen wurde anschließend die Boc-Schutzgruppe durch saure Hydrolyse bei 0 °C über Nacht entfernt. Nach Neutralisation und Trocknung im Hochvakuum konnten die aufgereinigten sekundären Amine **84b – f** mit Ausbeuten zwischen 67 – 99 % isoliert werden.

Tabelle 16 Übersicht des Synthesewegs zur Generierung der freien sekundären Amine **84** für die anschließende LEUKART-WALLACH-Reaktion.^a



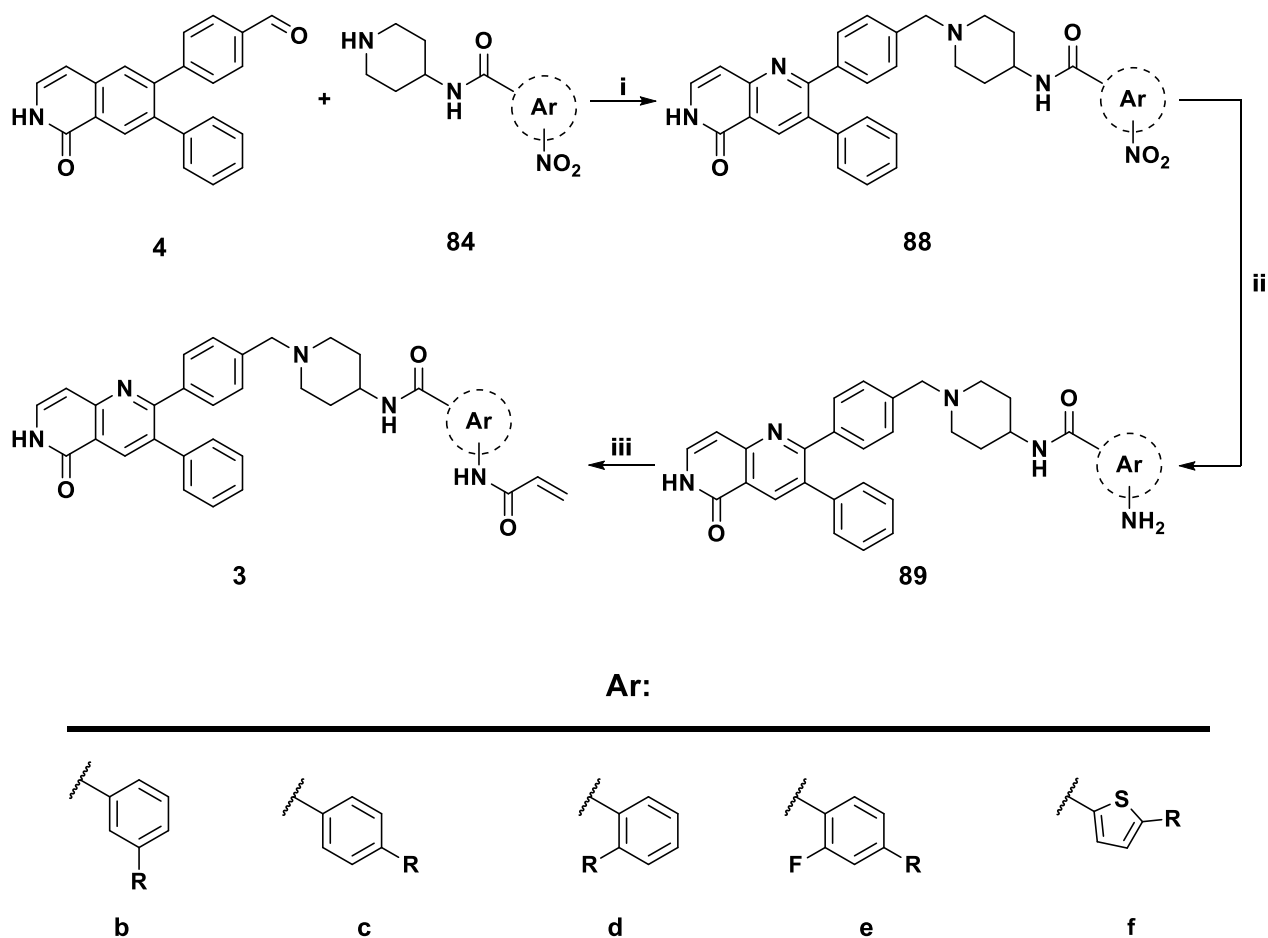
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) HATU, 2,6-Lutidin, DMF, rt, 18 h; (ii) HCl in Dioxan (4 N), rt, 18 h.

N°	R	Gesamtausbeute
84b		72 %
84c		60 %
84d		57 %
84e		55 %
84f		66 %

Anschließend wurden die aus Tabelle 15 bekannten Reaktionsbedingungen für die LEUKART-WALLACH-Reaktion auf die Ausgangsverbindungen **84b – f** und **4** angewendet um die Kupplungsprodukte **88b – f** zu erhalten. Nach Flash Chromatographie konnten Ausbeuten zwischen 15 und 52 % unter Regeneration der jeweiligen Startmaterialien gewonnen werden.

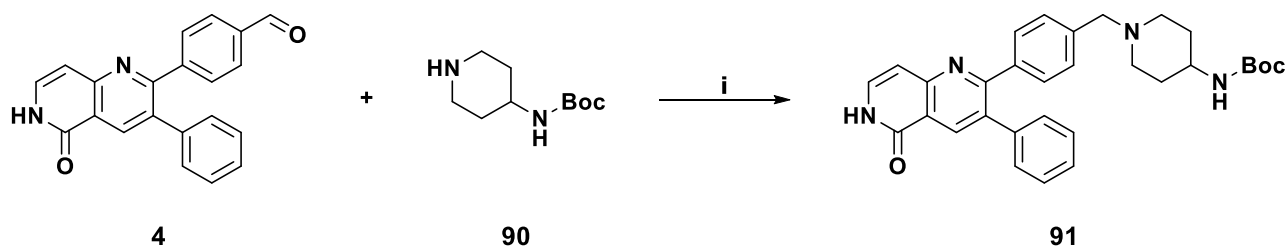
Wie von WEISNER und GONTLA beschrieben, sollte nun die Nitrogruppe mit Eisen-Pulver und Ammoniumchlorid als Wasserstoffdonor, zum anilischen Amin reduziert werden (Schema 29).¹¹⁷ Nach Lösen in einem Gemisch von THF, Methanol und Wasser (1:4:1) wurden die Nitroverbindung **88b – f** mit Eisen-Pulver und Ammoniumchlorid versetzt und für 45 min bei 75 °C gerührt.

Anschließend wurde die Reaktionsmischung durch Celite gefiltert und der Filterkuchen mehrmals mit Methanol gewaschen. Im Hinblick auf die geringe Löslichkeit von Ammoniumchlorid in Methanol ($\sim 3.3\%$, w/w²⁴⁶⁻²⁴⁷) wurden lediglich minimale Verunreinigungen im Filtrat erwartet. Die anschließende Evaporation der flüchtigen organischen Bestandteile resultierte in einer wässrigen Suspension, welche nach basischer Extraktion das erhoffte Produkt als Feststoff lieferte. Es konnte beobachtet werden, dass in allen Versuchen eine Ausbeute von über 100 % erzielt wurden. Eine genauere Untersuchung des Produkts zeigte, dass wider Erwarten eine nicht unerhebliche Menge von Ammoniumchlorid im Endprodukt verblieb. Trotz mehrerer Versuche die Art der Schichtung in der Filtration zu verbessern konnte das Ammoniumchlorid nicht erfolgreich abgetrennt werden. Es wurde demnach in der Literatur nach Verfahren gesucht, welche ohne Ammoniumchlorid oder Wasser eine Reduktion von der Nitrogruppe zum Amin gewährleisten können. GAMBLE *et al.* konnten zeigen, dass die Reduktion von Nitroverbindungen zu den korrespondierenden Aminen unter Einwirkung von Ultraschall selbst in Anwesenheit anderer reduktionssensitiver Gruppen mit sehr guten Ausbeuten und ohne große Aufreinigung möglich ist.²⁴⁸ In einer Testreaktion wurde **88b** in dem in der Literatur beschriebenen Lösemittelgemisch bestehend aus Essigsäure, Ethanol und Wasser (2:2:1, v/v) gelöst und für 2.5 h bei 30 °C im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde durch eine Schicht Celite filtriert und der Filterkuchen intensiv mit Methanol gewaschen. Die flüchtigen Lösemittel wurden im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand basisch aufgearbeitet. Nach erneuter Trocknung im Vakuum konnte das freie Amin **89b** mit einer Ausbeute von knapp 80 % erhalten werden. Die somit neu etablierte Methode zur Reduktion wurde ebenso in größeren Maßstäben für die Nitroverbindungen (**88b**, **c**) angewendet um die korrespondierenden Amine mit Ausbeuten zwischen 67 und 77 % zu isolieren. Anschließend wurden die verschiedenen anillinischen Amine **89b – f** unter Verwendung von Acryloylchlorid (**21**) zum entsprechenden Acrylamid umgesetzt (Schema 29). Um vermeintliche Nebenreaktionen zu umgehen wurde das Säurechlorid (**21**) in wasserfreiem THF vorverdünnt (1000-fach) und tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C₄ sowie C₁₈) konnten Ausbeuten zwischen 10 und 30 % erhalten werden.

Schema 29 Syntheschema zur Darstellung der kovalent allosterischen Akt-Inhibitoren **3b – f**.^a

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Ameisensäure, ACN, 60 °C, 18 h, (ii) Fe, Essigsäure/EtOH/H₂O (2:2:1, v/v), 30 °C, 2 h, Ultraschall oder Fe, NH₄Cl, MeOH/THF/H₂O (4:1:1, v/v), 70 °C, 45 min; (iii) **21**, DIPEA, THF, rt, 18 h.

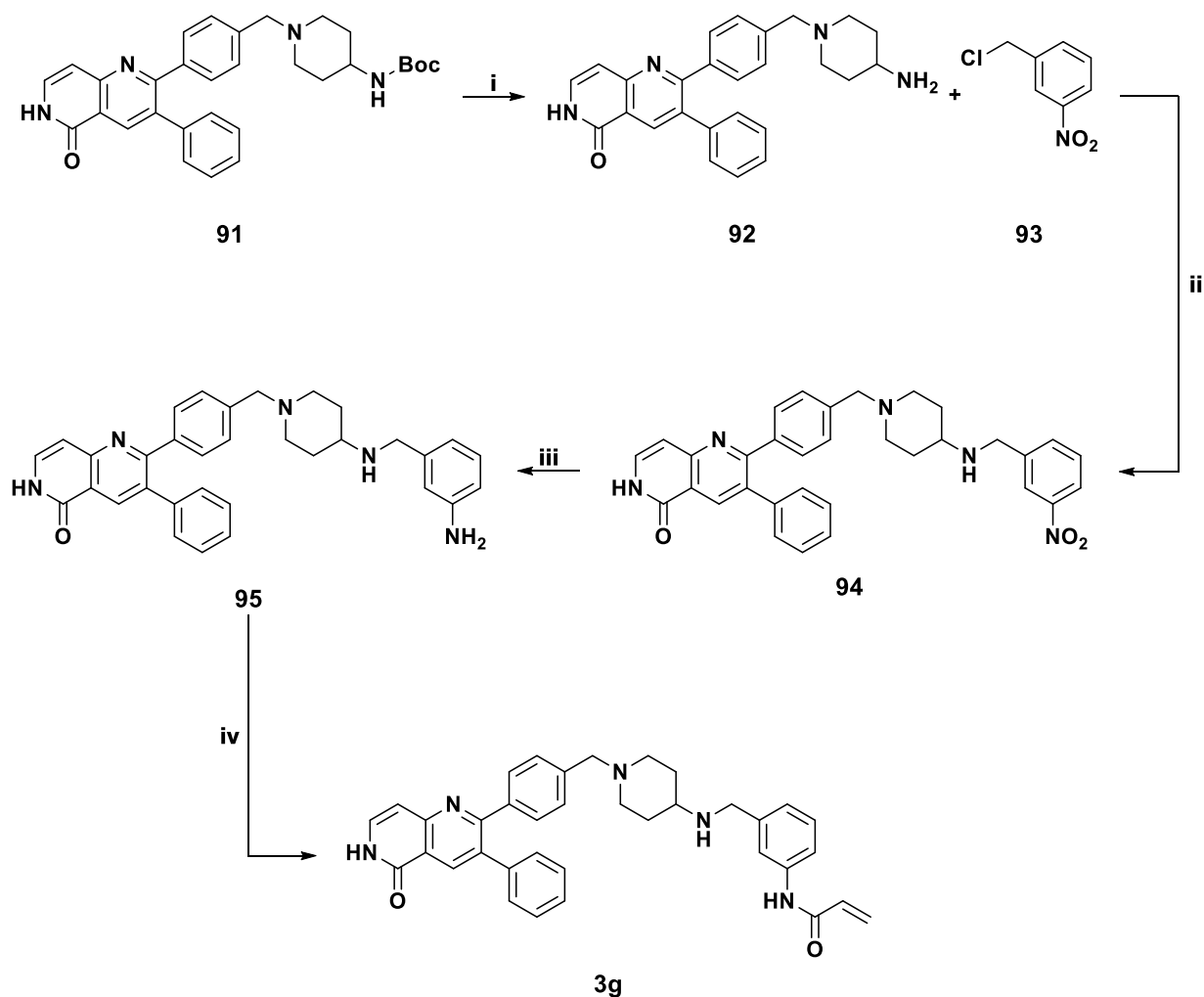
Für die Untersuchung der Auswirkungen einer fehlenden Amidverbrückung in **3b** war eine Umstellung der Syntheseroute notwendig. Hierfür wurde zunächst eine LEUCKART-WALLACH-Reaktion mit **4** und 4-*N*-Boc-Aminopiperidin (**90**) durchgeführt. Das so generierte *tert*-Butyl-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)carbamat (**91**) konnte mit einer Ausbeute von 30 % erhalten werden.

Schema 30 Reduktive Aminierung zur Darstellung von **91**.^a

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Ameisensäure, ACN, 60 °C, 18 h.

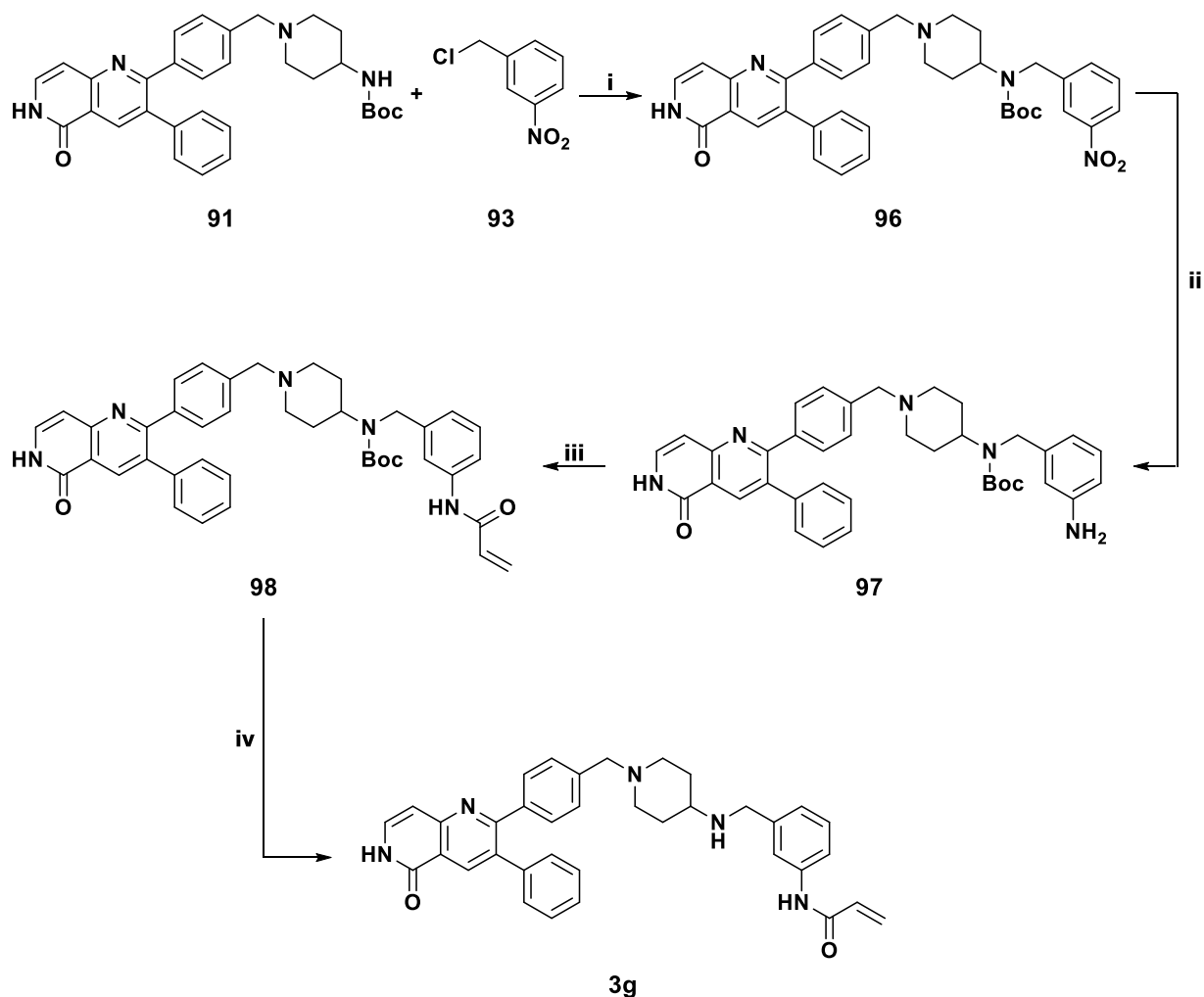
Von **91** ausgehend wurden zwei unterschiedliche Synthesewege zur gewünschten Endverbindung **3g** getestet. In Syntheseweg A (siehe Schema 31) sollte zu Beginn die Boc-Entschützung von **91** zu einem aliphatischen primären Amin (**92**) führen, welches durch basenvermittelte nukleophile Substitution mit *m*-Nitrobenzylchlorid (**93**) zu Verbindung **94** führen sollte. Anschließende Reduktion der Nitrogruppe zu **95** und Amidverknüpfung mit Acrylylchlorid (**21**) führen zu **3g**.

Schema 31 Syntheseweg A zur Darstellung von **3g**.^a



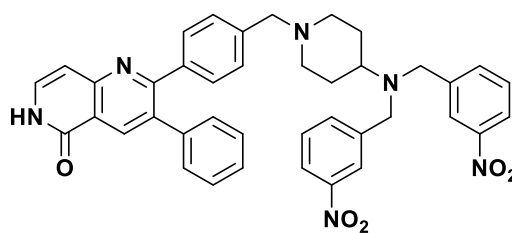
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) HCl in Dioxan (4 N), rt, 18 h; (ii) DIPEA, DMF, 85 °C, 18 h; (iii) Fe, Essigsäure/EtOH/H₂O (2:2:1, v/v), 30 °C, 2 h, Ultraschall; (iv) **21**, DIPEA, THF, rt, 18 h.

In Syntheseweg B sollte untersucht werden ob eine spätere Boc-Entschützung Vorteile in Bezug auf die Selektivität und Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte hin zu Verbindung **3g** bringen könnte (Schema 32). Hierzu wurde die nukleophile Substitution an **91** mit Chlorid **93** durchgeführt, um anschließend die Nitrogruppe von **96** zum anillinischen Amin **97** zu reduzieren. Durch Amidverknüpfung mit Acrylylchlorid (**21**) zu **98** und abschließende Boc-Entschützung sollte wieder das gewünschte Produkt **3g** erhalten werden.

Schema 32 Syntheseweg B zur Darstellung von **3g**.^a

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) DIPEA, DMF, 85 °C, 18 h; (ii) Fe, Essigsäure/EtOH/H₂O (2:2:1, v/v), 30 °C, 2 h, Ultraschall; (iii) **21**, DIPEA, THF, rt, 3 h; (iv) TFA in DCM (20 %), 0 °C auf rt, 1 h.

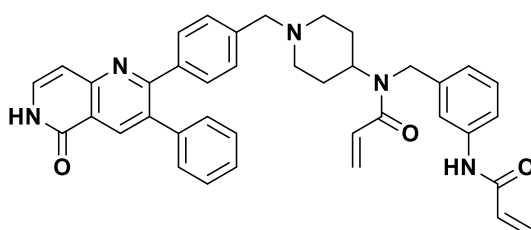
Wie in Schema 31 beschrieben wurde in Syntheseweg A zunächst **91** unter zu Hilfenahme von HCl in Dioxan Boc-entschützt. Nach 18 h Rühren bei rt konnte nach wässriger Aufarbeitung 2-(4-((4-Aminopiperidin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6*H*)-on (**92**) in einer Ausbeute von 65 % erhalten werden. Anschließend sollte eine nukleophile Substitution mit *m*-Nitrobenzylchlorid (**93**) durchgeführt werden. Eine Überprüfung des Reaktionsfortschritts durch LC-MS zeigte, dass ein vollständiger Umsatz des Startmaterials **92** erzielt werden konnte, jedoch konnten neben dem gewünschten Produkt **94** auch das durch doppelte Substitution zu erwartende Produkt **99** beobachtet werden.



99

Abbildung 48 Postulierte Struktur der durch doppelte Substitution von **92** mit **93** resultierenden Verbindung **99**.

Nach wässriger Aufarbeitung und Extraktion mit Essigsäureethylester wurde das Produktgemisch mittels Flash Chromatographie in seine Bestandteile getrennt. Nach erfolgreicher Abtrennung des doppelt substituierten Nebenprodukts **99** konnte **94** in einer Ausbeute von 30 % isoliert werden. Anschließend wurde die bereits etablierte Eisen-katalysierte Reduktion der Nitrogruppe zum Amin **95** durchgeführt (Schema 31). Das so erhaltene gelbliche Pulver konnte nach Trocknung im Hochvakuum mit einer Ausbeute von 72 % isoliert werden. Die abschließende Amidverknüpfung zum finalen Produkt **3g** wurde mit DIPEA in trockenem THF durchgeführt. Nach 3 h konnte durch LC-MS-Analyse kein Startmaterial mehr identifiziert werden, leider konnte auch das erhoffte Produkt **3g** nur in sehr geringen Mengen gefunden werden. Der im LC-MS-Spektrum vorwiegend gefundene Peak korrespondierte mit einer Masse von 624 g/mol dem zweifach mit Michael-Akzeptor-System versehenen Produkts **100** (Abbildung 49). Eine Trennung der beiden Produktspezies war aufgrund der sehr geringen Probemenge nicht möglich.



100

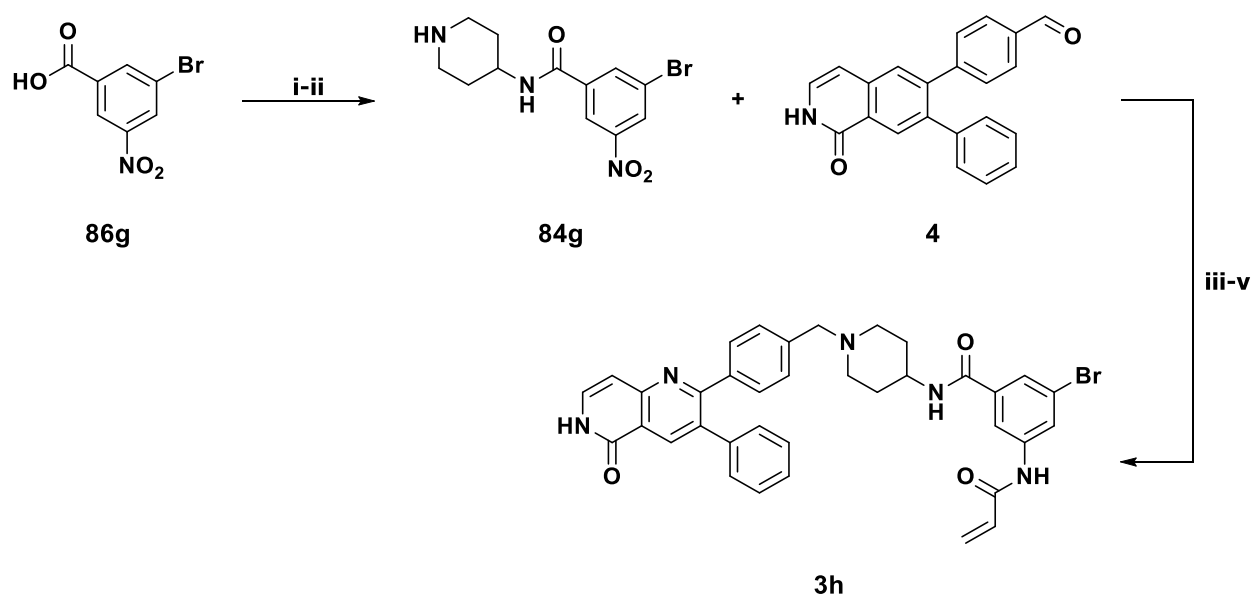
Abbildung 49 Struktur des unerwünschten Nebenprodukts im finalen Schritt der Synthese von **3g**.

Bei Syntheseroute B (Schema 32) wurde, ausgehend von **91**, die nukleophile Substitution wie bei Syntheseroute A durchgeführt. Jedoch konnte hier nach 24 h kein Umsatz des Startmaterials beobachtet werden. Auch bei Verdoppelung der Reaktionszeit konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass DIPEA mit einem pK_s -Wert von ~ 11 eine zu geringe Basenstärke aufweist um das Carbamat zu deprotonieren. Daraufhin wurde der Reaktionsmischung die stärkere Base Kalium-*tert*-butanolat (pK_s -Wert: 18) zugesetzt und die Reaktionsmischung für 72 h bei rt gerührt. Eine Analyse der Reaktionsmischung mittels Dünnschichtchromatographie zeigte eine unvollständig verlaufende Reaktion. Um einen kompletten Umsatz zu erzielen wurde die

Reaktion weitere 4 h bei 85 °C gerührt. Nach wässriger Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt **96** in einer Ausbeute von 31 % isoliert werden. Anschließend wurde die in Schema 32 beschriebene Reaktionskaskade angewendet. Nach Reduktion zum Amin und anschließender Amidverknüpfung mit Acrylylchlorid (**21**) wurde die Boc-Schutzgruppe sauer abgespalten. Um bei der Entschützung eine Hydrolyse des Michael-Akzeptors oder Addition von Chlor (bei Verwendung von HCl) zu verhindern wurde die Boc-Schutzgruppe stattdessen mit 20 % Trifluoressigsäure in DCM behandelt. Das finale Produkt **3g** konnte mit einer Ausbeute von 42 % isoliert werden. Durch die aufkommende doppelte Substitution von **92** in Syntheseweg A, stellte sich Syntheseweg B als einzig darstellbare Option zur Synthese von **3g** dar.

Eine Überlagerung der beiden Kristallstrukturen von **3a** und **3b** zeigte, dass eine zusätzliche *meta*-Substitution am Phenylring von **3b** in Richtung der blau hervorgehobenen Subtasche in Abbildung 44 ausgerichtet wäre. Um eine generelle Tolerierbarkeit von zusätzlichen Substituenten zu untersuchen und gleichzeitig einen nutzbaren Startpunkt für weitere Reaktionen zu generieren wurde zunächst versucht 3-Brom-5-nitrobenzoesäure (**86g**) analog der bereits präsentierten Syntheseroute (vgl. Schema 29) zu Verbindung **84g** umzusetzen. Ausgehend von **4** und **84g** konnte **3h** mit einer Ausbeute von 3 % über drei Stufen erhalten werden (Schema 33).

Schema 33 Synthese von 3-Acrylamido-5-bromo-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (**3h**).^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) HATU, 2,6-Lutidin, DMF, rt, 18 h; (ii) HCl in Dioxan (4 N), rt, 18 h; (iii) Ameisensäure, ACN, 60 °C, 18 h; (iv) Fe, Essigsäure/EtOH/H₂O (2:2:1, v/v), 30 °C, 2 h, Ultraschall; (v) **21**, DIPEA, THF, rt, 3 h.

3.2.5 Biochemische Charakterisierung der 1,6-Naphthyridon-basierten Akt-Inhibitoren

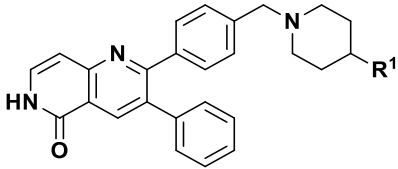
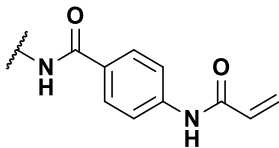
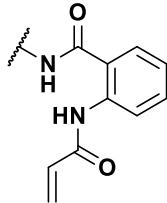
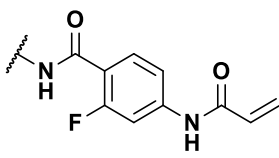
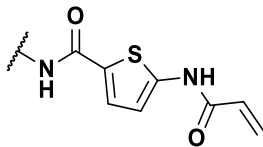
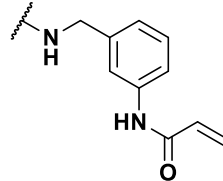
Die biochemische Aktivität der fokussierten Bibliothek von 1,6-Naphthyridon-basierten Inhibitoren wurde durch die Bestimmung der IC₅₀-Werte in Akt bestimmt (vgl. Abschnitt 3.1.4). In Tabelle 17

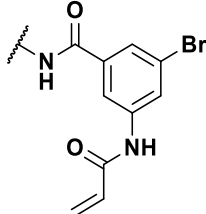
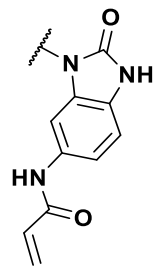
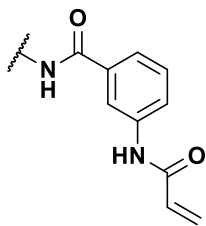
sind die ermittelten Werte aller synthetisierten Verbindungen sowie dem in der Klinik befindlichen Inhibitor MK-2206 gelistet. Zusätzlich wurden für eine Auswahl an Verbindungen die kinetischen Parameter K_i und k_{inakt} bestimmt (analog Abschnitt 3.1.6). Generell lässt sich feststellen, dass die bereits durch WEISNER und GONTLA *et al.* synthetisierten Inhibitoren **3a** und **3b** die höchste Aktivität gegenüber Akt aufweisen ($IC_{50} = 0.8$ nM bzw. 3.6 nM), wobei **3a** mit einem subnanomolaren IC_{50} -Wert eine deutliche Steigerung zum klinischen Kandidaten MK-2206 ($IC_{50} = 10$ nM) aufweist. Durch die Erhebung des Quotienten aus k_{inakt} und K_i , welcher die hohe Affinität und schnelle kovalente Bindungsknüpfung von **3a** zu Akt widerspiegelt ($K_i = 2.2$ nM, $k_{\text{inakt}} = 0.11$ min⁻¹), zeigt sich zudem ein herausragendes kinetisches Profil im Vergleich zu MK-2206 ($K_i = 4.1$ nM, $k_{\text{inakt}} = 0.01$ min⁻¹).

Im Zuge der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung wurde der Imidazolring in **3a** geöffnet um für die weitere Derivatisierung einen leichter zugänglichen chemischen Raum zu erhalten. Die daraus entstandene Verbindung **3b** zeigte eine um den Faktor 4.5 niedrigere halbmaximale inhibitorische Aktivität und eine halbierte Affinität zu Akt (**3a** vs. **3b**, $IC_{50} = 0.8$ vs. 3.6 nM, $K_i = 2.2$ vs. 6.8 nM). Jedoch erfolgte die kovalente Bindungsknüpfung, repräsentiert durch k_{inakt} , vergleichbar zu **3a** ($k_{\text{inakt}} = 0.11$ vs. 0.08 min⁻¹). Basierend auf **3b** wurde nun eine fokussierte Substanzbibliothek aufgebaut (**3c** – **h**). Deren Vertreter in ihrer Gesamtheit eine Inhibition im nanomolaren Bereich aufweisen konnten. Die Notwendigkeit der korrekten Orientierung des Michael-Akzeptors bei der Knüpfung der kovalenten Bindung zum Protein wird durch die Variation der Position in den Inhibitoren **3b** – **d** hervorgehoben. Es zeigte sich deutlich, dass die Positionierung des Michael-Akzeptors in *para*-Position (**3c**, $IC_{50} = 152$ nM) zu einem drastischen Verlust der Aktivität gegenüber Akt führt, wohingegen die *ortho*- und *meta*-Position (**3d** vs. **3b**, $IC_{50} = 11$ vs. 3.6 nM) eine nur einen leichten Rückgang der Aktivität aufweist. Durch die Einführung eines zusätzlichen Fluor-Substituenten (**3e**, $IC_{50} = 53$ nM) konnte der Effekt des ungünstig positionierten Michael-Akzeptors etwas abgeschwächt werden, ohne jedoch ein vergleichbares Niveau an Aktivität oder Affinität zur Ausgangsverbindung **3b** zu erreichen ($IC_{50} = 3.6$ nM). Mit Inhibitor **3f** sollte ein Bioisoster zu **3b** generiert werden. Wie in Tabelle 17 zu sehen, sinkt in diesem Fall die halbmaximale inhibitorische Aktivität um den Faktor 4 ($IC_{50} = 14$ vs. 3.6 nM), was vor allem durch die deutlich geringere Affinität von **3f** zu Akt zu erklären ist ($K_i = 39$ nM vs. 7 nM bei **3b**). Jedoch scheint die Einführung des bioisosteren Thiophens grundsätzlich gut toleriert zu werden, was in späteren Entwicklungsstufen im Hinblick auf die metabolische Stabilität und weitere Optimierungsparameter vorteilhaft sein könnte.²⁴⁹ Die Einführung einer weiteren Substitutionsstelle **3b**, repräsentiert durch Verbindung **3h**, führte nur zu minimalen Änderungen in allen in Tabelle 17 erhobenen Parametern ($IC_{50} = 3.7$ nM, $K_i = 7.6$ nM, $k_{\text{inakt}} = 0.08$ min⁻¹). Um zu untersuchen inwieweit eine weitere Erhöhung der Rotationsfreiheit die Aktivität sowie Affinität dieser Substanzklasse verändert wurde

3g synthetisiert. Es zeigte sich jedoch deutlich, dass die vollkommene Flexibilität der Aminverknüpfung zu einem totalen Aktivitätsverlust führt ($IC_{50} > 10 \mu M$).

Tabelle 17 Bestimmung der IC_{50} -Werte, sowie der kinetischen Parameter K_i , k_{inakt} und $\frac{k_{inakt}}{K_i}$ der in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren und literaturbekannter Referenzverbindungen gegen Akt^{WT}.^a

N°	R ¹	Akt ^{WT} IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	k _{inakt} [min ⁻¹]	$\frac{k_{inakt}}{K_i}$ [$\mu M^{-1}s^{-1}$]
	 3				
3c		152 ± 59	n.b.	n.b.	n.b.
3d		11 ± 2.5	27 ± 4.2	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.02
3e		53 ± 16	99 ± 10	0.09 ± 0.01	0.01 ± 0.002
3f		14 ± 6.1	39 ± 6.6	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.01
3g		>10 μM	n.b.	n.b.	n.b.

3h		3.7 ± 0.7	7.6 ± 1.1	0.08 ± 0.02	0.17 ± 0.03
3a		0.83 ± 0.32	2.2 ± 0.3	0.11 ± 0.02	0.85 ± 0.04
3b		3.6 ± 0.82	6.8 ± 0.34	0.08 ± 0.02	0.20 ± 0.04
MK-2206		10 ± 2.1	4.1 ± 0.2	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.01

^a Die ermittelten Daten sind Mittelwerte \pm zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die IC_{50} -Werte und kinetischen Parameter wurden von M.Sc. Jörn Weisner bestimmt.

3.2.6 Zelluläre Charakterisierung der 1,6-Naphthyridon-basierten Akt-Inhibitoren

Die zelluläre Aktivität der fokussierten Bibliothek von 1,6-Naphthyridon-basierten Inhibitoren wurde durch die Bestimmung der EC_{50} -Werte in verschiedenen Zelllinien mit einer bekannten Läsion im Akt-Signalweg bestimmt (Tabelle 18). Die grundlegende Vorgehensweise wurde bereits in Abschnitt 3.1.7 besprochen. Die zelluläre Wirksamkeit wird dabei auf verschiedenen Akt-abhängigen Zelllinien getestet. Hierbei sind AN3-CA²⁵⁰ (humane Endometriumzellen, Adenokarzinom), T47D²⁵¹ (humane Milchdrüsenepithelzellen, Brustkrebs), ZR-75-1²⁵² (humane Milchdrüsenepithelzellen, Brustkrebs), MCF-7²⁵³ (humane Milchdrüsenepithelzellen, Adenokarzinom) und BT-474²⁵⁴ (humane Milchdrüsenepithelzellen, Brustkrebs) Modellsysteme für Akt^{WT}. Die erstmals 1993 aus Blasenkrebszellen isolierte Zelllinie KU-19-19²⁵⁵ (Akt^{E17K/E49K}) dient hierbei zur Beschreibung der Wirksamkeit auf Akt^{E17K}. In Tabelle 18 sind die ermittelten Werte aller synthetisierten Verbindungen, mit Ausnahme von **3g**, sowie dem in der Klinik befindlichen Inhibitor MK-2206 und dem ATP-kompetitiven Inhibitor Ipatasertib als Vergleichssubstanzen gelistet. Von einer zellulären Charakterisierung von **3g** wurde abgesehen, da bereits die biochemische Aktivität bei über 10 μ M bestimmt wurde und dadurch keinerlei Effekt im zellulären Umfeld zu erwarten war.

Tabelle 18 Bestimmung der EC₅₀-Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren und literaturbekannter Referenzverbindungen gegen die Krebszelllinien AN3CA, T47D, ZR-75-1, MCF-7, BT-474 und KU-19-19.^a

N°	EC ₅₀ [nM]					
	AN3-CA	T47D	ZR-75-1	MCF-7	BT-474	KU-19-19
3c	2357 ± 776	1057 ± 338	102 ± 32 ^b	2729 ± 385 ^b	4037 ± 1631 ^b	1838 ^c
3d	1097 ± 402	255 ± 86	22 ± 7	911 ± 572	2268 ± 700	4834 ± 2081 ^b
3e	1507 ± 365	501 ± 74	73 ± 25	2437 ± 1017	1956 ± 391	4490 ± 1456 ^b
3f	922 ± 207	370 ± 195	33 ± 9	1652 ± 917	1104 ± 212	3010 ± 93 ^b
3h	793 ± 400	119 ± 36	10 ± 3	362 ± 255	621 ± 85	1428 ± 68
3a	203 ± 80	48 ± 15	5 ± 1	249 ± 91	373 ± 54	7818 ± 3271
3b	635 ± 439	95 ± 20	11 ± 3	376 ± 119	464 ± 31	2053 ± 657
Ipatasertib	603 ± 48	447 ± 2	219 ± 83	5059 ± 2240	2371 ± 745	4231 ± 3388 ^b
MK-2206	972 ± 322	411 ± 23	63 ± 21	571 ± 111	1682 ± 316	5525 ± 927 ^b

^a Die ermittelten Daten sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die EC₅₀-Werte und kinetischen Parameter wurden von M.Sc. Ina Landel und M.Sc. Jörn Weisner bestimmt. ^b Doppelmessung. ^c Einmalmessung.

Die bereits biochemisch aktivsten Inhibitoren (**3a** und **3b**) zeigen auch in den verschiedenen Zelllinien eine hervorragende Aktivität welche im Falle der Akt^{WT}-Zelllinien um ein vielfaches höher ist, als der in der klinische Kandidat MK-2206 (**3a** zwischen 5-fach bei BT-474 und 9-fach bei T47D; **3b** zwischen 4-fach bei BT-474 und 6-fach bei T47D). Im Falle der weiteren in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren ist eine abfallende Aktivität im Vergleich zu **3a** und **3b** zu beobachten. Dies bestätigt die bereits biochemisch beobachtete Struktur-Aktivitätsbeziehung dieser Verbindungsklasse. Trotz allem weisen auch diese Inhibitoren eine vergleichbare bzw. leicht höhere Aktivität auf den verschiedenen Akt^{WT}-Zelllinien im Vergleich zu MK-2206 auf. Im Falle der Akt^{E17K}-mutierten Zelllinie KU-19-19 moderate Aktivitäten für alle hier präsentierten Inhibitoren zwischen 1.5 und 8 μ M zu beobachten. Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass durch eine NRAS-Mutation (NRAS^{Q61R}) der Bypass-Signalweg (hier: RAS-RAF-MEK-ERK) hochreguliert ist, was

demnach in einer erhöhten Signalweiterleitung und dadurch bedingtes Zellüberleben resultiert.²⁵⁶ Dementsprechend ist bei KU-19-19 nicht von einer ausschließlichen Abhängigkeit von Akt auszugehen, weshalb eine niedrige Aktivität nicht zwangsläufig mit einer unzureichenden Inhibition von Akt^{E17K} einhergehen muss.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kovalente und kovalent-reversible Inhibitoren für verschiedene EGFR-Varianten synthetisiert und biochemisch sowie zellulär evaluiert (Abschnitte 3.1.3 – 3.1.8). Weiterführend wurde für die hier synthetisierten kovalent-reversiblen EGFR-Inhibitoren eine neuartige MS-basierte Methodik entwickelt um die während der Inaktivierung vorherrschenden Bindungszustände zu beschreiben (Abschnitt 3.1.9). Zusätzlich konnten zwei Klassen an Akt Interdomänen-Inhibitoren synthetisiert werden. Für die Klasse der dreifach substituierten Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidine (**2**) konnte hierbei eine erhebliche Optimierung des Synthesewegs sowie eine umfassende biochemische Charakterisierung erreicht werden (Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). Ferner konnte durch die Optimierung der Syntheseroute von 1,6-Naphthyridon-basierten Inhibitoren (**3**) eine fokussierte Substanzbibliothek synthetisiert werden, welche anschließend im biochemischen und zellulären Kontext untersucht wurde (Abschnitte 3.2.4 – 3.2.6)

Basierend auf einem etablierten Syntheseweg und bereits veröffentlichten Kristallstrukturen kovalenter Pyrazolopyrimidin-Inhibitoren ist die strukturbasierte Entwicklung und die synthetische Darstellung einer aussagekräftigen Substanzbibliothek gegenüber der wirkstoffresistenten EGFR-Variante (EGFR^{L858R/T790M}) geglückt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Substitution des Grundgerüsts an 3-Position mit raumgreifenden aromatischen Substituenten eine Verbesserung der Aktivität und Selektivität gegenüber EGFR^{L858R/T790M} erzielt werden kann (Tabelle 4), repräsentiert durch eine bis zu 800-fachen Verbesserung im Vergleich zum unsubstituierten Inhibitor (**1a** vs. **1f**, IC₅₀ = 2 vs. 1600 nM). Es zeigte sich deutlich, dass eine kovalente Bindungsknüpfung essentiell für eine erfolgreiche Inhibition von EGFR^{L858R/T790M} ist, da alle synthetisierten reversiblen EGFR-Inhibitoren keine nennenswerte Aktivität oder Selektivität aufweisen. Die speziell in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen **1k** und **1n** zeigten die höchste Aktivität auf EGFR^{L858R/T790M} (IC₅₀ = 10 bzw. 20 nM) bei einer moderaten Selektivität bezogen auf EGFR^{WT} ($\frac{WT}{L858R/T790M} = 2.9$ bzw. 3.5). Alle hier präsentierten Verbindungen zeigten eine mindestens um den Faktor 5, niedrigere Aktivität verglichen mit den bereits durch ENGEL und BECKER *et al.* veröffentlichten Inhibitoren **1a** und **1b** (IC₅₀ = 2 vs. 10 nM). Durch zelluläre Studien konnten die in biochemischen Experimenten gezogenen Schlüsse auch in klinisch relevanten Krebszelllinien (A431, HCC827 und H1975) bestätigt werden. Eine vermeintliche *off-target* Toxizität der Inhibitoren konnte durch die Untersuchung auf KRAS-mutierte Zelllinien (A549 und H358) ausgeschlossen werden.

Im Zuge dieser Arbeit konnte das Konzept der kovalent-reversibel bindenden Inhibitoren erfolgreich auf das Pyrazolopyrimidin-Grundgerüst übertragen werden (Abschnitt 3.1.5 – 3.1.7). Es zeigte sich, dass die jeweiligen kovalenten Inhibitoren eine mindestens zehnfach höhere Aktivität gegenüber EGFR^{L858R/T790M} besitzen (**1d** vs. **24d**, IC₅₀ = 2.7 vs. 20 nM). Eine zusätzliche zelluläre

Charakterisierung konnte die biochemisch observierte Selektivität für die wirkstoffresistente EGFR-Variante (EGFR^{L858R/T790M}) nicht bestätigen. Generell zeigte diese Klasse an Inhibitoren nur eine schwache Aktivität im zellulären Milieu. Die Bestimmung der kinetischen Parameter (K_i und k_{inakt}) für eine Auswahl an synthetisierten Inhibitoren (**1a**, **1b**, **24a**, **24b** und **24e**) zeigte vergleichbare Trends, wobei diese im Falle der K_i -Werte weniger zu beobachten war. Im Anschluss an die biochemische und zelluläre Charakterisierung wurde eine Profilierung von **24d** für eine Auswahl von 100 Proteinkinasen durchgeführt (Abschnitt 3.1.8). Hierbei zeigte **25d** eine gute Selektivität für EGFR (Abbildung 35).

Die Entwicklung einer reproduzierbaren und einfachen Methodik zur Bestimmung der kovalent-reversiblen Bindungszustände im Protein konnte durch die in Abschnitt 3.1.9 vorgestellten MS-Methode erfolgreich realisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass kovalente EGFR-Inhibitoren kovalent-reversible Analoga im Laufe des Experiments aus der Bindetasche verdrängen können. Daraus lässt sich schließen, dass die kovalente Bindung kovalent-reversibler Inhibitoren im Protein in einem Gleichgewicht vorliegt. Dies wurde verdeutlicht, indem gezeigt wurde, dass die vollständige Markierung von EGFR^{L858R/T790M} durch einen moderat aktiven kovalenten Inhibitor nicht durch einen biochemisch aktiveren kovalenten Inhibitor zu ändern ist (**1e** vs. **1a**, Abbildung 37B). Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde gezeigt, dass rein reversibel bindende Inhibitoren (hier **23c** und Gefitinib, Abbildung 37C und D) ebenfalls von CRIs aus der Bindetasche verdrängt werden können. Abschließend wurde gezeigt, dass strukturell stark unterschiedliche kovalente Inhibitoren (hier Osimertinib) ebenfalls in der Lage sind die hier synthetisierten Pyrazolopyrimidine (**24a**) im experimentellen Aufbau in EGFR^{L858R/T790M} ersetzen können (Abbildung 37E).

Durch die bereits in Abschnitt 3.1.1 besprochene zusätzliche Mutation (C797S) wird es in künftigen Arbeiten nötig werden Inhibitoren zu entwickeln, welche ihre Aktivität nicht hauptsächlich über die kovalente Bindungsknüpfung an Cys797 beziehen.¹⁴⁹ Hierzu wird gegebenenfalls eine weitere Änderung des Grundgerüsts nötig werden. Erste Erfolge bei der Inhibition von C797S-mutiertem EGFR konnte durch die Adressierung einer allosterischen Tasche erzielt werden (Abbildung 50).²⁵⁷⁻²⁵⁸

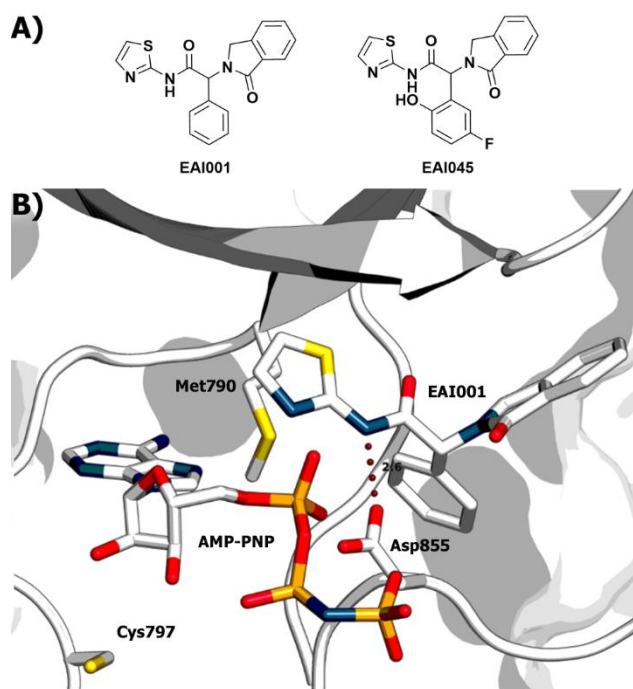


Abbildung 50 Allostere EGFR-Inhibitoren EAI001 und EAI045 (A). B) Kristallstruktur von EGFR^{T790M} in Komplex mit AMP-PNP und dem allosterischen Inhibitor EAI045.²⁵⁸

Neben der Adressierung allosterischer Taschen oder der Entwicklung neuer Grundgerüste, stellt die Modifizierung anderer nukleophiler Aminosäure (z. B. Serin) mit schwefelhaltigen Elektrophilen eine interessante Alternative bei der Entwicklung kovalenter EGFR-Inhibitoren dar.²⁵⁹⁻²⁶⁰ Besonders im Bereich der Onkologie wird es durch Mutationen der adressierten Proteine und dem dadurch aufkommenden Selektionsdruck immer wieder notwendig sein neue Inhibitoren zu entwickeln.²⁶¹

Die Etablierung einer Syntheseroute zur Generierung neuartiger allosterischer Interdomänen-Inhibitoren konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt werden (Abschnitt 3.2.2). Es konnten insgesamt 14 Derivate der Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-basierten (**2**) Inhibitoren dargestellt werden, wobei die kontinuierliche Optimierung der initial präsentierten Syntheseroute einen effizienten und schnellen Zugang zu einer Vielzahl von Derivaten ermöglichte.²⁰⁶ Die biochemische Charakterisierung zeigte deutlich, dass die synthetisierte Molekülklasse grundlegend fähig ist die allosterische Bindetasche von Akt adressieren können (Abschnitt 3.2.3). Bis auf **2h** konnte kein äquipotenter Inhibitor zum Ursprungsmolekül **2a** synthetisiert werden ($IC_{50} = 3.9$ vs. $3.2 \mu M$). Durch die Synthese der hier gezeigten fokussierten Substanzbibliothek wurde es aber möglich, einen tieferen Einblick in die Struktur-Aktivitätsbeziehung aufbauend auf dem von FANG identifizierten initialen *Hit* zu erhalten.²⁰⁵ Ziel der weiteren Entwicklung von Inhibitoren des Pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidin-Grundgerüsts (**2**) sollte eine Erweiterung der Derivatisierung an 5-Position sein um eine Adressierung von Cys296 analog der hier ebenfalls synthetisierten Naphtyridon-Inhibitoren zu erzielen (Abschnitt 3.2.4, Abbildung 44).

Neben der strukturbasierten Entwicklung und synthetischen Darstellung von 1,6-Naphthyridon-basierter Akt Inhibitoren (**3**) sollte die Syntheseroute, welche durch WEISNER und GONTLA etabliert wurde, im Hinblick auf Ausbeute und Effizienz optimiert werden.¹¹⁷ In diesem Zusammenhang konnten hier zwei kritische Syntheseschritte identifiziert und optimiert werden. Hierfür wurde die Ringschlussreaktion der westlichen Molekülhälfte (**4**, Schema 25) so umgestellt, dass eine separate Entschützung von **75** (Schema 23) umgangen werden konnte. Dies sorgte für eine deutlich bessere Ausbeute an **4** gegenüber der etablierten Synthesroute (69 % vs. 40 % über zwei Schritte). Des Weiteren konnte die bisher nur sehr schwer aufzureinigende reduktive Aminierung durch Umstellung auf klassische LEUCKART-WALLACH-Bedingungen (Tabelle 15) optimiert werden. Obwohl die Ausbeuten im Vergleich der von WEISNER und GONTLA präsentierten reduktiven Aminierung nur leicht gesteigert werden konnten (zur Darstellung von **81** von 32 % auf 54 %), zeigte sich eine deutliche Verbesserung während der säulenchromatographischen Trennung, weswegen im weiteren Verlauf ausschließlich die neu etablierten Bedingungen verwendet wurden.

Die in Abschnitt 3.2.5 biochemisch charakterisierten Inhibitoren zeigten bis auf **3c** und **3g** moderate bis sehr gute Aktivität auf Akt^{WT} (IC₅₀ zwischen 3 und 20 nM). Eine Erhebung der kinetischen Parameter (Tabelle 17) verdeutlichte, dass Unterschiede in der Aktivität hauptsächlich durch eine Änderung der Affinität der Inhibitoren zu erklären ist. Eine Bestimmung der zellulären Aktivitäten in einer Vielzahl von Krebszelllinien zeigte deutlich, dass kovalente Interdomänen-Inhibitoren vielversprechende Kandidaten für eine weiterführende Entwicklung darstellen. Der hier präsentierte Inhibitor **3a** befindet sich momentan in initialen Mausstudien um eine *in vivo* Wirksamkeit zu bestätigen. Abschließend konnte durch Einführung einer weiteren Substitutionsstelle in das Grundgerüst durch die Synthese von **3h** erfolgreich durchgeführt werden. Das in **3h** eingeführte Brom bietet eine gute Ausgangsposition für die Einführung von Substituenten, welche die in den bisher erhaltenen Kristallstrukturen von Wasser okkupierten Subtasche (hervorgehoben in blau, Abbildung 44), besetzen können. Zukünftige synthetische Bemühungen sollten sich zudem hauptsächlich auf eine Derivatisierung der westlichen Molekülhälfte fokussieren, da hier die vielversprechensten Voraussetzungen für eine gesteigerte Selektivität innerhalb der verschiedenen Akt-Isoformen zu erwarten ist.^{199,262}

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Anmerkungen

Die zur Herstellung und Isolierung der Zielverbindungen und Intermediate verwendeten **Chemikalien** und **Lösungsmittel** wurden, falls nicht anders erwähnt, direkt von den verschiedenen Anbietern (*Acros Organics, Alfa Aesar, AppliChem, Carl Roth, Deutero, Fluka, Maybridge, Merck KGaA, Sigma-Aldrich Co.* oder *VWR*) bezogen und ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt. Sämtliche oxidations- sowie hydrolyseempfindlichen Reaktionen wurden in Argon oder Stickstoff-Atmosphäre in sorgfältig ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt.

Die Messung der ^1H , ^{13}C und ^{19}F -Spektren wurden mit den Spektrometern von *Bruker AV 400* (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -NMR), *AV 500* (500 MHz für ^1H - und 125 MHz für ^{13}C -NMR), *AV 600* (600 MHz für ^1H - und 151 MHz für ^{13}C -NMR), *AV 700* (700 MHz für ^1H - und 176 MHz für ^{13}C -NMR) durchgeführt. Die chemische Verschiebungen δ 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 Deutereodimethylsulfat (DMSO-d_6 , $\delta = 2.50$ ppm bzw. $\delta = 39.52$ ppm). Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Zur Bezeichnung der Feinstrukturen der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet:

(s)	Singulett	(bs)	breites Signulett
(d)	Dublett	(dd)	Dublett von Dublett
(t)	Triplett	(td)	Triplett von Dublett
(q)	Quartett	(m)	Multiplett

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software *MestReNova* der Firma *Mestrelab Research* (Version 6.0.3-5604)

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit dem Spektrometer *Thermo LTQ Orbitrap* gekoppelt an ein *Accela* HPLC-System ausgesetzt mit einer *Hypersil GOLD*-Säule der Firma *Thermo Electron Co.* aufgenommen.

LC-MS-Messungen erfolgten auf einem *Agilent Technologies 1100 HPLC-System* (Säule: *Macherey Nagel CC 125/4 Nucleodur C18 Gravity 3 μm*) sowie einem *Agilent 1200 HPLC-System* mit UV Detektion bei 210 nm (Säule: *Agilent Eclipse XDB-C18 4.6 mm \times 150 mm*). Als Laufmittel wurde jeweils Acetonitril und VE-Wasser mit TFA als Zusatz in verschiedenen Gradientenmischungen verwendet. Für die Auswertung der LC-MS-Spektren wurde die Software *XcaliburTM* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Version 2.0.7) verwendet.

Für die **Dünnschichtchromatographie** wurden Aluminium-DC-Platten der Firma *Merck* (Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F254) verwendet. Die Sichtbarmachung der aufgetrennten Verbindungen erfolgt durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm oder durch Anfärben mit Ninhydrin- oder KMnO_4 -Lösung. Die Aufreinigung mit Hilfe der **Säulenchromatographie** wurde mit Kieselgel (Partikelgröße 40 – 60 μm) der Firma *VWR* durchgeführt.

Die chromatographischen Trennungen erfolgten, bei bis zu 100 mg Rohprodukt, an einer **präparativen HPLC**-Anlage. Es wurde eine *Agilent 1200* HPLC-Anlage (Säule *VP 125/21 Nucleodur C18* der Firma *Macherey-Nagel*; Wellenlängendetektion zwischen $\lambda = 210 - 254$ nm) verwendet. Alternativ und bei größeren Ansätzen erfolgte die Trennung an einer **Flash Chromatographie**-Anlage (*Biotage Isolera One*). Es wurden sowohl C_4 - als auch C_{18} -Säulen verwendet (*Biotage SNAP*, *SNAP Ultra*, *ZIP Sphere* oder *ZIP-KP Sil* der Firma *Biotage* in den Größen: 5 g, 10 g, 25 g und 120 g bzw. *Reveleris* der Firma *Grace* in den Größen: 4 g, 12 g, 24 g, 40 g, 80 g, 120 g und 330 g). Die Wellenlängendetektion erfolgte bei $\lambda = 254$ nm und 280 nm.

Mikrowellen-unterstützte Reaktionen wurden mittels *Monowave 300 Reaktor* der Firma *Anton Paar* durchgeführt.

Bei der für die Trocknung verwendeten **Gefriertrocknungsanlage** handelt es sich um eine *Alpha 2 – 4 D_{plus}* der Firma *Christ*.

5.2 Massenspektrometrie zum Nachweise kovalent-reversibler Modifikation

Für die MS-Experimente wurde EGFR^{T790M} verwendet. Dazu wurde 26 μM des Proteins mit 132 μM der entsprechenden kovalent-reversiblen Verbindung in Puffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 10 % Glycerol, 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin, pH 8.0) für drei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz geteilt (Aliquot mit je 15 μL). Ein Aliquot wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das zweite Aliquot wurde mit 66 μM des entsprechenden kovalenten Inhibitors versetzt und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit einem ESI-Massenspektrometer *Velos Pro* (2d Ionenfalle) der Firma *Thermo Fisher Scientific* vermessen. Insgesamt wurden 5 μL der Probe in eine *Vydac 214TP C₄* (5 μM , 150 mm x 2.1 mm) Säule injiziert und mit einem Lösungsmittelgradienten beginnend mit 20 % Lösungsmittel B (Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure) für 5 min (Steigerung auf 90 % Lösungsmittel B über 14 min mit einer Flussrate von 210 $\mu\text{L}/\text{min}$) und Lösemittel A (Wasser + 0.1 % Ameisensäure) eluiert. Ein Messbereich (m/z) zwischen 700 und 2000 wurde untersucht und die erhaltenen Rohdaten mit der Software *MagTran* (Version 1.02) dekonvolutiert. Die dekonvolutierten

Spektren wurden sequentiell mit der Software *ProMass* und *mMass* analysiert und auf einen Massenbereich von 37750 – 38550 m/z beschnitten.

5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

Im Folgenden werden die allgemeinen Arbeitsvorschriften (AAV) der mehrfach verwendeten Reaktionen beschrieben. Die unter diesen Vorschriften angegebenen Mengen entsprechen den eingesetzten Verhältnissen der durchgeführten Reaktionen. Abweichungen in den Mengenangaben, Reaktionsbedingungen oder Aufarbeitungsschritten sind explizit unter den detaillierten Synthesebeschreibungen aufgeführt.

5.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1: Suzuki-Kreuzkupplung mit verschiedenen Boronsäuren oder Boronsäurepinakolestern.

Eine Suspension aus *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**9**, 1.0 eq.) und einer Mischung aus DME und Ethanol (4.0 mL, 3:1, v/v) wird mit 2.0 mL gesättigter Natriumcarbonat-Lösung versetzt. Anschließend werden 1.5 eq. der jeweiligen Boronsäure (**11**) oder Boronsäurepinakolester (**12**) hinzugegeben. Nun wird 5 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Anschließend werden 0.1 eq. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) zugegeben und die Reaktionsmischung für 12 h bei 90 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Suspension über Celite® gefiltert und die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase wird gründlich mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt chromatographisch aufgereinigt.

5.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2: TFA Boc-Entschützung von Amin

Eine Lösung aus 1.0 eq. Boc-geschütztem Amin (**13**) in 3 mL Dichlormethan wird auf 0 °C gekühlt. Zu der gekühlten Reaktionsmischung werden tropfenweise 3 mL einer Lösung aus Trifluoressigsäure in Dichlormethan (1:3, v/v) gegeben. Anschließend wird die Reaktionsmischung für eine Stunde gerührt und dabei langsam auf rt erwärmt. Die Reaktionsmischung wird nun mit Dichlormethan verdünnt und der pH-Wert mittels gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf 8 eingestellt. Die wässrige Phase wird mit einer Mischung aus 10 % Methanol in Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

5.3.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3: Amidkupplung mit Acrylyl- oder Propionylchlorid

Zu einer Lösung aus 1.0 eq sekundärem Amin (**20**) in 4 mL THF werden bei 0 °C 10.0 eq. DIPEA gegeben und für 15 min bei 0 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wird eine Lösung aus 1.1 eq. Acrylyl- (**21**) oder Propionylchlorid (**22**) in 1 mL THF tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird nun bis zur vollständigen Umsetzung der Edukte bei 0 °C gerührt. Nun wird die Reaktion in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gequentscht. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt chromatographisch aufgereinigt.

5.3.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4: Amidkupplung mit 2-Cyanoessigsäure

Eine Lösung aus 1.0 eq. **20** in DCM (0.1 M) wird mit 1.5 eq. 2-Cyanoessigsäure (**25**), 1.5 eq. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 5.0 eq. DIPEA versetzt. Nun wird 10 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Anschließend wird eine Lösung von 1.5 eq. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC·HCl) in DCM (0.4 M) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 12 h bei rt unter Argonatmosphäre gerührt. Nun wird die Reaktion in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gequentscht. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

5.3.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5: Kondensation mit Cyclopropancarboxaldehyd

Zu einer Lösung aus 1.0 eq. **26** in Ethanol (0.1 M) wird 1.1 eq. Piperidin hinzugegeben. Nun wird 5 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit Cyclopropancarboxaldehyd (**27**, 1.5 eq.) versetzt. Die Reaktion wird auf 80 °C erhitzt und für 16 h unter Argonatmosphäre gerührt. Nun wird die Reaktion in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gequentscht. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt chromatographisch aufgereinigt.

5.3.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift 6: Amidkupplung mit Benzoessäurederivaten

Zu einer Lösung aus 1.0 eq. **86** in DMF (0.2 M) wird 1.0 eq. *N*-Boc-4-Aminopiperidin (**85**) und 1.0 eq. HATU gegeben. Anschließend wird der Reaktionsmischung langsam 3.0 eq. 2,6-Lutidin hinzugegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei rt unter Argonatmosphäre gerührt. Nun wird der

Reaktion solange VE-Wasser zugegeben bis das Rohprodukt ausfällt. Die Suspension wird weitere 30 min bei rt gerührt. Der Niederschlag wird abgetrennt und gründlich mit VE-Wasser gewaschen. Das erhaltene Produkt wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

5.3.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift 7: HCl Boc-Entschützung von Aminen

Eine Lösung aus 1.0 eq. Boc-geschütztem Amin (**87**) in 10 mL HCl in Dioxan (4 N) wird für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Nacht auf rt erwärmt. Die Reaktion wird nun auf 0 °C gekühlt, anschließend wird der pH mit 40 %iger NaOH auf 8 eingestellt. Ausfallender Feststoff wird abgetrennt und das Filtrat mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet.

5.3.8 Allgemeine Arbeitsvorschrift 8: LEUCKART-WALLACH Kupplung

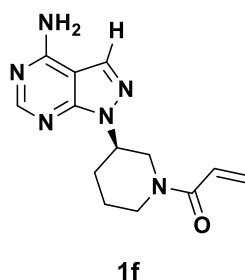
Zu einer Lösung aus 1.0 eq. **4** in DMF (~0.1 M) wird 1.3 eq. sekundäres Amin (**84**) und 4.0 eq. Ameisensäure gegeben. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Nacht bei 60 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen auf rt wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt chromatographisch aufgereinigt.

5.3.9 Allgemeine Arbeitsvorschrift 9: Reduktion von Nitro- zu Aminverbindungen

Zu einer Lösung aus 1.0 eq. **88** in einem Lösemittelgemisch aus Ethanol, Essigsäure und Wasser (2:2:1, v/v) wird 5.5 eq. Eisenpulver gegeben. Anschließend wird die Reaktionsmischung für 2.5 h bei 30 °C im Ultraschallbad gehalten. Nach Abkühlen auf rt wird die Suspension über Celite® gefiltert und die organische Phase abgetrennt. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt chromatographisch aufgereinigt.

5.4 Synthesen

5.4.1 (*R*)-1-(3-(4-Amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1f**)

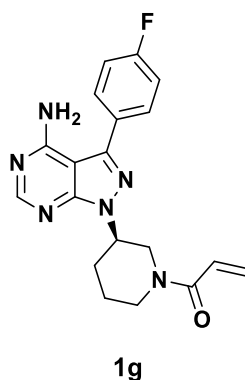


Nach AAV 2 wird **13f** (50 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (14 μL , 0.2 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (269 μL , 1.6 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 3/97, v/v)) aufgereinigt. Es werden 15 mg (0.1 mmol, 38 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.33 (s, 1H), 8.26 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 6.89 – 6.64 (m, 1H), 6.15 – 6.04 (m, 1H), 5.73 – 5.59 (m, 1H), 4.70 – 4.59 (m, 1H), 4.52 (d, $J = 12.4$ Hz, 0.5H), 4.27 – 4.21 (m, 0.5H), 4.19 – 4.13 (m, 0.5H), 4.11 – 4.05 (m, 0.5H), 3.63 (m, 0.5H), 3.20 – 3.11 (m, 1H), 2.98 – 2.92 (m, 0.5H), 2.25 – 2.16 (m, 1H), 2.12 – 2.05 (m, 1H), 1.94 – 1.87 (m, 1H), 1.65 – 1.53 (m, 1H).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 273.15 für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 273.15.

5.4.2 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1g**)



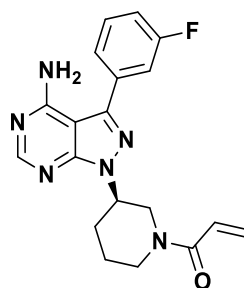
Nach AAV 2 wird **13g** (78 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (17 μL , 0.2 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (326 μL , 1.9 mmol, 9.8 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM

(1/99, v/v – 3/97, v/v)) aufgereinigt. Es werden 44 mg (0.1 mmol, 63 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.39 (s, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.23 (t, 2H), 6.58 (m, 1H), 6.29 (d, 1H), 5.68 (d, 1H), 5.40 (s, 2H), 2.36 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.27 (m, 5H).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 367.16 für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FN}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: Gefunden: 367.17.

5.4.3 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1h**)



1h

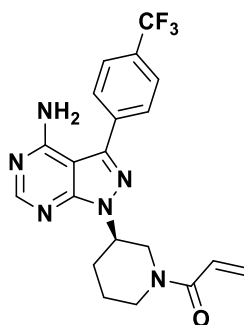
Nach AAV 2 wird **13h** (239 mg, 0.6 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das entschützte Amin **20h** (44 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) direkt analog AAV 3 mit **21** (13 μL , 0.2 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (246 μL , 1.4 mmol, 10.2 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 15 mg (0.04 mmol, 29 %) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.29 (s, 1H), 7.60 – 7.41 (m, 3H), 7.36 – 7.27 (m, 1H), 6.90 – 6.61 (m, 1H), 6.09 (dd, $J = 35.8, 16.9$ Hz, 1H), 5.74 – 5.53 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.17 (s, 1H), 3.77 – 3.66 (m, 1H), 3.24 (dd, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.04 – 1.88 (m, 2H), 1.59 (s, 1H), 1.32 – 1.19 (m, 2H).

$^{19}\text{F NMR}$ (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -74.34 (s, $J = 293.7$ Hz).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 367.16771 für $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ON}_6\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 367.16812.

5.4.4 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1i**)



1i

Nach AAV 2 wird **13i** (439 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (90 μ L, 1.1 mmol, 1.2 eq.) und DIPEA (1.7 mL, 10.0 mmol, 10.5 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels präparativer HPLC (H₂O/ACN (30/70, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 123 mg (0.3 mmol, 31 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

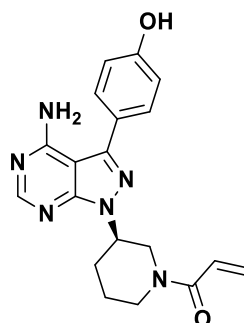
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.28 (s, 1H), 7.89 (s, 4H), 6.96 – 6.66 (m, 1H), 6.08 (dt, $J = 34.5, 17.4$ Hz, 1H), 5.63 (dt, $J = 60.8, 11.9$ Hz, 1H), 4.72 (dd, $J = 31.2, 20.2$ Hz, 1H), 4.15 (dt, $J = 33.0, 13.4$ Hz, 2H), 3.27 – 3.01 (m, 2H), 2.31 – 2.20 (m, 1H), 2.16 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 1.98 – 1.89 (m, 1H), 1.61 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.6, 158.2, 155.8, 136.8, 129.0, 126.0, 97.5, 70.0 – 69.57, 53.00 – 52.63, 49.51 – 49.04, 45.70, 29.70 – 29.48, 24.87.

¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆): δ -60.98 (s, $J = 225.9$ Hz).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 417.16452 für C₂₀H₂₀N₆OF₃ [M+H]⁺ und 439.14647 für C₂₀H₁₉N₆OF₃Na [M+Na]⁺. Gefunden: 417.16392 und 439.14578.

5.4.5 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1j**)



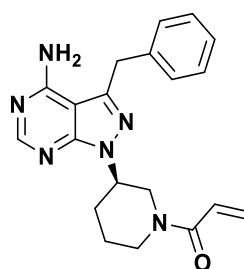
1j

Nach AAV 2 wird **13j** (88 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (19 μ L, 0.2 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (371 μ L, 2.2 mmol, 9.8 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 51 mg (0.1 mmol, 64 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.45 (s, 1H), 7.46 (d, 2H), 7.27 (s, 2H), 6.95 (d 2H), 4.74 (s, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.98 (m, 1H), 1.56 (m, 2H).

LC-MS (ESI-MS): 365.17 für C₁₉H₂₁N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 365.17.

5.4.6 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-benzyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1k**)



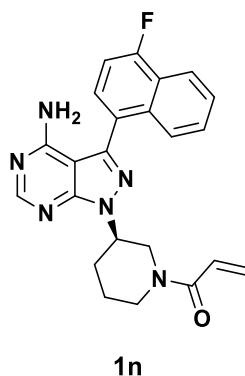
1k

Nach AAV 2 wird **13k** (58 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (12 μ L, 0.1 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (223 μ L, 1.3 mmol, 9.2 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 27 mg (0.1 mmol, 50 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 9.36 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 7.57 – 7.30 (m, 5H), 6.55 (d, $J = 43.0$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 5.50 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 2.33 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.25 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 2.06 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H), 1.71 (dt, $J = 43.7, 16.0$ Hz, 2H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 363.19279 für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ON}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ und 385.17473 für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ON}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Gefunden: 363.19288 und 385.17471.

5.4.7 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-fluoronaphthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1n**)

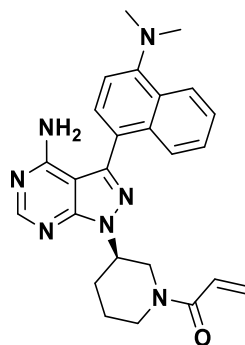


Nach AAV 2 wird **13n** (121 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (23.3 μL , 0.3 mmol, 1.3 eq.) und DIPEA (452 μL , 2.6 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 39 mg (0.1 mmol, 36 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.29 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.47 (dd, $J = 10.5, 8.0$ Hz, 1H), 6.91 – 6.69 (m, 1H), 6.10 (dd, $J = 40.6$ Hz, 16.6 Hz, 1H), 5.65 (dd, $J = 68.6$ Hz, 10.2 Hz, 1H), 4.75 (ddd, $J = 46.9$ Hz, 23.1 Hz, 12.0 Hz, 1H), 4.32 – 3.96 (m, 2H), 3.38 – 2.96 (m, 2H), 2.35 – 2.15 (m, 2H), 2.03 – 1.88 (m, 2H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 417.18336 für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ON}_6\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ und 439.16531 für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ON}_6\text{FNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Gefunden: 417.18300 und 439.16488.

5.4.8 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-(dimethylamino)naphthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1o**)



1o

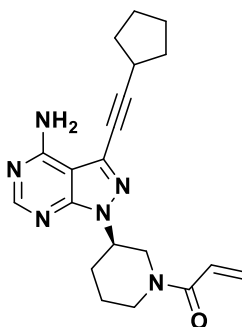
Nach AAV 2 wird **13o** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (19 μ L, 0.2 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (354 μ L, 2.1 mmol, 9.8 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 22 mg (0.1 mmol, 24 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.56 (dd, $J = 18.7$ Hz, 10.8 Hz, 1H), 7.54 – 7.48 (m, $J = 15.0$ Hz, 7.7 Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.86 (dd, $J = 16.4$ Hz, 10.6 Hz, 1H), 6.73 (dd, $J = 16.3$ Hz, 10.7 Hz, 1H), 6.10 (dd, $J = 48.3$ Hz, 16.5 Hz, 1H), 5.71 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 5.59 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.81 – 4.71 (m, 1H), 4.58 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.23 (dd, $J = 45.2$ Hz, 12.6 Hz, 1H), 4.04 (dd, $J = 17.6$ Hz, 10.4 Hz, 1H), 3.77 – 3.71 (m, 1H), 2.91 (s, 6H), 2.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.21 – 2.16 (m, 1H), 2.00 – 1.92 (m, $J = 9.8, 3.4$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.1, 158.4, 156.3, 154.1 – 153.8, 152.0, 143.32, 133.1, 132.4 – 131.6, 128.9, 128.8 (d, $J = 14.4$ Hz), 128.2 – 127.6, 127.1, 126.4, 125.8, 124.9, 124.4, 114.0, 99.9 – 99.2, 56.0, 53.8 – 53.0, 52.4, 49.8, 45.5, 45.1, 30.3 – 29.9, 25.6 – 25.1, 24.0 – 23.6.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 442.23499 für C₂₅H₂₈ON₇ [M+H]⁺. Gefunden: 442.23528.

5.4.9 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(cyclopentylethynyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1p**)

**1p**

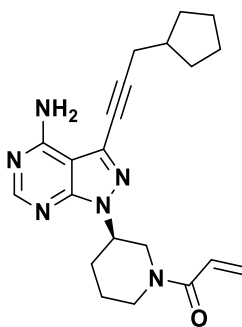
Nach AAV 2 wird **13p** (125 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das entschützte Amin **20p** (109 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) direkt analog AAV 3 mit **21** (31 μL , 0.4 mmol, 1.3 eq.) und DIPEA (604 μL , 3.5 mmol, 11.3 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 3/97, v/v)) aufgereinigt. Es werden 22 mg (0.1 mmol, 19 %) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.28 (s, 1H), 6.94 – 6.57 (m, 1H), 6.19 – 5.99 (m, 1H), 5.77 – 5.52 (m, 1H), 4.67 – 4.58 (m, 1H), 4.52 (d, $J = 11.3$ Hz, 0.5H), 4.32 – 4.24 (m, 0.5H), 4.21 – 4.14 (m, 0.5H), 4.09 – 4.04 (m, 0.5H), 3.64 – 3.56 (m, 0.5H), 3.21 – 3.06 (m, 1H), 3.06 – 2.97 (m, 1H), 2.93 – 2.83 (m, 0.5H), 2.24 – 2.13 (m, 1H), 2.10 – 1.98 (m, 3H), 1.94 – 1.83 (m, 1H), 1.78 – 1.65 (m, 4H), 1.64 – 1.51 (m, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.9, 156.5, 154.6, 152.2, 128.3, 127.2, 100.3, 71.4, 52.6, 48.9, 44.9, 41.0, 33.1, 30.2, 29.1, 24.5, 22.9.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 365.20844 für $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ON}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ und 387.19038 für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{ON}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Gefunden: 365.20857 and 387.19038.

5.4.10 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(3-cyclopentylprop-1-yn-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**1q**)

**1q**

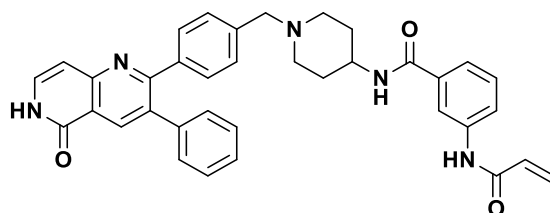
Nach AAV 2 wird **13q** (66 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt direkt analog AAV 3 mit **21** (15 μL , 0.2 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (270 μL , 1.6 mmol, 9.8 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 38 mg (0.1 mmol, 63 % über zwei Reaktionsschritte) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.20 (s, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.59 (m, 1H), 6.32 (d, 1H), 5.75 (d, 1H), 4.81 (d, 1H), 4.03 (d, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.24 (m, 2H), 2.19 (m, 2H), 1.88 (dt, 2H), 1.68 (m, 4H), 1.60 (m, 3H), 1.31 (dt, 3H), 1.25 (m, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 166.1, 153.8, 153.8, 150.5, 146.6, 129.0, 129.0, 127.3, 86.7, 53.6, 46.2, 45.9, 38.80, 38.78, 25.5, 25.5, 25.3, 25.2.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 379.22 für $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 379.22.

5.4.11 3-Acrylamido-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (3b)



3b

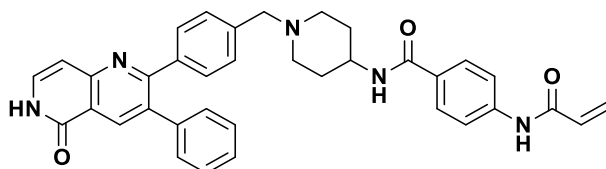
Nach AAV 3 wird **89b** (150 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) mit **21** (25 μ L, 0.3 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (482 μ L, 2.8 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 3 wird die Reaktion über Nacht langsam auf rt erwärmt und gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 25 mg (0.04 mmol, 15 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.60 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 10.33 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.87 (t, J = 15.4 Hz, 1H), 7.50 (dt, J = 17.6 Hz, 9.6 Hz, 2H), 7.38 (dd, J = 16.9 Hz, 9.0 Hz, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 6H), 7.24 (dd, J = 7.0 Hz, 2.2 Hz, 4H), 6.69 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 17.0 Hz, 10.2 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 17.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 3.76 (s, 1H), 3.48 (d, J = 26.6 Hz, 2H), 2.78 (s, 2H), 1.76 (s, 2H), 1.56 (t, J = 17.3 Hz, 2H), 1.23 (s, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.74 – 165.46 (m), 163.26, 161.99, 161.47 – 161.07 (m), 152.92, 139.00, 136.79, 135.73 – 135.33 (m), 133.62 (d, J = 29.8 Hz), 131.77, 129.65, 129.38, 128.57, 128.41, 128.23 – 128.01 (m), 127.46, 127.09, 122.04, 121.77, 120.25, 118.72, 105.89, 70.00 – 69.52 (m), 61.92 – 61.34 (m), 52.24, 47.19 – 46.73 (m), 31.45.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 584.69 für C₃₆H₃₃N₅O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 584.37.

5.4.12 4-Acrylamido-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (3c)



3c

Nach AAV 3 wird **89c** (347 mg, 0.7 mmol, 1.0 eq.) mit **21** (59 μ L, 0.7 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (1.1 mL, 6.5 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 3 wird die Reaktion über Nacht langsam auf rt erwärmt und gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-

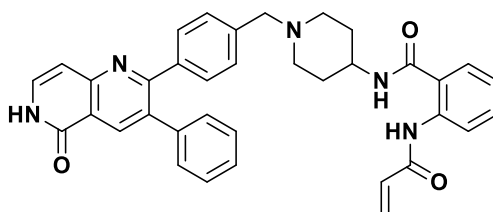
Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 10 mg (0.02 mmol, 6 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.60 – 11.50 (m, 1H), 11.46 (s, 1H), 8.53 (d, *J* = 7.74 Hz, 1H), 8.43 – 8.37 (m, 2H), 7.74 (d, *J* = 7.74 Hz, 1H), 7.52 – 7.45 (m, 2H), 7.36 – 7.28 (m, 4H), 7.23 (dd, *J* = 15.60 Hz, 7.64 Hz, 3H), 7.17 (t, *J* = 7.64 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.31 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 16.99 Hz, 10.33 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 16.99 Hz, 1H), 5.79 (d, *J* = 10.33 Hz, 1H), 3.83 – 3.75 (m, 1H), 3.46 (s, 2H), 2.79 (br d, *J* = 10.97 Hz, 2H), 2.07 – 1.97 (m, 2H), 1.78 (br d, *J* = 10.97 Hz, 2H), 1.58 (br d, *J* = 9.68 Hz, 2H), 1.23 (br s, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.70, 163.60, 162.47, 161.67, 153.40, 139.56, 139.51, 138.92, 138.57, 137.27, 134.19, 133.98, 133.07, 132.21, 130.11, 129.85, 128.88, 128.84, 128.64, 127.92, 127.51, 123.44, 122.22, 121.26, 120.72, 106.37, 70.27, 63.96, 62.13, 60.22, 52.60, 47.44, 31.65.

HRMS (ESI-MS) Berechnet: 583.2583 für C₃₆H₃₃N₅O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 584.2655.

5.4.13 2-Acrylamido-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (3d)



3d

Nach AAV 3 wird **89d** (150 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) mit **21** (25 μ L, 0.3 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (482 μ L, 2.8 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 3 wird die Reaktion über Nacht langsam auf rt erwärmt und gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 68 mg (0.1 mmol, 41 %) des designierten Produkts erhalten.

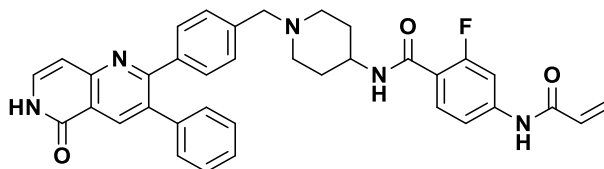
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.59 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.10 (dd, *J* = 24.8 Hz, 9.3 Hz, 1H), 7.85 – 7.79 (m, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 12.3 Hz, 5.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 6H), 7.24 (dd, *J* = 7.1 Hz, 2.1 Hz, 4H), 6.67 (t, *J* = 14.6 Hz, 1H), 6.44 (dd, *J* = 16.9 Hz, 10.2 Hz, 1H), 6.28 (dd, *J* = 17.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 3.83 – 3.68 (m, 1H), 3.50 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 1.75 (s, 2H), 1.52 (ddd, *J* = 23.2 Hz, 18.0 Hz, 10.1 Hz, 4H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.40 – 163.19 (m), 162.24 – 161.82 (m), 153.37 – 152.47 (m), 137.17 – 136.42 (m), 133.63 (d, *J* = 29.6 Hz), 132.12 – 131.36 (m), 129.65, 129.39, 128.30

(d, $J = 37.0$ Hz), 127.82 (d, $J = 106.6$ Hz), 127.47, 118.42, 117.94, 105.90, 69.79, 52.27, 46.92 – 46.58 (m), 29.01.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 583.2583 für $C_{36}H_{33}N_5O_3$ $[M+H]^+$. Gefunden: 584.2647.

5.4.14 4-Acrylamido-2-fluoro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (3e)



3e

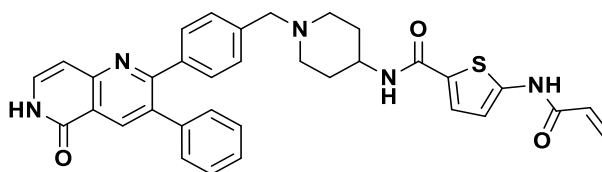
Nach AAV 3 wird **89e** (150 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) mit **21** (25 μ L, 0.3 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (466 μ L, 2.7 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 3 wird die Reaktion über Nacht langsam auf rt erwärmt und gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H_2O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 40 mg (0.1 mmol, 23 %) des designierten Produkts erhalten.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 11.58 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 10.52 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.74 (dd, $J = 13.0$ Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.51 – 7.47 (m, 1H), 7.37 (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 5.2$ Hz, 1.6 Hz, 5H), 7.26 – 7.20 (m, 5H), 6.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.43 (dd, $J = 17.0$ Hz, 10.1 Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 17.0$ Hz, 1.8 Hz, 1H), 5.82 (dd, $J = 10.1$ Hz, 1.7 Hz, 1H), 3.73 (s, 1H), 3.45 (s, 2H), 2.75 (s, 2H), 2.06 – 1.98 (m, 2H), 1.77 (s, 2H), 1.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6): δ 163.61, 162.75 – 162.58 (m), 161.99, 161.27 – 161.13 (m), 160.07, 158.43, 152.92, 142.26, 139.02, 138.26 – 138.00 (m), 136.79, 133.72, 133.51, 131.35, 130.60 (d, $J = 4.2$ Hz), 129.65, 129.38, 128.42, 128.18, 128.01, 127.46, 120.25, 118.92, 118.83, 114.66, 106.27, 106.08, 105.90, 61.85 – 61.58 (m), 59.75, 51.97, 46.73, 31.35, 20.77, 14.09.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 601.2489 für $C_{36}H_{32}FN_5O_3$ $[M+H]^+$. Gefunden: 602.2563.

5.4.15 5-Acrylamido-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)thiophen-2-carboxamid (3f)



3f

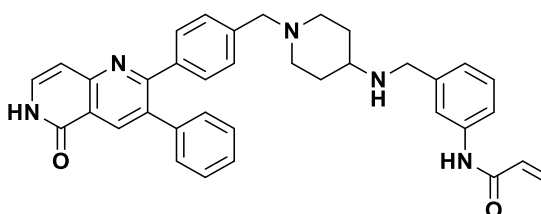
Nach AAV 3 wird **89f** (150 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) mit **21** (25 μ L, 0.3 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (476 μ L, 2.8 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 3 wird die Reaktion über Nacht langsam auf rt erwärmt und gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 54 mg (0.1 mmol, 31 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.65 – 11.59 (m, 2H), 8.39 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 1H), 7.36 – 7.29 (m, 5H), 7.29 – 7.19 (m, 4H), 6.72 – 6.67 (m, 2H), 6.41 (dd, *J* = 17.0 Hz, 10.0 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J* = 17.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 5.85 (dd, *J* = 10.0 Hz, 1.7 Hz, 1H), 3.70 (s, 1H), 3.48 (d, *J* = 23.5 Hz, 2H), 2.78 (s, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 2H), 1.75 (s, 2H), 1.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.97 (d, *J* = 7.1 Hz), 161.64 (d, *J* = 3.8 Hz), 161.14 (d, *J* = 8.2 Hz), 152.91 (d, *J* = 2.8 Hz), 143.51, 139.02, 136.79, 133.72, 133.51, 130.15, 129.86, 129.64, 129.38, 128.39 (d, *J* = 6.5 Hz), 128.16, 127.46, 125.88, 120.25, 111.76, 105.90, 69.78, 61.64, 59.75, 52.24, 46.72 – 46.62 (m), 31.67.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 589.2148 für C₃₄H₃₁N₅O₃S [M+H]⁺. Gefunden: 590.2224.

5.4.16 *N*-(3-(((1-(4-(5-Oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)amino)methyl)phenyl)acrylamid (3g)



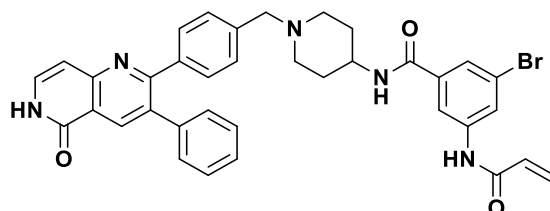
3g

Nach AAV 7 wird **98** (40 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) und HCl in Dioxan (4 N, 2 mL) umgesetzt. Abweichend von AAV 7 wird die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit VE-Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das

Rohmaterial wird mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 30 mg (0.1 mmol, 87 %) des designierten Produkts erhalten.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 569.2791 für C₃₆H₃₅N₅O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 570.2864

5.4.17 3-Acrylamido-5-bromo-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (3h)



3h

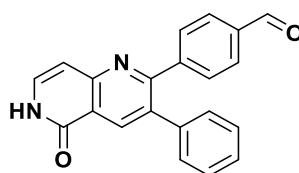
Nach AAV 3 wird **89g** (140 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) mit **21** (21 μ L, 0.3 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (476 μ L, 2.3 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 3 wird die Reaktion über Nacht langsam auf rt erwärmt und gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 23 mg (0.03 mmol, 15 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.59 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 10.52 (s, 1H), 8.38 (s, 2H), 8.23 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.49 (t, 1H), 7.36 – 7.28 (m, *J* = 9.1 Hz, 5H), 7.27 – 7.18 (m, 4H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 17.0 Hz, 10.2 Hz, 1H), 6.29 (dd, *J* = 17.0 Hz, 1.3 Hz, 1H), 5.79 (dd, *J* = 13.9 Hz, 12.6 Hz, 1H), 3.75 (bs, 1H), 3.47 (bs, 2H), 2.82 (bs, *J* = 28.3 Hz, 2H), 2.04 (bs, *J* = 37.6 Hz, 2H), 1.77 (bs, 2H), 1.58 (bs, 2H).

¹³C NMR (176 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.98, 163.53, 161.97, 161.15, 152.91, 140.48, 139.00, 138.16, 137.25, 136.77, 133.70, 133.49, 131.37, 129.64, 129.37, 128.39, 128.20, 127.79, 127.44, 124.31, 123.76, 121.39, 120.25, 117.73, 105.89, 61.57, 52.09, 47.09, 31.28.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 661.1689 für C₃₆H₃₂BrN₅O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 662.1763 und 664.1744.

5.4.18 4-(1-Oxo-7-phenyl-1,2-dihydroisochinolin-6-yl)benzaldehyd (**4**)



4

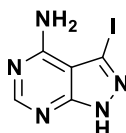
Eine Lösung aus **84** (3.0 g, 7.8 mol, 1.0 eq.) in 200 mL konz. Salzsäure wird auf 90 °C erhitzt. Nun wird für 3 h bei gleichbleibender Temperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf rt abgekühlt und langsam mit 40 %iger NaOH auf pH = 7 eingestellt. Der entstehende Niederschlag wird filtriert und gründlich mit VE-Wasser gewaschen. Es werden 2.3 g (7.1 mmol, 91 %) gelb-orange farbener Feststoff erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.66 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 3H), 7.27 – 7.23 (m, 2H), 6.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 192.86, 161.91, 160.11, 152.96, 145.23, 138.43, 137.04, 135.58, 133.93, 133.82, 130.52, 129.48, 128.96, 128.57, 127.69, 120.72, 105.79.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 327.35 für C₂₁H₁₄N₂O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 327.39.

5.4.19 4-Amino-3-Iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin (**7**)



7

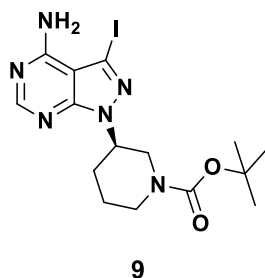
Eine Suspension aus 4-Amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin (**6**, 5.0 g, 37.0 mmol, 1.0 eq) und *N*-iodosuccinimide (12.5 g, 55.5 mmol, 1.5 eq) in 20 mL DMF wird für 12 h bei 85 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf rt abgekühlt und der entstehende Niederschlag filtriert. Der Niederschlag wird gründlich mit vorgekühltem Methanol gewaschen. Der gräuliche Niederschlag wird über Nacht im Vakuum getrocknet. Es werden 9.4 g (35.9 mmol, 97 %) an 4-Amino-3-Iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin (**7**) erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.78 (s, 1 H), 8.17 (s, 1 H), 7.09 (bs, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 157.5, 156.0, 102.5, 89.6.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 261.95 für C₅H₄IN₅ [M+H]⁺. Gefunden: 262.14.

5.4.20 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**9**)



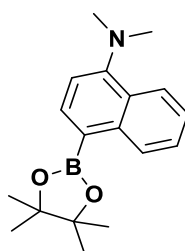
Einer Suspension aus 4-Amino-3-Iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin (**7**, 500 mg, 1.9 mmol, 1.0 eq) in 20 mL wasserfreiem THF wird bei rt *tert*-Butyl-(*S*)-3-hydroxypiperidin-1-carboxylat (**8**, 556 mg, 2.7 mmol, 1.4 eq.) zugegeben. Nun wird 5 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Zu der gelblichen Suspension wird Triphenylphosphin (**10**, 754 mg, 2.9 mmol, 1.5 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Bei gleichbleibender Temperatur wird tropfenweise Azodicarbonsäurediisopropylester (564 μ L, 2.9 mmol, 1.5 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird langsam auf rt erwärmt und über Nacht unter Argonatmosphäre gerührt. Nun wird die Reaktion in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gequentscht. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (DCM/EtOAc (60/40, v/v) + 1 % MeOH) aufgereinigt. Es werden 793 mg (1.8 mmol, 31 %) als gelbliches Pulver erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.21 (s, 9H), 7.04 (s, 2H), 4.64 – 4.57 (m, 1H), 3.99 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 3.80 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.11 (s, 2H), 2.20 – 2.10 (m, 1H), 2.10 – 2.02 (m, 1H), 1.94 – 1.85 (m, 1H), 1.60 – 1.48 (m, 1H), 1.37 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 154.6, 152.9, 151.5, 145.5, 102.6, 88.9, 80.5, 77.4, 77.3 – 77.1, 76.9, 32.1, 30.4, 29.8, 28.6, 24.3, 22.8.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 445.08434 für C₁₅H₂₁IN₆O₆ [M+H]⁺. Gefunden: [M+H]⁺ 445.08403.

5.4.21 *N,N*-Dimethyl-1-naphthylamin-4-boronsäurepinakolester (**12m**)

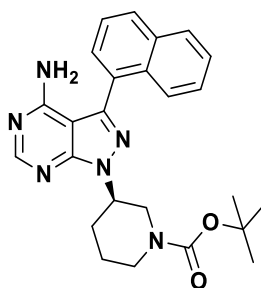


12k

Eine Lösung aus 4-Bromo-*N,N*-dimethyl-1-naphthylamin (**14**, 500 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq.) in 8 mL trockenem THF wird auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Zu dieser Lösung wird über 45 min tropfenweise Bis(pinakolato)diboron (**15**, 1.5 g, 6.0 mmol, 3.0 eq.) zugegeben. Bei gleichbleibender Temperatur wird die Reaktionsmischung für 2 h gerührt. Die Reaktion wird nun langsam auf rt erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wird das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 30 mL 0.1 M HCl aufgenommen und mit Dichlormethan extrahiert. Die abgetrennte organische Phase wird mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH = 8 eingestellt und erneut mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 438 mg (14.7 mmol, 73 %) als gräulicher Feststoff erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 297.20 für $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{BNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 298.30.

5.4.22 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(naphthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13a**)



13a

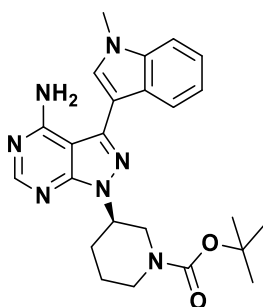
Nach AAV 1 wird **9** (500 mg, 1.1 mmol, 1.00 eq.) mit Naphthyl-1-boronsäure (**11a**, 259 mg, 1.5 mmol, 1.3 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (130 mg, 0.1 mmol, 0.10 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 399 mg (0.9 mmol, 80%) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.30 (s, 1H), 8.06 (dd, J = 14.8 Hz, 7.9 Hz, 2H), 7.91 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.71 – 7.49 (m, 4H), 5.46 (s, 2H), 4.81 – 4.69 (m, 1H), 4.33 – 3.51 (m, 3H), 3.14 – 2.87 (m, 1H), 2.31 – 2.19 (m, 1H), 2.19 – 2.10 (m, 1H), 2.05 – 1.82 (m, 1H), 1.63 – 1.52 (m, 1H), 1.33 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 157.9, 155.7, 153.8, 153.6, 141.7, 133.5, 131.3, 129.8, 129.2, 128.3, 128.2, 126.8, 126.2, 125.6, 125.4, 99.2, 78.8, 52.2, 47.6, 43.2, 28.9, 27.9, 23.6.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 445.23 für C₂₅H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 445.13.

5.4.23 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13b**)



13b

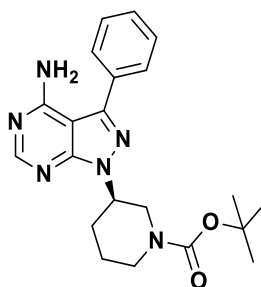
Nach AAV 1 wird **9** (500 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) mit *N*-Methylindol-3-boronsäurepinakolester (**12b**, 388 mg, 1.5 mmol, 1.3 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (130 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 223 mg (0.5 mmol, 44 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.24 (s, 1H), 7.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.54 – 7.50 (m, 1H), 7.27 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.15 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.70 (ddd, J = 14.2 Hz, 9.8 Hz, 4.2 Hz, 1H), 4.12 – 4.00 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 3.05 – 2.98 (m, 1H), 2.32 – 2.22 (m, 1H), 2.14 (dt, J = 17.6 Hz, 6.5 Hz, 1H), 2.01 – 1.95 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.8, 155.9, 137.3, 133.6, 132.8, 132.5, 132.0 (d, J = 9.7 Hz), 130.1, 129.2 (d, J = 11.8 Hz), 126.6, 122.6, 121.0, 120.4, 110.5, 107.2, 84.2 – 84.1 (m), 60.2, 52.3, 33.2, 28.4, 25.3 – 24.1 (m), 21.2.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 448.24 für C₂₄H₃₀N₇O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 448.15.

5.4.24 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13c**)



13c

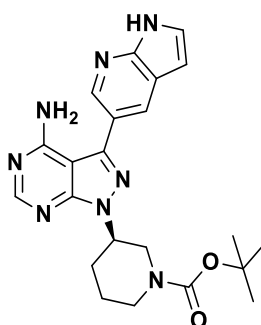
Nach AAV 1 wird **9** (500 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) mit Phenylboronsäure (**11c**, 183.91 mg, 1.46 mmol, 1.3 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (130 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 365 mg (0.9 mmol, 82%) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.27 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.51 – 7.47 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.22 – 3.96 (m), 3.96 – 3.82 (m, 1H), 3.28 – 2.87 (m, 2H), 2.21 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 2.11 – 2.04 (m, 1H), 2.03 – 1.82 (m, 1H), 1.46 – 1.19 (m, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.2, 155.6, 154.0, 153.9 – 153.7 (m), 132.9, 129.2, 128.7, 128.3, 97.6 – 97.3 (m), 79.2 – 78.4 (m), 52.1, 29.5 – 29.3 (m), 28.0, 23.4 – 23.2 (m).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 395.48 für C₂₁H₂₆N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 395.31.

5.4.25 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13d**)



13d

Nach AAV 1 wird **9** (1.5 g, 3.4 mmol, 1.0 eq.) mit 7-Azaindol-5-boronsäurepinakolester (**12d**, 1.1 g, 4.4 mmol, 1.3 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (390 mg, 0.3 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99,

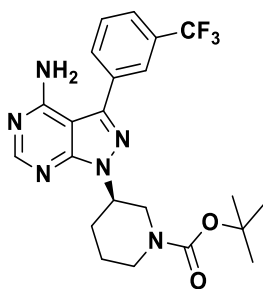
v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 1.1 g (2.6 mmol, 77 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.65 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.56 – 7.49 (m, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.57 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.76 – 4.66 (m, 1H), 4.13 – 4.01 (m, 2H), 3.84 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 3.45 (s, 1H), 2.31 – 2.20 (m, 1H), 2.14 (dd, *J* = 13.0, 4.1 Hz, 1H), 2.01 – 1.90 (m, 1H), 1.65 – 1.54 (m, 1H), 1.37 (s, 9H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.4, 155.7, 154.0, 153.9 – 153.8 (m), 148.4, 142.5, 127.9, 127.2, 120.9, 119.5, 100.5, 97.8, 79.2 – 78.6 (m), 59.8, 52.0, 28.0, 20.8, 14.1.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 435.22 für C₂₂H₂₇N₈O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 435.12.

5.4.26 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13i**)



13e

Nach AAV 1 wird **9** (1.5 g, 3.4 mmol, 1.0 eq.) mit 3-Trifluormethylphenylboronsäure (**11e**, 287 mg, 1.5 mmol, 1.3 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (130 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 411 mg (0.9 mmol, 79 %) des designierten Produkts erhalten.

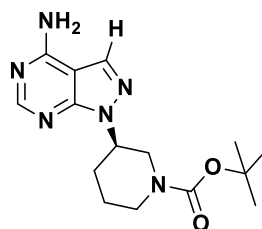
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.28 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.84 – 7.74 (m, 1H), 7.68 – 7.58 (m, 2H), 7.57 – 7.48 (m, 1H), 6.79 (s, 2H), 6.79 (s, 1H), 4.73 (ddd, *J* = 14.0 Hz, 9.6 Hz, 4.2 Hz, 1H), 4.10 – 3.99 (m, 2H), 3.86 – 3.78 (m, 1H), 3.45 (s, 1H), 2.32 – 2.20 (m, 1H), 2.16 – 2.09 (m, 1H), 2.00 – 1.91 (m, 1H), 1.65 – 1.51 (m, 1H), 1.35 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.3, 155.7, 154.3 – 154.1 (m), 153.9 – 153.7 (m), 133.8, 133.2, 132.3, 132.1, 131.5 (d, *J* = 9.7 Hz), 130.2, 128.8 (d, *J* = 11.8 Hz), 97.6 – 97.5 (m), 79.5 – 78.1 (m), 59.8, 52.1, 27.9, 20.8, 14.1.

¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆): δ -61.21 (s, *J* = 299.4 Hz).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 463.47 für C₂₂H₂₅F₃N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 463.24.

5.4.27 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (13f)

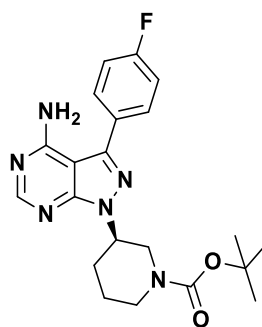


13f

Nach AAV 1 wird **9** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) mit Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (26 mg, 0.02 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 1 wird in diesem Ansatz keine Boronsäure oder –pinakolester verwendet. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 2/98, v/v)) aufgereinigt. Es werden 50 mg (0.2 mmol, 70 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.17 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.71 (bs, 2H), 4.61 – 4.53 (m, 1H), 4.15 – 3.71 (m, 2H), 3.52 – 3.39 (m, 0.5H), 3.22 – 3.05 (m, 0.5H), 3.01 – 2.81 (m, 1H), 2.20 – 2.09 (m, 1H), 2.06 – 1.99 (m, 1H), 1.95 – 1.80 (m, 1H), 1.60 – 1.49 (m, 1H), 1.38 (bs, 9H).

5.4.28 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (13g)



13g

Nach AAV 1 wird **9** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) mit 4-Fluorphenylboronsäure (**11g**, 48 mg, 0.4 mmol, 1.5 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (27 mg, 0.02 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v - 2/98, v/v)) aufgereinigt. Es jwerden 78 mg (0.2 mmol, 83 %) des designierten Produkts erhalten.

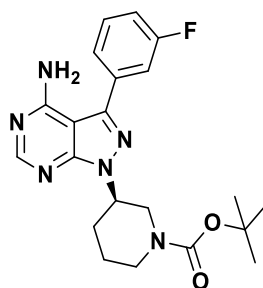
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.26 (s, 1H), 7.68 (dd, *J* = 8.4 Hz, 5.6 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.68 (s, 1H), 3.96 (t, *J* = 1.0 Hz, 2H), 3.35 – 2.90 (m, 2H), 2.24 (d, *J* = 10.0, 1H), 2.13 – 2.05 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.63 – 1.49 (m, 1H), 1.20 (bs, 9H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6): δ 163.7, 162.03, 158.7, 156.1, 154.5, 154.2, 143.5 – 142.9, 130.9 (d, $J = 8.6$ Hz), 129.8, 116.5 (d, $J = 21.7$ Hz), 97.9, 79.7 – 79.1, 70.4 – 70.1, 52.5, 29.8 – 28.8, 28.4.

^{19}F NMR (565 MHz, DMSO- d_6): δ -73.41 (s, $J = 299.4$ Hz).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 413.20 für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{FN}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 413.21.

5.4.29 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13h**)



13h

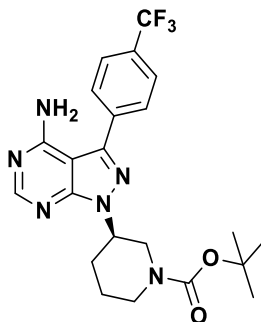
Nach AAV 1 wird **9** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) mit 3-Fluorphenylboronsäure (**11h**, 47 mg, 0.3 mmol, 1.5 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (27 mg, 0.02 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v - 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 59 mg (0.1 mmol, 61 %) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.40 (s, 1H), 7.56 – 7.40 (m, 3H), 7.24 – 7.14 (m, 1H), 5.68 (bs, 2H), 4.90 – 4.80 (m, 1H), 4.46 – 3.99 (m, 2H), 3.57 – 3.27 (m, 1H), 2.92 – 2.79 (m, 1H), 2.31 – 2.18 (m, 1H), 1.97 – 1.85 (m, 1H), 1.83 – 1.66 (m, 2H), 1.44 (bs, 9H).

^{19}F NMR (565 MHz, DMSO- d_6): δ -74.34 (s, $J = 293.7$ Hz).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 413.20958 für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_6\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 413.20993.

5.4.30 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13i**)



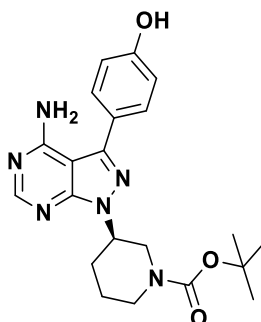
13i

Nach AAV 1 wird **9** (556 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) mit 4-Trifluorphenylboronsäurepinakolester (**12i**, 343 mg, 1.7 mmol, 1.5 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (131 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (MeOH/DCM (1/99, v/v - 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 432 mg (0.9 mmol, 82 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.28 (s, 1H), 7.62 (ddd, $J = 13.2$ Hz, 7.9 Hz, 4.3 Hz, 2H), 7.58 – 7.52 (m, 2H), 4.68 (d, $J = 38.6$ Hz, 1H), 4.24 – 3.45 (m, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.28 – 2.15 (m, 1H), 2.15 – 2.07 (m, 1H), 1.97 (dd, $J = 34.1$ Hz, 25.5 Hz, 1H), 1.56 (tt, $J = 20.6$ Hz, 10.3 Hz, 1H), 1.37 – 1.15 (m, 9H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.2, 155.7, 154.2, 154.1 – 153.6, 136.8, 133.1, 132.4, 132.0 (d, $J = 2.6$ Hz), 131.5, 131.4, 129.0, 128.8, 128.7, 128.5, 126.0, 125.2, 123.4, 97.5, 52.1, 29.0, 27.9, 22.2 – 22.0 (m).

5.4.31 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13j**)



13j

Nach AAV 1 wird **9** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) mit 4-Hydroxyphenylboronsäurepinakolester (**12j**, 74.2 mg, 0.3 mmol, 1.5 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (27 mg, 0.02 mmol,

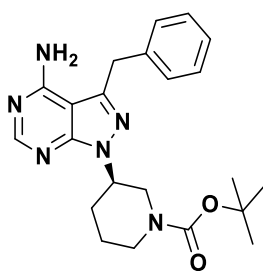
0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (MeOH/DCM (1/99, v/v - 6/94, v/v)) aufgereinigt. Es werden 88 mg (0.2 mmol, 91 %) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9.76 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.73 (bs, 2H), 4.70 – 4.61 (m, 1H), 4.19 – 3.66 (m, 2H), 3.60 – 3.16 (m, 1H), 3.09 – 2.90 (m, 1H), 2.27 – 2.14 (m, 1H), 2.11 – 2.03 (m, 1H), 2.01 – 1.84 (m, 1H), 1.60 – 1.49 (m, 1H), 1.32 (bs, 9H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 158.1, 158.0, 155.4, 153.8, 143.7, 129.6, 123.6, 115.9, 97.4, 78.9, 52.0, 47.3, 43.1, 29.1, 27.9, 23.7.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 411.21 für $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 411.21.

5.4.32 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-benzyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13k**)



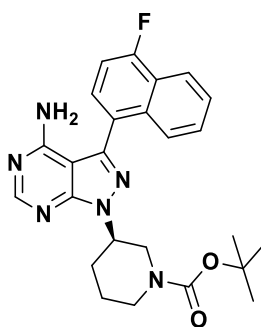
13k

In einem Mikrowellengefäß wird eine Suspension aus *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**9**, 100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) und einer Mischung aus Dioxan und VE-Wasser (2.5 mL, 4:1, v/v) wird mit Caesiumcarbonat (220 mg, 0.7 mmol, 3.0 eq.) versetzt. Anschließend wird Benzyl-2-boronsäurepinakolester (**12k**, 75 μL , 0.3 mmol, 1.5 eq.) hinzugegeben. Nun wird 5 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Anschließend wird [1,1'-*Bis*-(diphenylphosphino)ferrocen]-dichloropalladium(II) in Komplex mit Dichlormethan (17 mg, 0.02 mmol, 0.1 eq.) zugegeben und das Mikrowellengefäß verschlossen. Das geschlossene Gefäß wird für 20 min bei 145 °C unter Mikrowelleneinstrahlung gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Suspension über Celite[®] gefiltert und die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase wird gründlich mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie (MeOH/DCM (1/99, v/v - 2/98, v/v)) aufgereinigt. Es werden 58 mg (0.1 mmol, 63 %) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.34 (s, 1H), 7.34 – 7.23 (m, 4H), 7.20 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H), 4.62 (s, 1H), 4.45 – 4.36 (m, 2H), 3.85 (m, 3H), 2.93 (m, 1H), 2.22 – 2.09 (m, J = 20.4, 11.4 Hz, 1H), 2.09 – 1.99 (m, 1H), 1.92 – 1.80 (m, 1H), 1.53 (dt, J = 32.9 Hz, 16.3 Hz, 1H), 1.27 (bs, 9H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 409.23465 für $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 409.23448.

5.4.33 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(4-fluoronaphthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (13n)



13n

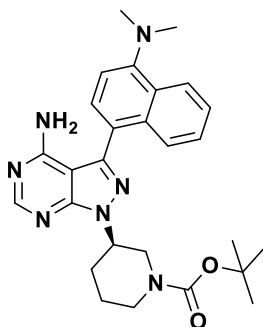
Nach AAV 1 wird **9** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) mit 4-Fluoronaphthyl-1-boronsäure (**11n**, 98 mg, 0.5 mmol, 1.3 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (39 mg, 0.03 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Abweichend zu AAV 1 wurde die Reaktionsmischung für 20 min bei 130 °C unter Mikrowelleneinstrahlung gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (MeOH/DCM (1/99, v/v - 2/98, v/v)) aufgereinigt. Es werden 121 mg (0.3 mmol, 77 %) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.41 (s, 1H), 8.24 (d, 1H), 7.92 (d, 1H), 7.62 (m, 4H), 7.48 (td, 1H), 7.30 (m, 1H), 5.24 (m, 2H), 4.94 (m, 1H), 4.41 (d, 1H), 4.14 (m, 1H), 2.86 (td, 1H), 2.27 (m, 2H), 1.74 (dd, 1H), 1.47 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 158.7, 157.8, 156.1, 154.8, 154.0, 142.0, 132.3, 132.2, 128.7, 128.6, 128.4, 127.2, 127.1, 126.3, 125.6, 124.4, 124.3, 121.2, 109.6, 109.4, 80.1, 53.1, 30.4, 28.6.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 463.53 für $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{FN}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 463.27.

5.4.34 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(4-(dimethylamino)naphthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13o**)



13o

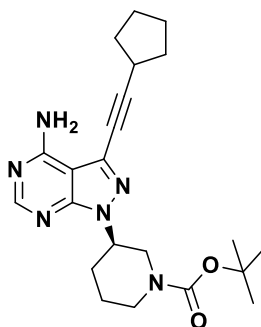
Nach AAV 1 wird **9** (700 mg, 1.5 mmol, 1.0 eq.) mit *N,N*-Dimethyl-1-naphthylamin-4-boronsäurepinakolester (**12o**, 676 mg, 2.1 mmol, 1.3 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (184 mg, 0.2 mmol, 0.1 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (5/95, v/v) + 5 mM CH₃COONH₄) aufgereinigt. Es werden 300 mg (0.6 mmol, 39 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.31 – 8.23 (m, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 1H), 7.50 (dd, *J* = 14.6 Hz, 7.3 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.97 – 3.60 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.29 – 2.06 (m, 2H), 1.49 – 1.19 (m, 13H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.3 – 155.5 (m), 132.8 – 132.4 (m), 128.7 – 128.1 (m), 127.0 – 126.4 (m), 125.7 – 124.9 (m), 124.4 113.6, 99.7 – 98.6 (m), 59.8, 52.2, 44.8, 28.0, 20.8, 14.1.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 488.61 für C₂₇H₃₃N₇O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 488.28.

5.4.35 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(cyclopentylethynyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13p**)



13p

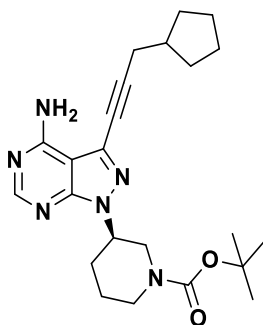
Eine Lösung aus *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**9**, 200 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq.) und Cyclopentylacetylen (**18**, 62 mg, 0.6 mmol, 1.4 eq.) in 4 mL getrocknetem THF wird mit Kupfer(I)-iodid (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq.) versetzt. Nun wird 5 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Anschließend wird Dichlorobis(triphenylphosphine)palladium(II) (16 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq.) und Triethylamin (314 μ L, 2.3 mmol, 5.0 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 12 h bei rt gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Suspension über Celite® gefiltert und die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase wird gründlich mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (20/80, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 144 mg (0.4 mmol, 78 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.23 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 7.62 (s, 2H), 4.56 (d, *J* = 52.2 Hz, 1H), 4.11 – 3.67 (m, 2H), 3.01 (dt, *J* = 14.6 Hz, 7.4 Hz, 2H), 2.16 – 2.07 (m, 1H), 2.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.91 (t, *J* = 14.9 Hz, 1H), 1.78 – 1.65 (m, 4H), 1.60 (dd, *J* = 10.5 Hz, 7.4 Hz, 2H), 1.53 (dd, *J* = 24.5 Hz, 11.4 Hz, 1H), 1.32 (dd, *J* = 55.7 Hz, 36.7 Hz, 11H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 157.8, 156.3, 153.7, 152.7, 133.1, 132.4, 132.0, 131.5, 131.4, 128.8, 128.7, 100.5, 99.8, 79.1 – 78.6 (m), 72.0, 52.3, 33.1, 30.1, 28.0, 24.7.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 411.25030 für C₂₂H₃₀O₂N₆ [M+H]⁺. Gefunden: 411.25017.

5.4.36 *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-(3-cyclopentylprop-1-yn-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**13q**)



13q

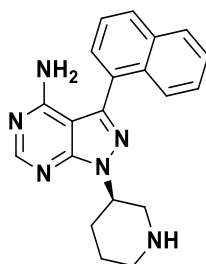
Eine Lösung aus *tert*-Butyl-(*R*)-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**9**, 100 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) und 2-Propin-1-ylcyclopentan (**19**, 41 μ L, 0.3 mmol, 1.4 eq.) in 4 mL getrocknetem THF wird mit Kupfer(I)-iodid (4 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq.) versetzt. Nun wird 5 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Anschließend wird Dichloro-*bis*-(triphenylphosphin)palladium (II) (7.9 mg, 0.01 mmol, 0.05 eq.) und Triethylamin (157 μ L, 1.1 mmol, 5.0 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 12 h bei rt gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Suspension über Celite[®] gefiltert und die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase wird gründlich mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H₂O/ACN (20/80, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 63 mg (0.2 mmol, 69 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.21 (s, 1H), 4.56 (d, *J* = 41.1 Hz, 1H), 4.11 – 3.63 (m, 1H), 3.22 – 2.83 (m, 1H), 2.54 (t, *J* = 10.0 Hz, 2H), 2.19 – 2.07 (m, 2H), 2.02 (dt, *J* = 21.0 Hz, 8.2 Hz, 1H), 1.88 (dd, *J* = 17.9 Hz, 11.0 Hz, 1H), 1.79 (td, *J* = 11.8 Hz, 7.0 Hz, 2H), 1.68 – 1.58 (m, 2H), 1.57 – 1.48 (m, 3H), 1.46 – 1.19 (m, 13H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.3, 156.8, 154.3 – 154.1 (m), 153.1, 132.5, 132.0, 131.9, 129.3, 129.2, 126.7 – 126.5 (m), 101.1, 96.1, 79.5 – 79.3 (m), 72.8, 52.8, 38.7, 32.1, 28.4, 25.22 – 25.18 (m), 25.1.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 425.27 für C₂₃H₃₃N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 425.27.

5.4.37 (*R*)-3-(Naphthyl)-1-(piperidin-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-amin (20a)

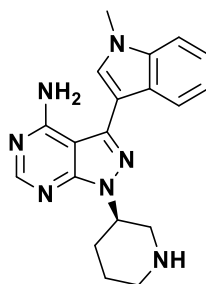


20a

Nach AAV 2 wird **13a** (389 mg, 0.9 mmol, 1.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 309 mg (0.9 mmol, >99 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 354.17 für C₂₀H₂₀N₆ [M+H]⁺. Gefunden: 345.27.

5.4.38 (*R*)-3-(1-Methyl-1*H*-indol-3-yl)-1-(piperidin-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-amin (20b)

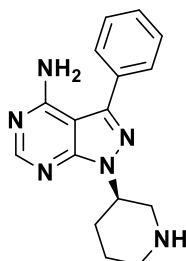


20b

Nach AAV 2 wird **13b** (223 mg, 0.5 mmol, 1.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 173 mg (0.5 mmol, >99 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 348.19 für C₁₉H₂₁N₇ [M+H]⁺. Gefunden: 348.27.

5.4.39 (*R*)-3-Phenyl-1-(piperidin-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-amin (20c)

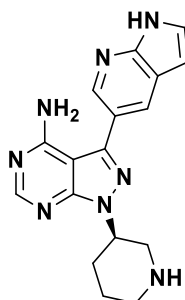


20c

Nach AAV 2 wird **13c** (301mg, 0.8 mmol, 1.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 223 mg (0.8 mmol, >99 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 295.16 für C₁₆H₁₈N₆ [M+H]⁺. Gefunden: 295.22.

5.4.40 (R)-1-(Piperidin-3-yl)-3-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-5-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amin (20d)

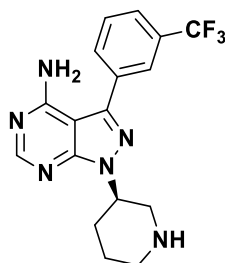


20d

Nach AAV 2 wird **13d** (1.10 g, 2.5 mmol, 1.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 666 mg (2.0 mmol, 79 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 335.17 für C₁₇H₁₈N₈ [M+H]⁺. Gefunden: 335.25.

5.4.41 (R)-1-(Piperidin-3-yl)-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amin (20e)

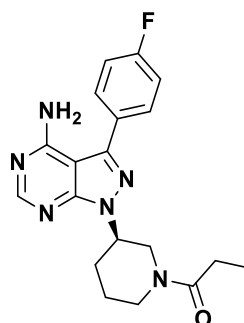


20e

Nach AAV 2 wird **13e** (373 mg, 0.8 mmol, 1.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 292 mg (0.8 mmol, >99 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 362.15 für C₁₇H₁₇F₃N₆ [M+H]⁺. Gefunden: 363.28.

5.4.42 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (23g)



23g

Nach AAV 2 wird **13g** (400 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das entschützte Amin **20g** (389 mg, 0.9 mmol, 1.0 eq.) direkt analog AAV 3 mit **22** (101 μ L, 1.2 mmol, 1.3 eq.) und DIPEA (1.87 mL, 11.0 mmol, 11.7 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels präparativer HPLC (ACN/H₂O (25/75, v/v + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 111 mg (0.3 mmol, 29 %) des designierten Produkts erhalten.

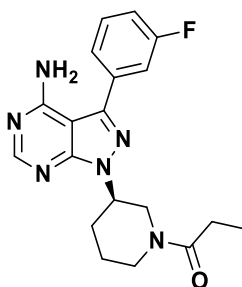
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.25 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 7.69 (ddd, J = 7.9 Hz, 5.3 Hz, 2.2 Hz, 2H), 7.37 (td, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz, 2H), 4.80 – 4.58 (m, 1H), 4.57 – 4.19 (m, 1H), 3.97 (ddd, J = 67.3 Hz, 27.7 Hz, 10.3 Hz, 1H), 3.54 (dt, J = 26.0 Hz, 13.0 Hz, 1H), 3.16 – 3.05 (m, 1H), 2.83 (t, J = 10.9 Hz, 1H), 2.41 – 2.19 (m, 2H), 2.13 – 2.03 (m, 1H), 1.94 – 1.82 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 0.98 (dt, J = 21.5 Hz, 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.4 (d, J = 19.2 Hz), 163.4, 161.4, 158.2, 155.8 (d, J = 9.0 Hz), 154.0 (d, J = 16.5 Hz), 142.9, 130.5 (d, J = 8.4 Hz), 129.3, 116.1 (d, J = 21.6 Hz), 97.4 (d, J = 10.4 Hz), 52.7, 52.1, 49.1, 45.4, 44.8, 29.5 (d, J = 32.8 Hz), 25.6, 24.7, 23.5, 9.5.

¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆): δ -73.43 (s, J = 299.4 Hz).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 369.18 für C₁₉H₂₂FN₆O [M+H]⁺. Gefunden: 369.18.

5.4.43 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (23h)



23h

Nach AAV 2 wird **13h** (239 mg, 0.6 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das entschützte Amin **20f** (181 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq.) direkt analog AAV 3 mit **22** (56 μ L, 0.6 mmol, 1.5 eq.) und DIPEA (249 μ L, 1.4 mmol, 3.3 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (MeOH/DCM (1/99, v/v – 4/96, v/v)) aufgereinigt. Es werden 36 mg (0.1 mmol, 23 %) des designierten Produkts erhalten.

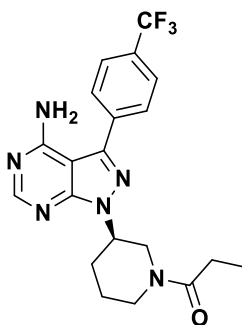
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.50 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.47 – 7.41 (m, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.17 (bs, 2H), 4.80 – 4.61 (m, 1H), 4.54 – 4.48 (m, 0.5H), 4.20 (d, $J = 13.0$ Hz, 0.5H), 4.05 – 3.99 (m, 0.5H), 3.87 (d, $J = 13.5$ Hz, 0.5H), 3.61 – 3.55 (m, 0.5H), 3.17 – 3.09 (m, 1H), 2.93 – 2.82 (m, 0.5H), 2.42 – 2.18 (m, 3H), 2.15 – 2.07 (m, 1H), 1.94 – 1.83 (m, 1H), 1.69 – 1.46 (m, 1H), 1.03 – 0.94 (m, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.4, 163.5, 161.5, 157.6, 155.1, 153.8, 142.7, 134.9, 131.1, 124.4, 115.6, 115.4, 97.3, 52.8, 52.3, 49.0, 45.3, 44.7, 41.1, 29.5, 29.3, 25.6, 24.5, 23.5, 9.4.

¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆): δ -73.70 (s, $J = 299.4$ Hz).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 369.18336 für C₁₉H₂₁ON₆F [M+H]⁺. Gefunden: 369.18390.

5.4.44 (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (23i)



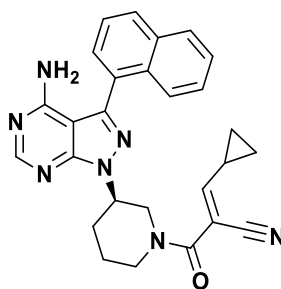
23i

Nach AAV 2 wird **13i** (246 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das entschützte Amin **20i** (102 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) direkt analog AAV 3 mit **22** (27 μL , 0.3 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (483 μL , 2.8 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (DCM/EtOAc (95/5, v/v + 1 % NH_3) aufgereinigt. Es werden 46 mg (0.1 mmol, 39 %) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (s, 1H), 7.88 – 7.77 (m, 2H), 4.08 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 3.90 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 3.70 – 3.60 (m, 1H), 3.31 (t, $J = 11.7$ Hz, 1H), 3.16 (t, $J = 12.0$ Hz, 1H), 2.77 (t, $J = 11.8$ Hz, 1H), 2.42 (dt, $J = 15.1$ Hz, 7.6 Hz, 1H), 2.45 – 2.36 (m, 1H), 2.03 – 1.92 (m, 1H), 1.65 (d, $J = 30.5$ Hz, 2H), 1.16 (dd, $J = 17.8$ Hz, 7.5 Hz, 2H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 419.18017 für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ und 441.16212 für $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_6\text{ONa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Gefunden: 419.17997 und 441.16178.

5.4.45 (*R,E*)-2-(3-(4-Amino-3-(naphthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carbonyl)-3-cyclopropylacrylonitril (**24a**)



24a

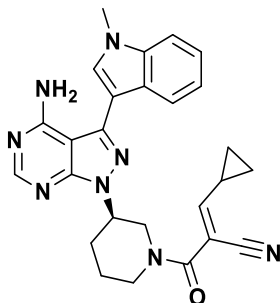
Nach AAV 5 wird **26a** (199 mg, 0.5 mmol, 1.00 eq.) mit Cyclopropancarboxaldehyd (**27**, 55 μL , 0.7 mmol, 1.50 eq.) und Piperidin (53 μL , 0.5 mmol, 1.10 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (DCM/(DCM/MeOH (90/10, v/v)) (75/25, v/v) + 1 % NH_3) aufgereinigt. Es werden 63 mg (0.1 mmol, 28%) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.31 (s, 1H), 8.06 (dd, $J = 17.6$ Hz, 7.0 Hz, 2H), 7.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.74 – 7.48 (m, 4H), 6.40 (dd, $J = 98.5$ Hz, 10.9 Hz, 3H), 4.92 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.93 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.29 (s, 1H), 2.29 (d, $J = 42.2$ Hz, 2H), 2.13 – 1.95 (m, 1H), 1.90 – 1.78 (m, 1H), 1.72 (s, 1H), 1.19 – 1.04 (m, 2H), 0.79 (d, $J = 41.0$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 162.39, 161.8, 160.8 – 160.6 (m), 159.1 – 158.8 (m), 157.7, 155.5, 153.5, 141.8, 133.3, 131.1, 129.7, 129.0, 128.1, 128.0, 126.6, 126.0, 125.3, 125.1, 115.2, 106.2, 99.2, 51.9, 28.8, 23.2 – 23.0 (m), 14.7, 13.6 – 13.5 (m), 9.4.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 463.2121 für $C_{27}H_{25}N_7O$ $[M+H]^+$. Gefunden: 464.2195.

5.4.46 (*R,E*)-2-(3-(4-Amino-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carbonyl)-3-cyclopropylacrylonitril (24b**)**



24b

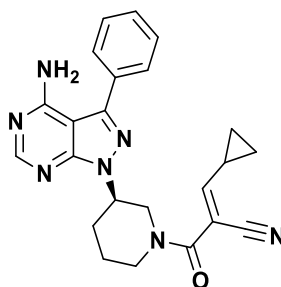
Nach AAV 5 wird **26b** (112 mg, 0.3 mmol, 1.00 eq.) mit Cyclopropancarboxaldehyd (**27**, 31 μ L, 0.4 mmol, 1.50 eq.) und Piperidin (29 μ L, 0.3 mmol, 1.10 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (DCM/(DCM/MeOH (90/10, v/v)) (75/25, v/v) + 1 % NH_3) aufgereinigt. Es werden 35 mg (0.1 mmol, 28%) des designierten Produkts erhalten.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.25 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.27 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.76 (s, 2H), 6.48 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.88 – 4.80 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.64 (s, 1H), 2.33 (dt, $J = 11.0$ Hz, 7.0 Hz, 1H), 2.24 – 2.15 (m, 1H), 2.10 – 1.98 (m, 1H), 1.84 (dtd, $J = 11.8$ Hz, 7.8 Hz, 4.1 Hz, 1H), 1.71 (dt, $J = 14.5$ Hz, 10.7 Hz, 1H), 1.16 – 1.06 (m, 2H), 0.86 – 0.68 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 162.3, 161.7, 160.7, 159.0, 158.1, 155.2, 153.5, 138.3, 136.7, 129.3, 126.0, 121.9, 120.1, 119.7, 115.2, 109.7, 106.7, 106.2, 105.6, 97.9, 51.7, 32.4, 28.8, 23.2, 14.7, 13.6, 9.3 (d, $J = 13.5$ Hz).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 466.2230 für $C_{26}H_{26}N_8O$ $[M+H]^+$. Gefunden: 467.2300.

5.4.47 (*R,E*)-2-(3-(4-Amino-3-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carbonyl)-3-cyclopropylacrylonitril (**24c**)



24c

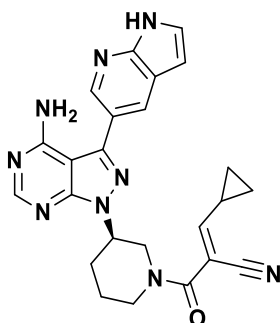
Nach AAV 5 wird **26c** (223 mg, 0.6 mmol, 1.00 eq.) mit Cyclopropancarboxaldehyd (**27**, 71 μL , 0.9 mmol, 1.50 eq.) und Piperidin (67 μL , 0.7 mmol, 1.10 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (DCM/(DCM/MeOH (90/10, v/v)) (75/25, v/v) + 1 % NH_3) aufgereinigt. Es werden 113 mg (0.3 mmol, 44%) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.27 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.56 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.53 – 7.49 (m, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.50 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.88 – 4.79 (m, 1H), 4.19 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.63 (s, 1H), 3.35 – 3.25 (m, 1H), 2.31 (dd, $J = 19.8$ Hz, 9.8 Hz, 1H), 2.18 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 2.01 (dd, $J = 9.3, 4.1$ Hz, 1H), 1.85 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 1.69 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 1.13 (t, $J = 17.5$ Hz, 2H), 0.83 (d, $J = 36.2$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 162.5 – 162.3 (m), 161.8 – 161.6 (m), 157.9, 155.3, 154.0 – 153.78 (m), 143.6 – 143.4 (m), 132.7, 128.8, 128.4, 128.0, 115.2 – 115.1 (m), 106.2, 97.5 – 97.3 (m), 51.8, 28.7, 23.3 – 22.9 (m), 14.7, 9.4.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 413.1964 für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 414.2034.

5.4.48 (*R,E*)-2-(3-(4-Amino-3-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carbonyl)-3-cyclopropylacrylonitril (**24d**)

**24d**

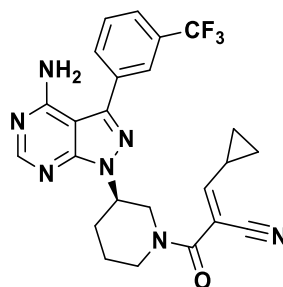
Nach AAV 5 wird **26d** (113 mg, 0.3 mmol, 1.00 eq.) mit Cyclopropancarboxaldehyd (**27**, 32 μ L, 0.4 mmol, 1.50 eq.) und Piperidin (31 μ L, 0.3 mmol, 1.10 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (DCM/(DCM/MeOH (90/10, v/v)) (75/25, v/v) + 1 % NH₃) aufgereinigt. Es werden 38 mg (0.1 mmol, 30%) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.69 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.5, 1.9 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.57 – 7.51 (m, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.59 – 6.54 (m, 1H), 6.50 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.85 (dt, *J* = 13.4 Hz, 4.5 Hz, 1H), 4.20 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 15.6 Hz, 10.8 Hz, 1H), 3.66 (s, 1H), 3.30 (dd, *J* = 23.2 Hz, 12.7 Hz, 1H), 2.33 (ddd, *J* = 13.9 Hz, 12.2 Hz, 4.1 Hz, 1H), 2.23 – 2.14 (m, 1H), 2.07 – 1.98 (m, 1H), 1.85 (dd, *J* = 7.0 Hz, 3.8 Hz, 1H), 1.69 (dt, *J* = 14.1 Hz, 10.5 Hz, 1H), 1.18 – 1.09 (m, 2H), 0.90 – 0.74 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.5 – 162.3 (m), 161.7, 158.1, 155.4, 153.9 – 153.8 (m), 148.3, 142.5 – 142.4 (m), 142.1, 127.6, 126.9, 120.7 – 120.6 (m), 119.3, 115.2, 106.2, 100.2, 97.7, 51.8, 28.8 – 28.7 (m), 23.2 – 23.0 (m), 14.7, 9.4.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 453.2026 für C₂₄H₂₃N₉O [M+H]⁺. Gefunden: 454.2095.

5.4.49 (*R,E*)-2-(3-(4-Amino-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carbonyl)-3-cyclopropylacrylonitril (24e**)**



24e

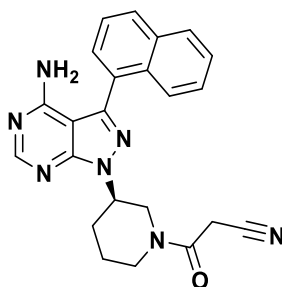
Nach AAV 5 wird **26e** (182 mg, 0.4 mmol, 1.00 eq.) mit Cyclopropancarboxaldehyd (**26**, 48 μ L, 0.6 mmol, 1.50 eq.) und Piperidin (46 μ L, 0.5 mmol, 1.10 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (DCM/(DCM/MeOH (90/10, v/v)) (75/25, v/v) + 1 % NH₃) aufgereinigt. Es werden 34 mg (0.1 mmol, 17%) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz DMSO-*d*₆): δ 8.29 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.80 (dt, *J* = 15.5 Hz, 7.6 Hz, 2H), 6.85 (s, 2H), 6.51 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.86 (td, *J* = 9.3 Hz, 4.6 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 3.91 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.37 – 3.25 (m, 1H), 2.38 – 2.25 (m, 1H), 2.19 (dd, *J* = 8.5 Hz, 4.1 Hz, 1H), 2.04 – 1.96 (m, 1H), 1.91 – 1.80 (m, 1H), 1.77 – 1.63 (m, 1H), 1.17 (dt, *J* = 13.5 Hz, 6.5 Hz, 2H), 0.91 – 0.74 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.0 – 161.0 (m), 158.1 – 157.6 (m), 155.9 – 155.1 (m), 133.9 – 133.2 (m), 132.1 – 131.5 (m), 129.9, 125.3 – 124.6 (m), 124.6 – 124.1 (m), 115.4 – 115.0 (m), 106.4 – 106.1 (m), 52.5 – 51.5 (m), 29.2 – 28.3 (m), 24.1 – 22.6 (m), 14.7, 9.3.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 481.1838 für C₂₄H₂₂F₃N₇O [M+H]⁺. Gefunden: 482.1904.

5.4.50 (*R*)-3-(3-(4-Amino-3-(naphthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-3-oxopropannitril (**26a**)

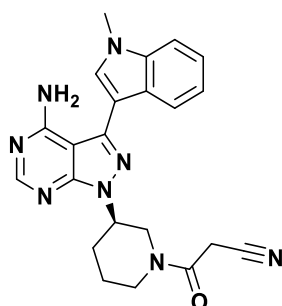


26a

Nach AAV 4 wird **20a** (301 mg, 0.9 mmol, 1.00 eq.) mit 2-Cyanoessigsäure (**25**, 114 mg, 1.3 mmol, 1.50 eq.), HOBt (177 mg, 1.3 mmol, 1.50 eq.), DIPEA (768 μ L, 4.4 mmol, 5.00 eq.) und EDC·HCl (256 mg, 1.3 mmol, 1.50 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 212 mg (0.5 mmol, 59%) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 412.18 für C₂₃H₂₁N₇O [M+H]⁺. Gefunden: 412.44.

5.4.51 (*R*)-3-(3-(4-Amino-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-3-oxopropannitril (**26b**)

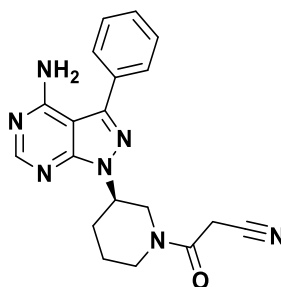


26b

Nach AAV 4 wird **20b** (175 mg, 0.5 mmol, 1.00 eq.) mit 2-Cyanoessigsäure (**25**, 66 mg, 0.8 mmol, 1.50 eq.), HOBt (102 mg, 0.8 mmol, 1.50 eq.), DIPEA (443 μ L, 2.5 mmol, 5.00 eq.) und EDC·HCl (148 mg, 0.8 mmol, 1.50 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 129 mg (0.3 mmol, 62%) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 415.20 für C₂₂H₂₂N₈O [M+H]⁺. Gefunden: 415.41.

5.4.52 (*R*)-3-(3-(4-Amino-3-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-3-oxopropannitril (**26c**)

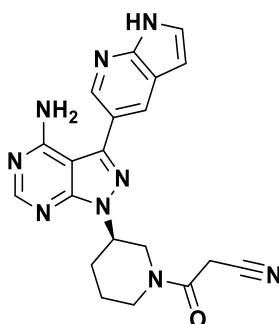


26c

Nach AAV 4 wird **20c** (250 mg, 0.9 mmol, 1.00 eq.) mit 2-Cyanoessigsäure (**25**, 111 mg, 1.3 mmol, 1.50 eq.), HOBt (172 mg, 1.3 mmol, 1.50 eq.), DIPEA (748 μ L, 4.3 mmol, 5.00 eq.) und EDC·HCl (250 mg, 1.3 mmol, 1.50 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 243 mg (0.7 mmol, 79%) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 362.17 für C₁₉H₁₉N₇O [M+H]⁺. Gefunden: 362.36.

5.4.53 (*R*)-3-(3-(4-Amino-3-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-3-oxopropannitril (**26d**)

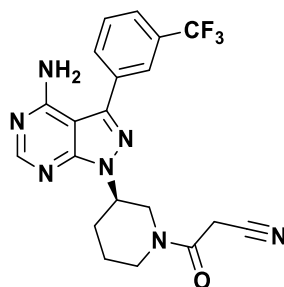


26d

Nach AAV 4 wird **20d** (422 mg, 1.3 mmol, 1.00 eq.) mit 2-Cyanoessigsäure (**25**, 164 mg, 1.9 mmol, 1.50 eq.), HOBt (256 mg, 1.9 mmol, 1.50 eq.), DIPEA (1.11 mL, 6.3 mmol, 5.00 eq.) und EDC·HCl (370 mg, 1.9 mmol, 1.50 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 72 mg (0.2 mmol, 14%) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 402.17 für C₂₀H₁₉N₉O [M+H]⁺. Gefunden: 402.46.

5.4.54 (*R*)-3-(3-(4-Amino-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-3-oxopropannitril (**26e**)

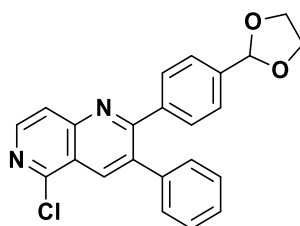


26e

Nach AAV 4 wird **20e** (288 mg, 0.8 mmol, 1.00 eq.) mit 2-Cyanoessigsäure (**25**, 103 mg, 1.2 mmol, 1.50 eq.), HOBt (161 mg, 1.2 mmol, 1.50 eq.), DIPEA (698 μ L, 4.0 mmol, 5.00 eq.) und EDC·HCl (233 mg, 1.2 mmol, 1.50 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 203 mg (0.5 mmol, 59%) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 430.15 für $C_{20}H_{18}F_3N_7O$ [M+H]⁺. Gefunden: 430.38.

5.4.55 6-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-1-chloro-7-phenylisochinolin (**69**)



69

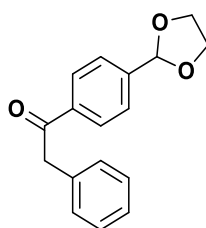
Durch eine Lösung aus **71** (2.00 g, 12.8 mmol, 1.00 eq.), **72** (3.50 g, 12.9 mmol, 1.01 eq) in trockenem Dioxan wird für 5 min ein mäßiger Argonstrom geleitet. Anschließend wird Natrium-*tert*-butanolat (3.10 g, 31.9 mmol, 2.50 eq.) zugegeben und die Reaktion mit einem mit Calciumchlorid gefüllten Trockenrohr versehen. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei rt gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc, 60/40, v/v) aufgereinigt. Es werden 785 mg (2.0 mmol, 16 %) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.57 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 5H), 7.34 – 7.29 (m, 2H), 5.71 (s, 1H), 4.04 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.94 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 162.66, 150.26, 145.73, 139.60, 138.79, 138.35, 136.91, 135.47, 129.88, 129.59, 128.62, 128.08, 126.26, 122.18, 121.04, 102.41, 64.93.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 389.85 für $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 389.40.

5.4.56 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-phenylethan-1-on (70)



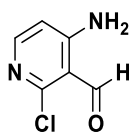
70

Durch eine Lösung aus **72** (4.00 g, 22.8 mmol, 1.00 eq.) in trockenem THF wird 5 min ein mäßiger Argonstrom geleitet. Die Reaktionsmischung wird auf -4 °C gekühlt und tropfenweise mit Benzylmagnesiumchlorid (40 mL, 79.9 mmol, 3.50 eq.) versetzt. Nach erfolgreicher Zugabe wird die Reaktion bei gleichbleibender Temperatur 1 h gerührt. Nun wird die Reaktionsmischung langsam auf rt erwärmt und 4 h gerührt. Die Reaktion wird anschließend in ges. Ammoniumchlorid-Lösung gequench und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc, 70/30, v/v) aufgereinigt. Es werden 3.89 g (14.5 mmol, 64 %) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8,07 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 7,58 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 7,21-7,33 (m, 5H), 5,82 (s, 1H), 4,4 (s, 2H), 4,01-4,07 (m, 2H), 3,95-4,01 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 197.88, 143.52, 137.34, 135.5, 130.18, 128.86 (2), 127.31, 126.98, 102.52, 65.42, 45.28.

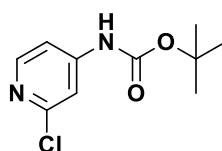
LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 269.11 für $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 269.17.

5.4.57 4-Amino-2-chloronicotinaldehyd (71)

71

Nach AAV 7 wird **75** (4.7 g, 18.3 mmol, 1.0 eq.) und HCl in Dioxan (4 N, 25 mL) umgesetzt. Abweichend von AAV 7 wird die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit VE-Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 2.3 g (14.7 mmol, 80 %) als weißliches Pulver erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 157.01 für $C_6H_5ClN_2O$ $[M+H]^+$. Gefunden: 157.04.

5.4.58 tert-Butyl-(2-chloropyridin-4-yl)carbammat (74)

74

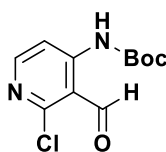
Eine Lösung aus **73** (25 g, 194.46 mmol, 1.00 eq.), DMAP (7.1 g, 58.12 mmol, 0.30 eq.) und Triethylamin (67 mL, 486.15 mmol, 2.50 eq.) in 200 mL DCM werden langsam mit Di-*tert*-butyldicarbonat (44.7 mL, 194.46 mmol, 1.00 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei rt gerührt. Die Reaktion wird anschließend in ges. Ammoniumchlorid-Lösung gequenchet und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc, 80/20, v/v) aufgereinigt. Es werden 23.66 g (103.4 mmol, 53 %) des designierten Produkts erhalten.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.12 (s, 1H), 8.17 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 7.36 (dd, 1H, $J = 5.7$ Hz, 1.6 Hz), 1.48 (s, 9H).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 152.63, 151.37, 150.55, 149.52, 112.16, 111.69, 81.22, 28.33.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 229.07 für $C_{10}H_{13}ClN_2O_2$ $[M+H]^+$. Gefunden: 228.85.

5.4.59 *tert*-Butyl-(2-chloro-3-formylpyridin-4-yl)carbammat (75)



75

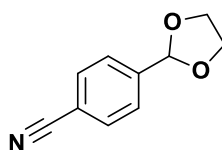
Eine Lösung aus **74** (4.00 g, 17.49 mmol, 1.00 eq.) in trockenem THF wird in einem Aceton-Trockeneisbad auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nun wird ein mäßiger Argonstrom durch die Reaktionslösung geleitet. *tert*-Butyllithium (29.84 mL, 50.73 mmol, 2.90 eq.) wird sehr langsam (ca. 1 Tropfen alle 3 sek) zugegeben. Anschließend wird die Reaktion für 2 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Bei gleichbleibender Temperatur wird DMF (8.13 mL, 104.95 mmol, 6.00 eq.) hinzugeben und die Reaktion unter ständigem Rühren über Nacht auf rt erwärmt. Die Reaktion wird anschließend in ges. Ammoniumchlorid-Lösung gequenscht und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc, 75/25, v/v) aufgereinigt. Es werden 3.88 g (15.1 mmol, 86 %) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.93 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 8.42 (d, 1H, $J = 6\text{ Hz}$), 8.23 (d, 1H, $J = 6\text{ Hz}$), 1.51 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ 194.78, 155.75, 154.43, 151.59, 113.65, 112.35, 82.85, 28.11.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 256.69 für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 256.90.

5.4.60 4-(1,3-Dioxolan-2-yl)benzonitril (76)



76

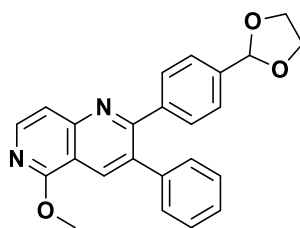
Eine Suspension aus **72** (30.0 g, 228.8 mmol, 1.00 eq.), Ethylenglykol (51.63 mL, 915.1 mmol, 4.00 eq) und *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (1.31 g, 6.86 mmol, 0.03 eq.) in 300 mL Toluol wird über Nacht in einem Wasserabscheider refluxiert. Die Reaktion wird anschließend in ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gequenscht und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt. Die entstehende ölige Flüssigkeit wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Kristallisation stengelassen. Anschließend

wird das überschüssige Lösemittel im Hochvakuum entfernt. Es werden 30.4 g (173.5 mmol, 76 %) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.85 (s, 1H), 4.13 – 4.02 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 143.26, 132.37, 127.32, 118.73, 113.10, 102.61, 65.60.

5.4.61 6-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-1-methoxy-7-phenylisochinolin (83)



83

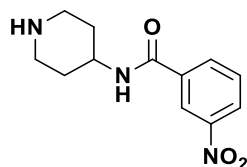
Eine Lösung aus *tert*-Butyl-(2-chloro-3-formylpyridin-4-yl)carbammat (**75**, 4.00 g, 15.6 mmol, 1.00 eq.) in 60 mL trockenem Methanol wird mit 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-phenylethan-1-on (**70**, 4.31 g, 16.1 mmol, 1.03 eq.) versetzt. Anschließend wird 5 min ein mäßiger Argonstrom durch die Suspension geleitet. Nun wird Natriummethoxid (30 %ig in Methanol, 4.72 mL, 23.4 mmol, 1.50 eq.) tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion wird für 4 h bei 65 °C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile werden am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in Essigsäureethylester aufgenommen und mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Flash Chromatographie (PE/EtOAc, 80/20, v/v) aufgereinigt. Es werden 3.80 g (9.9 mmol, 63 %) als weiß-gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.41 (s, 1H), 8.27 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.43 – 7.38 (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 5H), 7.26 (dd, $J = 6.9$ Hz, 2.5 Hz, 2H), 5.71 (s, 1H), 4.10 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H), 4.04 (dd, $J = 8.7$ Hz, 5.1 Hz, 2H), 3.95 – 3.90 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 161.72, 161.10, 151.51, 144.42, 140.65, 139.35, 138.77, 135.33, 134.18, 130.22, 129.94, 128.96, 128.11, 126.60, 116.28, 113.53, 102.91, 65.33, 54.60.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 385.43 für $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 385.46.

5.4.62 3-Nitro-*N*-(piperidin-4-yl)benzamid (**84b**)



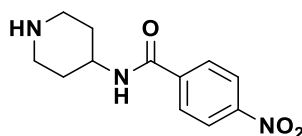
84b

Nach AAV 7 wird **87b** (2.00 g, 5.7 mmol, 1.0 eq.) und HCl in Dioxan (4 N, 32 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 1.01 g (5.4 mmol, 94 %) als weißliches Pulver erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.71 – 8.65 (m, 1H), 8.42 – 8.36 (m, 1H), 8.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.77 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.90 – 3.80 (m, 1H), 3.49 – 3.18 (m, 1H), 2.95 (t, J = 17.7 Hz, 1H), 2.53 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 1.76 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 1.43 (qd, J = 12.0 Hz, 3.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.21, 147.73, 136.11, 133.90, 130.04, 125.77, 122.03, 47.75, 45.21, 32.70.

5.4.63 4-Nitro-*N*-(piperidin-4-yl)benzamid (**84c**)

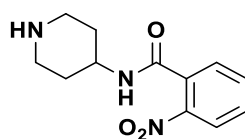


84c

Nach AAV 7 wird **87c** (2.84 g, 8.1 mmol, 1.0 eq.) und HCl in Dioxan (4 N, 32 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 1.01 g (7.2 mmol, 89 %) als weißliches Pulver erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.62 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.34 – 8.27 (m, 2H), 8.10 – 8.04 (m, 2H), 3.87 – 3.76 (m, 1H), 2.97 (t, J = 13.0 Hz, 2H), 2.20 (s, 1H), 1.74 (dd, J = 11.8 Hz, 2.2 Hz, 2H), 1.41 (tt, J = 12.0 Hz, 6.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.74, 148.89, 140.47, 128.85, 123.44, 47.84, 45.29, 32.82.

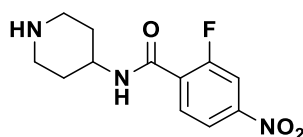
5.4.64 2-Nitro-*N*-(piperidin-4-yl)benzamid (84d)

84d

Nach AAV 7 wird **87d** (2.00 g, 5.7 mmol, 1.0 eq.) und HCl in Dioxan (4 N, 32 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 1.41 g (5.6 mmol, 98 %) als weißliches Pulver erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.67 – 8.56 (m, 1H), 8.05 (dd, J = 8.1 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.78 (td, J = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.68 (td, J = 8.1 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1H), 4.36 (s, 1H), 3.87 – 3.77 (m, 1H), 3.02 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 2.64 (t, J = 11.3 Hz, 2H), 1.82 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 1.43 (dd, J = 20.5 Hz, 10.2 Hz, 2H).

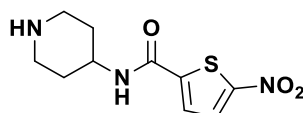
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.84, 146.83, 133.74, 132.96, 130.54, 129.19, 124.06, 66.39, 46.34, 44.02, 31.10.

5.4.65 2-Fluoro-4-nitro-*N*-(piperidin-4-yl)benzamid (84e)

84e

Nach AAV 7 wird **87e** (1.00 g, 2.7 mmol, 1.0 eq.) und HCl in Dioxan (4 N, 20 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 0.63 g (2.3 mmol, 86 %) als weißliches Pulver erhalten.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.39, 159.15, 157.48, 148.88, 148.82, 131.27, 131.16, 131.12 – 130.76 (m), 119.73 – 119.26 (m), 112.02, 111.84, 66.35, 47.55, 44.97, 32.71.

5.4.66 5-Nitro-*N*-(piperidin-4-yl)thiophen-2-carboxamid (84f)

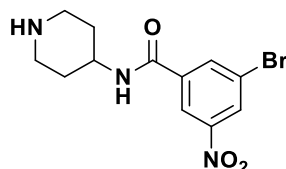
84f

Nach AAV 7 wird **87f** (4.30 g, 12.1 mmol, 1.0 eq.) und HCl in Dioxan (4 N, 80 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 2.05 g (8.0 mmol, 66 %) als weißliches Pulver erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.85 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.82 – 3.72 (m, 1H), 2.95 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 2.47 (dd, $J = 12.2$ Hz, 2.0 Hz, 2H), 1.73 (dd, $J = 11.8$ Hz, 2.1 Hz, 2H), 1.39 (qd, $J = 12.1$ Hz, 4.0 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ 158.53, 152.81, 146.96, 130.25, 127.28, 48.03, 45.19, 32.73.

5.4.67 3-Bromo-5-nitro-*N*-(piperidin-4-yl)benzamid (84g)

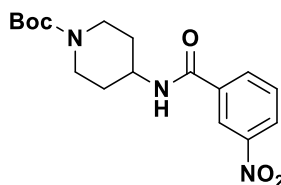


84g

Nach AAV 7 wird **87g** (134 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) und HCl in Dioxan (4 N, 10 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 101 mg (0.3 mmol, 99 %) als weißliches Pulver erhalten.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ 161.76, 148.61, 137.50, 136.11, 128.39, 122.14, 121.43, 48.06, 45.25, 32.80.

5.4.68 *tert*-Butyl-4-(3-nitrobenzamido)piperidin-1-carboxylat (87b)



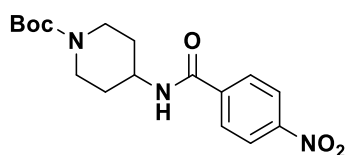
87b

Nach AAV 6 wird **86b** (331 mg, 2.0 mmol, 1.00 eq.) mit **85** (456 mg, 2.0 mmol, 1.00 eq.), HATU (650 mg, 2.0 mmol, 1.00 eq.) und 2,6-Lutidin (690 μL , 5.9 mmol, 3.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 528 mg (1.5 mmol, 76%) des designierten Produkts erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.71 – 8.67 (m, $J = 1.9$ Hz, 2H), 8.38 (ddd, $J = 8.2$ Hz, 2.3 Hz, 1.0 Hz, 1H), 8.31 – 8.27 (m, 1H), 4.00 (tdd, $J = 23.8$ Hz, 12.2 Hz, 8.1 Hz, 2H), 2.84 (s, 1H), 1.86 – 1.75 (m, 1H), 1.46 – 1.37 (m, 11H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ 163.80, 154.38, 148.19, 136.34, 134.32, 130.55, 126.33, 122.42, 79.14, 47.32, 43.84 – 43.03 (m), 43.03 – 42.35 (m), 31.68, 28.55.

5.4.69 *tert*-Butyl-4-(4-nitrobenzamido)piperidin-1-carboxylat (**87c**)



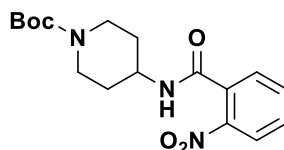
87c

Nach AAV 6 wird **86c** (100 mg, 0.6 mmol, 1.00 eq.) mit **85** (138 mg, 0.6 mmol, 1.00 eq.), HATU (196 mg, 0.6 mmol, 1.00 eq.) und 2,6-Lutidin (208 μ L, 1.8 mmol, 3.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 140 mg (0.4 mmol, 67%) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8.63 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.33 – 8.29 (m, 2H), 8.08 – 8.05 (m, 2H), 3.98 (tdd, J = 23.5 Hz, 12.1 Hz, 8.0 Hz, 3H), 2.81 (t, J = 48.0 Hz, 2H), 1.84 – 1.75 (m, 2H), 1.45 – 1.36 (m, 12H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6): δ 163.92, 153.94, 148.97, 140.22, 128.83, 123.50, 78.70, 46.85, 43.01, 42.11, 31.24, 28.10.

5.4.70 *tert*-Butyl-4-(2-nitrobenzamido)piperidin-1-carboxylat (**87d**)



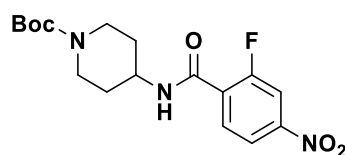
87d

Nach AAV 6 wird **86d** (3.00 g, 18.0 mmol, 1.00 eq.) mit **85** (4.14 g, 18.0 mmol, 1.00 eq.), HATU (5.89 g, 0.6 mmol, 1.00 eq.) und 2,6-Lutidin (6.25 mL, 53.9 mmol, 3.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 3.66 g (10.5 mmol, 58%) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.05 (dd, J = 8.1 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.79 (td, J = 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.71 – 7.66 (m, 1H), 7.58 (dd, J = 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1H), 3.95 – 3.80 (m, 3H), 2.90 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 1.84 – 1.77 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.38 – 1.27 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 164.88, 153.94, 146.79, 133.78, 132.84, 130.60, 129.15, 124.10, 78.69, 46.26, 43.26 – 42.41 (m), 42.31 – 41.36 (m), 30.84, 28.10.

5.4.71 *tert*-Butyl-4-(2-fluoro-4-nitrobenzamido)piperidin-1-carboxylat (87e)



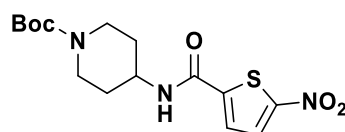
87e

Nach AAV 6 wird **86e** (1.50 g, 8.1 mmol, 1.00 eq.) mit **85** (1.87 g, 8.1 mmol, 1.00 eq.), HATU (2.66 g, 8.1 mmol, 1.00 eq.) und 2,6-Lutidin (2.82 mL, 24.3 mmol, 3.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 1.80 g (4.9 mmol, 60%) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.65 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.21 (dd, $J = 9.6$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 8.13 (dd, $J = 8.4$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 8.4$ Hz, 7.0 Hz, 1H), 3.95 (tdd, $J = 19.2$ Hz, 10.1 Hz, 5.9 Hz, 1H), 3.87 (d, $J = 10.9$ Hz, 2H), 2.89 (s, 2H), 1.86 – 1.75 (m, 2H), 1.44 – 1.31 (m, 11H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.74, 159.37, 157.36, 153.94, 148.99 (d, $J = 8.8$ Hz), 131.02 (d, $J = 3.6$ Hz), 130.85, 119.64 (d, $J = 3.6$ Hz), 112.15, 111.93, 78.73, 46.56, 43.06 – 42.36 (m), 42.36 – 41.69 (m), 31.06, 28.10.

5.4.72 *tert*-Butyl-4-(5-nitrothiophen-2-carboxamido)piperidin-1-carboxylat (87f)



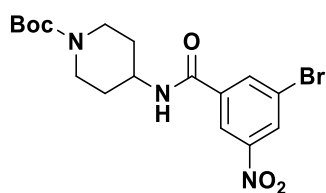
87f

Nach AAV 6 wird **86f** (1.50 g, 8.7 mmol, 1.00 eq.) mit **85** (2.00 g, 8.7 mmol, 1.00 eq.), HATU (2.84 g, 8.7 mmol, 1.00 eq.) und 2,6-Lutidin (3.02 mL, 26.0 mmol, 3.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 2.03 g (5.7 mmol, 66%) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.12 – 3.99 (m, 3H), 2.85 – 2.76 (m, 2H), 1.94 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 1.38 (s, 11H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 159.49, 154.81, 154.28, 145.18, 128.30, 126.21, 80.15, 47.90, 42.85, 32.07, 28.54.

5.4.73 *tert*-Butyl-4-(3-bromo-5-nitrobenzamido)piperidin-1-carboxylat (87g)



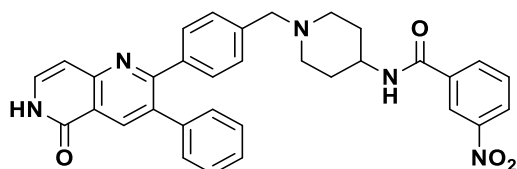
87g

Nach AAV 6 wird **86g** (100 mg, 0.4 mmol, 1.00 eq.) mit **85** (93.6 mg, 0.4 mmol, 1.00 eq.), HATU (133 mg, 0.4 mmol, 1.00 eq.) und 2,6-Lutidin (142 μ L, 1.2 mmol, 3.00 eq.) umgesetzt. Nach Aufarbeitung werden 130 mg (0.3 mmol, 77%) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.74 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.65 – 8.64 (m, 1H), 8.54 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 8.47 (t, J = 1.4 Hz, 1H), 3.99 (tdd, J = 26.6, 13.7, 9.5 Hz, 3H), 2.86 (d, J = 38.5 Hz, 2H), 1.81 (dd, J = 12.5, 2.6 Hz, 2H), 1.41 (s, 11H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 161.93 (d, J = 6.6 Hz), 153.88 (d, J = 18.5 Hz), 148.59 (d, J = 7.4 Hz), 137.27 (d, J = 9.5 Hz), 136.06 (d, J = 13.1 Hz), 128.49, 122.18, 121.38, 78.71, 47.05, 42.95, 42.58 – 41.81 (m), 31.20, 28.10.

5.4.74 3-Nitro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (88b)



88b

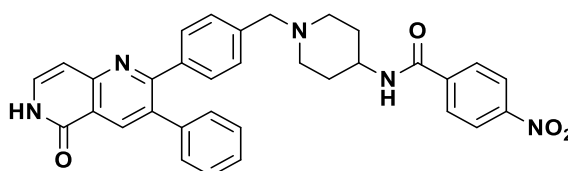
Nach AAV 8 wird **4** (400 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq.) mit **84b** (397 mg, 1.6 mmol, 1.3 eq.) und Ameisensäure (185 μ L, 4.9 mmol, 4.00 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 8 wurde die Reaktion für 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung gerührt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH_3))/DCM (40/60, v/v)) aufgereinigt. Es werden 476 mg (0.9 mmol, 69 %) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.62 (s, 1H), 8.68 (d, J = 7.4 Hz, 3H), 8.37 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 8.28 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 7.0 Hz, 6H), 7.23 (dd, J = 10.4 Hz, 6.1 Hz, 5H), 6.68 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 3.84 – 3.71 (m, 2H), 3.50 – 3.37 (m, 4H), 2.80 (d, J = 11.2 Hz, 2H), 2.02 (t, J = 11.1 Hz, 3H), 1.80 (d, J = 10.5 Hz, 3H), 1.63 – 1.50 (m, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 163.87, 163.62, 162.24, 161.41, 153.14, 147.91, 139.24, 138.32, 137.03, 136.20, 134.07, 133.92, 133.76, 130.27, 129.89, 129.61, 128.65, 128.42, 127.70 – 127.62 (m), 126.01, 122.21, 120.46, 106.13, 61.83, 56.25, 52.37, 47.48, 31.58.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 560.62 für $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 560.31.

5.4.75 4-Nitro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (88c)



88c

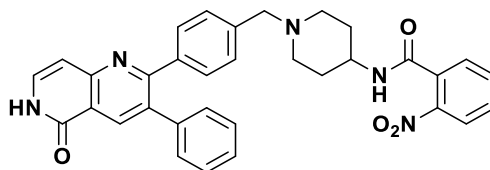
Nach AAV 8 wird **4** (350 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) mit **84c** (348 mg, 1.4 mmol, 1.3 eq.) und Ameisensäure (162 μL , 4.3 mmol, 4.00 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 8 wurde die Reaktion für 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung gerührt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH_3))/DCM (40/60, v/v)) aufgereinigt. Es werden 261 mg (0.5 mmol, 44 %) des designierten Produkts erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.62 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 8.63 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.31 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.06 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.52 – 7.47 (m, 1H), 7.31 (dd, J = 4.8 Hz, 3.1 Hz, 5H), 7.23 (dd, J = 12.2 Hz, 5.6 Hz, 4H), 6.68 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 3.77 (qd, J = 11.3 Hz, 5.7 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 18.1 Hz, 11.1 Hz, 3H), 2.80 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 2.02 (t, J = 11.1 Hz, 2H), 1.79 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 1.57 (qd, J = 12.1 Hz, 3.3 Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 164.05 – 164.00 (m), 163.41, 162.10 – 162.03 (m), 161.28 – 161.22 (m), 153.00 – 152.94 (m), 148.97 – 148.92 (m), 140.39 – 140.36 (m), 139.09 – 139.01 (m), 138.18 – 138.14 (m), 136.92 – 136.83 (m), 133.78 – 133.74 (m), 133.66 – 133.56 (m), 129.71, 129.44, 128.86, 128.49, 128.28, 127.58 – 127.49 (m), 123.52, 120.32 – 120.27 (m), 105.96, 61.85 – 61.60 (m), 52.17, 47.27, 31.38.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 560.62 für $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 560.29.

5.4.76 2-Nitro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (88d)



88d

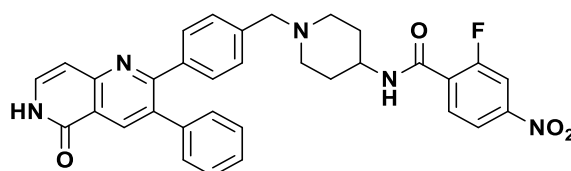
Nach AAV 8 wird **4** (350 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) mit **84d** (348 mg, 1.4 mmol, 1.3 eq.) und Ameisensäure (162 μ L, 4.3 mmol, 4.00 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 8 wurde die Reaktion für 30 min bei 120 °C unter Mikrowelleneinstrahlung gerührt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (40/60, v/v)) aufgereinigt. Es werden 209 mg (0.4 mmol, 35 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.62 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.78 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.70 – 7.65 (m, 1H), 7.59 – 7.55 (m, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 1H), 7.31 (dd, *J* = 5.0 Hz, 3.2 Hz, 5H), 7.26 – 7.17 (m, 4H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.74 – 3.63 (m, 1H), 3.53 – 3.36 (m, 3H), 2.75 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 2.03 (t, *J* = 10.9 Hz, 2H), 1.81 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 1.47 (dd, *J* = 20.3 Hz, 10.9 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.90, 162.07, 161.25, 152.97, 146.85, 139.09 (d, *J* = 4.5 Hz), 138.13, 136.87, 133.75, 133.59, 132.97, 130.56, 129.72, 129.44, 129.19 – 129.17 (m), 128.49, 128.23, 127.52, 124.09, 120.28, 105.97, 61.73, 51.93, 46.74 – 46.67 (m), 31.19 – 31.16 (m).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 560.62 für C₃₃H₂₉N₅O₄ [M+H]⁺. Gefunden: 560.31.

5.4.77 2-Fluoro-4-nitro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (88e)



88e

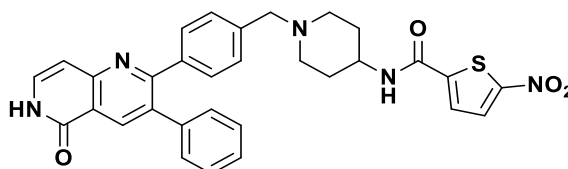
Nach AAV 8 wird **4** (350 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) mit **84e** (373 mg, 1.4 mmol, 1.3 eq.) und Ameisensäure (162 μ L, 4.3 mmol, 4.00 eq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (40/60, v/v)) aufgereinigt. Es werden 293 mg (0.5 mmol, 47 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.61 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.20 (dd, *J* = 9.5 Hz, 1.9 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.80 – 7.75 (m, 1H), 7.52 – 7.47 (m, 1H), 7.31 (dd, *J* = 4.9 Hz, 3.3 Hz, 5H), 7.27 – 7.19 (m, 4H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.80 – 3.70 (m, 1H), 3.48 – 3.41 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.03 (t, *J* = 10.9 Hz, 2H), 1.80 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.50 (dd, *J* = 20.4 Hz, 11.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.02, 161.75, 161.22, 159.18, 157.51, 152.94, 148.94, 148.88, 139.05, 138.12, 136.82, 133.73, 133.54, 131.15, 131.04, 130.97 (d, *J* = 3.7 Hz), 129.67, 129.40, 128.44, 128.20, 127.48, 120.26, 119.60 (d, *J* = 3.4 Hz), 112.08, 111.90, 105.92, 61.68, 56.04, 51.84, 46.94, 31.28, 18.59.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 578.61 für C₃₃H₂₈FN₅O₄ [M+H]⁺. Gefunden: 578.41.

5.4.78 5-Nitro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)thiophen-2-carboxamid (88f)



88f

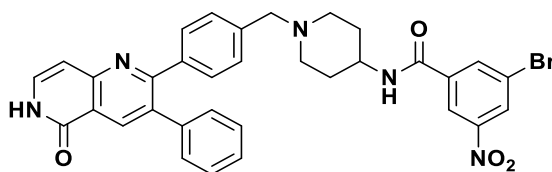
Nach AAV 8 wird **4** (350 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq.) mit **84f** (356 mg, 1.4 mmol, 1.3 eq.) und Ameisensäure (162 μ L, 4.3 mmol, 4.00 eq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (40/60, v/v)) aufgereinigt. Es werden 317 mg (0.6 mmol, 52 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.61 (s, 1H), 8.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 5H), 7.26 – 7.19 (m, 4H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.77 – 3.67 (m, 1H), 3.51 – 3.43 (m, 3H), 2.79 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 2.00 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H), 1.79 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H), 1.55 (dt, *J* = 11.5 Hz, 9.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.17, 162.02, 161.21, 158.75, 152.90 (d, *J* = 13.3 Hz), 152.82, 146.73, 138.99 (d, *J* = 15.9 Hz), 138.15, 136.82, 133.73, 133.55, 130.19, 129.59 (d, *J* = 24.9 Hz), 129.46 (d, *J* = 15.8 Hz), 128.63 – 128.30 (m), 128.21, 127.40 (d, *J* = 25.5 Hz), 127.29, 120.26, 105.92, 61.54, 52.00, 47.45, 31.30.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 566.65 für C₃₁H₂₇N₅O₄S [M+H]⁺. Gefunden: 566.39.

5.4.79 3-Bromo-5-nitro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (88g)



88g

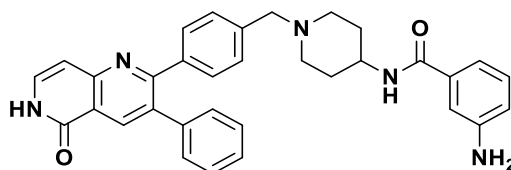
Nach AAV 8 wird **4** (544 mg, 1.7 mmol, 1.00 eq.) mit **84g** (711 mg, 2.2 mmol, 1.30 eq.) und Ameisensäure (252 μ L, 6.7 mmol, 4.00 eq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (40/60, v/v)) aufgereinigt. Es werden 418 mg (0.7 mmol, 39 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.61 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.78 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.66 – 8.63 (m, 1H), 8.54 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.47 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.50 (dd, *J* = 7.3 Hz, 6.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.22 (m, 8H), 6.68 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.05 – 3.99 (m, 1H), 3.83 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.65 (d, *J* = 24.1 Hz, 1H), 2.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.22 (s, 1H), 1.88 – 1.81 (m, 1H), 1.75 (s, 4H), 1.68 – 1.59 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.44, 162.00, 161.22, 152.95, 148.56, 139.05, 138.11, 137.44, 136.78, 136.10, 133.67, 129.63, 129.37, 128.39, 128.13, 127.42, 122.09, 121.38, 120.25, 105.80, 61.60, 52.08, 47.49, 31.30, 22.50.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 639.52 für C₃₃H₂₈BrN₅O₄ [M+H]⁺. Gefunden: 640.29.

5.4.80 3-Amino-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (89c)

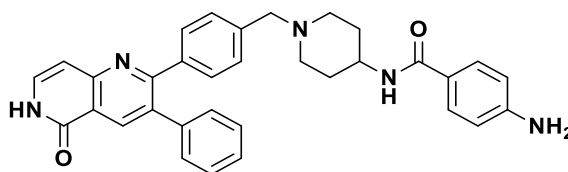


89b

Nach AAV 9 wird **88b** (357 mg, 0.6 mmol, 1.00 eq.) und Eisenpulver (196 mg, 3.5 mmol, 5.50 eq.) in 7.5 mL Lösemittelgemisch umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (30/70, v/v)) aufgereinigt. Es werden 266 mg (0.5 mmol, 79 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 530.64 für C₃₃H₃₁N₅O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 530.37.

5.4.81 4-Amino-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (89c)



89c

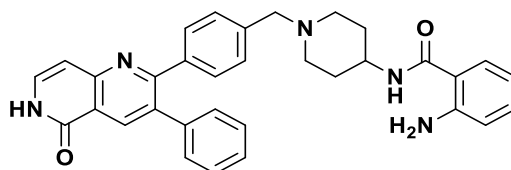
Nach AAV 9 wird **88c** (201 mg, 0.4 mmol, 1.00 eq.) und Eisenpulver (110 mg, 2.0 mmol, 5.50 eq.) in 7.5 mL Lösemittelgemisch umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (30/70, v/v)) aufgereinigt. Es werden 132 mg (0.3 mmol, 69 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.91 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.96 (t, *J* = 13.7 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 40.6 Hz, 6.6 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 4.9 Hz, 5H), 7.23 (dd, *J* = 13.8 Hz, 6.0 Hz, 4H), 7.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.67 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 3.71 (s, 1H), 3.45 (s, 2H), 3.16 (s, 4H), 2.78 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 1.99 (t, *J* = 10.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.24, 162.07, 161.15, 152.95, 149.47, 139.09 (d, *J* = 7.5 Hz), 138.10, 136.79, 133.70 (d, *J* = 18.5 Hz), 131.46, 129.62, 129.38, 128.40 (d, *J* = 20.8 Hz), 128.20 (d, *J* = 11.7 Hz), 127.43, 120.23, 116.17, 115.15, 114.45, 105.77, 61.71, 52.30, 48.58, 31.46.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 530.64 für C₃₃H₃₁N₅O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 530.29.

5.4.82 2-Amino-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (89d)



89d

Nach AAV 9 wird **88d** (590 mg, 1.1 mmol, 1.00 eq.) und Eisenpulver (324 mg, 5.8 mmol, 5.50 eq.) in 7.5 mL Lösemittelgemisch umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (30/70, v/v)) aufgereinigt. Es werden 374 mg (0.7 mmol, 67 %) des designierten Produkts erhalten.

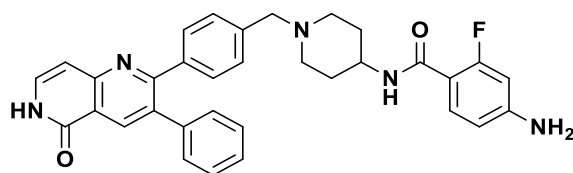
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.61 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.66 – 7.46 (m, 4H), 7.31 (dd, *J* = 4.5 Hz, 3.0 Hz, 5H), 7.27 – 7.17 (m, 4H), 6.68 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.51 (d,

$J = 8.4$ Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 3.75 – 3.63 (m, 1H), 3.44 (s, 2H), 2.77 (d, $J = 10.6$ Hz, 2H), 1.98 (t, $J = 11.0$ Hz, 2H), 1.71 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H), 1.53 (dd, $J = 21.2$ Hz, 10.4 Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 165.75 – 165.42 (m), 162.29 – 161.66 (m), 138.30 – 137.93 (m), 133.99 – 133.29 (m), 129.66, 129.42, 128.80, 128.46, 128.22, 127.60 – 127.40 (m), 120.36 – 119.95 (m), 112.44, 105.94, 61.88 – 61.47 (m), 52.41, 46.65 – 46.16 (m), 31.75.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 530.64 für $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 530.34.

5.4.83 4-Amino-2-fluoro-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (89e)



89e

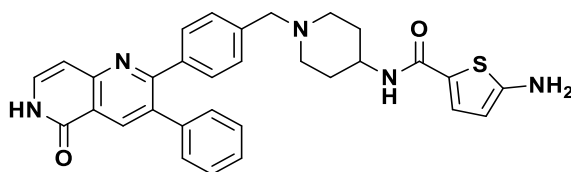
Eine Lösung aus **89e** (250 mg, 0.4 mmol, 1.00 eq.) in 6 mL eines Lösemittelgemischs aus Methanol, THF und VE-Wasser (4:1:1, v/v) wurde mit Eisenpulver (121 mg, 2.2 mmol, 5.00 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf 70 °C erhitzt und für 45 min gerührt. Nach Abkühlung auf rt wird die Suspension über Celite® gefiltert und die organische Phase abgetrennt. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.58 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 8.37 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 7.1$ Hz, 5.9 Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 11.6$ Hz, 5.7 Hz, 2H), 7.33 – 7.28 (m, 5H), 7.23 (dt, $J = 5.2$ Hz, 3.6 Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.38 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 6.28 (dd, $J = 14.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.87 (s, 2H), 3.76 – 3.67 (m, 1H), 3.44 (s, 2H), 2.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 2.01 (s, 2H), 1.75 (d, $J = 10.1$ Hz, 2H), 1.55 – 1.45 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 162.98 (d, $J = 2.1$ Hz), 162.00, 161.92, 161.19, 160.53, 153.21, 153.14, 152.91, 139.02, 138.08, 136.78, 133.70, 133.46, 131.52 (d, $J = 4.8$ Hz), 129.61, 129.36, 128.39, 128.18, 127.44, 120.24, 109.55, 109.48, 109.38, 105.92, 99.30, 99.15, 61.70, 51.77 (d, $J = 86.2$ Hz), 46.18 (d, $J = 76.4$ Hz), 31.18 (d, $J = 97.7$ Hz).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 547.63 für $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{FN}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 548.47.

5.4.84 5-Amino-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)thiophen-2-carboxamid (89f)

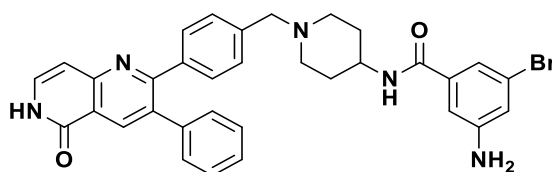


89f

Eine Lösung aus **88f** (250 mg, 0.4 mmol, 1.00 eq.) in 6 mL eines Lösemittelgemischs aus Methanol, THF und VE-Wasser (4:1:1, v/v) wurde mit Eisenpulver (123 mg, 2.2 mmol, 5.00 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf 70 °C erhitzt und für 45 min gerührt. Nach Abkühlung auf rt wird die Suspension über Celite® gefiltert und die organische Phase abgetrennt. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 536.67 für C₃₁H₂₉N₅O₂S [M+H]⁺. Gefunden: 536.32.

5.4.85 3-Amino-5-bromo-*N*-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)benzamid (89g)



89g

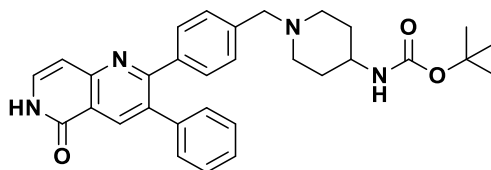
Nach AAV 9 wird **88f** (200 mg, 0.3 mmol, 1.00 eq.) und Eisenpulver (96 mg, 1.7 mmol, 5.50 eq.) in 7.5 mL Lösemittelgemisch umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 120 mg (0.2 mmol, 64 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.57 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 7.2 Hz, 6.0 Hz, 1H), 7.33 – 7.30 (m, 5H), 7.24 (dt, *J* = 4.9 Hz, 3.9 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.07 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.98 (t, 1H), 6.83 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 3.73 – 3.58 (m, 1H), 3.44 (s, 2H), 2.77 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 1.99 (t, *J* = 11.1 Hz, 2H), 1.72 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 1.57 – 1.50 (m, 2H).

¹³C NMR (176 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.88, 161.98, 161.20, 152.91, 150.35, 139.10, 139.02, 138.07, 137.53, 136.77, 133.71, 133.48, 129.61, 129.36, 128.40, 128.16, 127.44, 121.75, 120.23, 117.83, 116.31, 112.07, 105.90, 61.66, 52.21, 46.88, 31.37.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 609.54 für C₃₃H₃₀BrN₅O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 610.30.

5.4.86 *tert*-Butyl-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)carbammat (**91**)



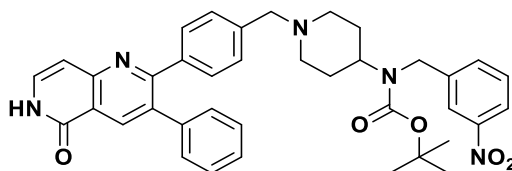
91

Nach AAV 8 wird **4** (413 mg, 1.3 mmol, 1.00 eq.) mit **90** (329 mg, 1.6 mmol, 1.30 eq.) und Ameisensäure (191 μ L, 5.1 mmol, 4.00 eq.) umgesetzt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (40/60, v/v)) aufgereinigt. Es werden 277 mg (0.5 mmol, 43 %) des designierten Produkts erhalten.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.60 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.49 (dd, *J* = 7.2 Hz, 6.0 Hz, 1H), 7.32 – 7.28 (m, 5H), 7.24 – 7.21 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.53 – 3.47 (m, 1H), 2.72 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.66 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.36 (d, *J* = 6.9 Hz, 13H).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 511.64 für C₃₁H₃₄N₄O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 511.34.

5.4.87 *tert*-Butyl-(3-nitrobenzyl)(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)carbammat (**96**)

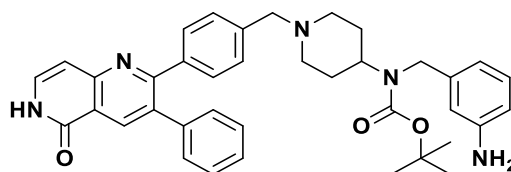


96

Zu einer Lösung aus **91** (50 mg, 0.1 mmol, 1.20 eq.) in 1 mL DMF wird Kalium-*tert*-butanolat (27 mg, 0.2 mmol, 3.00 eq.) und *m*-Nitrobenzylchlorid (**93**, 14 mg, 0.1 mmol, 1.00 eq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 85 °C für 4 h gerührt. Nach Abkühlen auf rt wird die Reaktion in ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gequentscht. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit VE-Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flash Chromatographie ((MeOH/DCM (10/90, v/v + 1 % NH₃))/DCM (50/50, v/v)) aufgereinigt. Es werden 16 mg (0.02 mmol, 31 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 646.76 für C₃₈H₃₉N₅O₅ [M+H]⁺. Gefunden: 646.29.

5.4.88 *tert*-Butyl-(3-aminobenzyl)(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)carbamate (97)

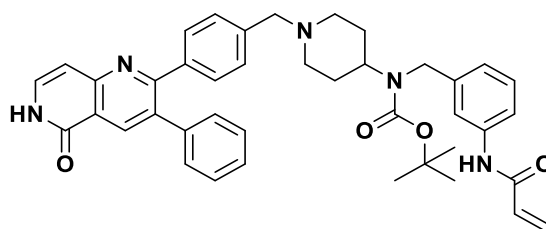


97

Nach AAV 9 wird **96** (325 mg, 0.5 mmol, 1.00 eq.) und Eisenpulver (155 mg, 2.8 mmol, 5.50 eq.) in 12.5 mL Lösemittelgemisch umgesetzt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es werden 298 mg (0.5 mmol, 97 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 616.78 für $C_{38}H_{41}N_5O_3$ $[M+H]^+$. Gefunden: 616.29.

5.4.89 *tert*-Butyl-(3-acrylamidobenzyl)(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)carbamate (98)



98

Nach AAV 3 wird **97** (328 mg, 0.5 mmol, 1.00 eq.) mit **21** (48 μ L, 0.6 mmol, 1.10 eq.) und DIPEA (907 μ L, 5.3 mmol, 10.0 eq.) umgesetzt. Abweichend von AAV 3 wird die Reaktion für drei Stunden gerührt. Nach Aufarbeitung wird das Rohprodukt mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie (H_2O/ACN (45/55, v/v) + 0.2 % TFA) aufgereinigt. Es werden 196 mg (0.3 mmol, 55 %) des designierten Produkts erhalten.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 670.82 für $C_{41}H_{43}N_5O_4$ $[M+H]^+$. Gefunden: 670.29.

Literaturverzeichnis

1. Berg, J. M. T., J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*. 5th Edition ed.; W. H. Freeman and Company: New York, NY, USA, **2002**.
2. Uversky, V. N. Dancing Protein Clouds: The Strange Biology and Chaotic Physics of Intrinsically Disordered Proteins. *J Biol Chem* **2016**, *291*, 6681-6688.
3. Witze, E. S.; Old, W. M.; Resing, K. A.; Ahn, N. G. Mapping Protein Post-Translational Modifications with Mass Spectrometry. *Nat Methods* **2007**, *4*, 798-806.
4. Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J., Jr. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 7342-7372.
5. Csizmok, V.; Follis, A. V.; Kriwacki, R. W.; Forman-Kay, J. D. Dynamic Protein Interaction Networks and New Structural Paradigms in Signaling. *Chem Rev* **2016**, *116*, 6424-6462.
6. Yang, J.; Liu, Z.; Xiao, T. S. Post-Translational Regulation of Inflammasomes. *Cell Mol Immunol* **2017**, *14*, 65-79.
7. Jacob, C.; Giles, G. L.; Giles, N. M.; Sies, H. Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 4742-4758.
8. Ng, H. H.; Bird, A. Histone Deacetylases: Silencers for Hire. *Trends Biochem Sci* **2000**, *25*, 121-126.
9. Raju, R. V. S.; Kakkar, R.; Radhi, J. M.; Sharma, R. K. Biological Significance of Phosphorylation and Myristoylation in the Regulation of Cardiac Muscle Proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1997**, *176*, 135-143.
10. Resh, M. D. Fatty Acylation of Proteins: New Insights into Membrane Targeting of Myristoylated and Palmitoylated Proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1999**, *1451*, 1-16.
11. Dong, X.; Gong, Z.; Lu, Y. B.; Liu, K.; Qin, L. Y.; Ran, M. L.; Zhang, C. L.; Liu, Z.; Zhang, W. P.; Tang, C. Ubiquitin S65 Phosphorylation Engenders a Ph-Sensitive Conformational Switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, 6770-6775.
12. Furmanek, A.; Hofsteenge, J. Protein C-Mannosylation: Facts and Questions. *Acta Biochimica Polonica* **2000**, *47*, 781-789.
13. Ellgaard, L.; Molinari, M.; Helenius, A. Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway. *Science* **1999**, *286*, 1882-1888.
14. Trombetta, E. S.; Parodi, A. J. Quality Control and Protein Folding in the Secretory Pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2003**, *19*, 649-676.
15. Spiro, R. G. Protein Glycosylation: Nature, Distribution, Enzymatic Formation, and Disease Implications of Glycopeptide Bonds. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43r-56r.
16. Gelb, M. H.; Brunsveld, L.; Hrycyna, C. A.; Michaelis, S.; Tamanoi, F.; Van Voorhis, W. C.; Waldmann, H. Therapeutic Intervention Based on Protein Prenylation and Associated Modifications. *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 518-528.
17. Graves, J. D.; Krebs, E. G. Protein Phosphorylation and Signal Transduction. *Pharmacol Ther* **1999**, *82*, 111-121.
18. Bauer, R. A. Covalent Inhibitors in Drug Discovery: From Accidental Discoveries to Avoided Liabilities and Designed Therapies. *Drug Discov Today* **2015**, *20*, 1061-1073.
19. Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The Resurgence of Covalent Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 307-317.

20. Wright, P. M.; Seiple, I. B.; Myers, A. G. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53*, 8840-8869.
21. Olbe, L.; Carlsson, E.; Lindberg, P. A Proton-Pump Inhibitor Expedition: The Case Histories of Omeprazole and Esomeprazole. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 132-139.
22. Savi, P.; Pereillo, J. M.; Uzabiaga, M. F.; Combalbert, J.; Picard, C.; Maffrand, J. P.; Pascal, M.; Herbert, J. M. Identification and Biological Activity of the Active Metabolite of Clopidogrel. *Thromb Haemost* **2000**, *84*, 891-896.
23. Potashman, M. H.; Duggan, M. E. Covalent Modifiers: An Orthogonal Approach to Drug Design. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1231-1246.
24. van der Ouderaa, F. J.; Buytenhek, M.; van Dorp, D. A. Characterization of Prostaglandin H2 Synthetase. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* **1980**, *6*, 139-144.
25. Lu, W. P.; Kincaid, E.; Sun, Y.; Bauer, M. D. Kinetics of Beta-Lactam Interactions with Penicillin-Susceptible and -Resistant Penicillin-Binding Protein 2x Proteins from Streptococcus Pneumoniae. Involvement of Acylation and Deacylation in Beta-Lactam Resistance. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 31494-31501.
26. Lindberg, P.; Nordberg, P.; Alminger, T.; Brandstrom, A.; Wallmark, B. The Mechanism of Action of the Gastric-Acid Secretion Inhibitor Omeprazole. *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, *29*, 1327-1329.
27. Weibel, E. K.; Hadvary, P.; Hochuli, E.; Kupfer, E.; Lengsfeld, H. Lipstatin, an Inhibitor of Pancreatic Lipase, Produced by Streptomyces Toxytricini. I. Producing Organism, Fermentation, Isolation and Biological Activity. *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*, 1081-1085.
28. Lim, S. D.; Stallcup, W.; Lefkove, B.; Govindarajan, B.; Au, K. S.; Northrup, H.; Lang, D.; Fisher, D. E.; Patel, A.; Amin, M. B.; Arbiser, J. L. Expression of the Neural Stem Cell Markers Ng2 and L1 in Human Angiomyolipoma: Are Angiomyolipomas Neoplasms of Stem Cells? *Mol Med* **2007**, *13*, 160-165.
29. Drahl, C.; Cravatt, B. F.; Sorensen, E. J. Protein-Reactive Natural Products. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 5788-5809.
30. Guerciolini, R. Mode of Action of Orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1997**, *21 Suppl 3*, S12-23.
31. Polinsky, R. J. Clinical Pharmacology of Rivastigmine: A New-Generation Acetylcholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clin Ther* **1998**, *20*, 634-647.
32. Robertson, J. G. Mechanistic Basis of Enzyme-Targeted Drugs. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5561-5571.
33. Pao, W.; Miller, V.; Zakowski, M.; Doherty, J.; Politi, K.; Sarkaria, I.; Singh, B.; Heelan, R.; Rusch, V.; Fulton, L.; Mardis, E.; Kupfer, D.; Wilson, R.; Kris, M.; Varmus, H. EGF Receptor Gene Mutations Are Common in Lung Cancers from "Never Smokers" and Are Associated with Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13306-13311.
34. Lynch, T. J.; Bell, D. W.; Sordella, R.; Gurubhagavatula, S.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Haserlat, S. M.; Supko, J. G.; Haluska, F. G.; Louis, D. N.; Christiani, D. C.; Settleman, J.; Haber, D. A. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2129-2139.
35. Li, D.; Ambrogio, L.; Shimamura, T.; Kubo, S.; Takahashi, M.; Chirieac, L. R.; Padera, R. F.; Shapiro, G. I.; Baum, A.; Himmelsbach, F.; Rettig, W. J.; Meyerson, M.; Solca, F.; Greulich, H.; Wong, K. K. BIBW2992, an Irreversible EGFR/Her2 Inhibitor Highly Effective in Preclinical Lung Cancer Models. *Oncogene* **2008**, *27*, 4702-4711.

36. Walter, A. O.; Sjin, R. T.; Haringsma, H. J.; Ohashi, K.; Sun, J.; Lee, K.; Dubrovskiy, A.; Labenski, M.; Zhu, Z.; Wang, Z.; Sheets, M.; St Martin, T.; Karp, R.; van Kalken, D.; Chaturvedi, P.; Niu, D.; Nacht, M.; Petter, R. C.; Westlin, W.; Lin, K.; Jaw-Tsai, S.; Raponi, M.; Van Dyke, T.; Etter, J.; Weaver, Z.; Pao, W.; Singh, J.; Simmons, A. D.; Harding, T. C.; Allen, A. Discovery of a Mutant-Selective Covalent Inhibitor of EGFR That Overcomes T790M-Mediated Resistance in NSCLC. *Cancer Discovery* **2013**, *3*, 1404-1415.
37. Cross, D. A.; Ashton, S. E.; Ghiorghiu, S.; Eberlein, C.; Nebhan, C. A.; Spitzler, P. J.; Orme, J. P.; Finlay, M. R.; Ward, R. A.; Mellor, M. J.; Hughes, G.; Rahi, A.; Jacobs, V. N.; Red Brewer, M.; Ichihara, E.; Sun, J.; Jin, H.; Ballard, P.; Al-Kadhimi, K.; Rowlinson, R.; Klinowska, T.; Richmond, G. H.; Cantarini, M.; Kim, D. W.; Ranson, M. R.; Pao, W. AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov* **2014**, *4*, 1046-1061.
38. Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J Exp Med* **1935**, *61*, 431-438.
39. Singh, J.; Petter, R. C.; Kluge, A. F. Targeted Covalent Drugs of the Kinase Family. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, *14*, 475-480.
40. Uetrecht, J. Idiosyncratic Drug Reactions: Past, Present, and Future. *Chem Res Toxicol* **2008**, *21*, 84-92.
41. Landsteiner, K.; Chase, M. W. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds : Vi. Experiments on the Sensitization of Guinea Pigs to Poison Ivy. *J Exp Med* **1939**, *69*, 767-784.
42. Landsteiner, K.; Jacobs, J. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J Exp Med* **1935**, *61*, 237-245.
43. Mutschler, E. G., G.; Kroemer, H. K.; Menzel, S.; Ruth, P. *Arzneimittelwirkung*. 10. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **2013**.
44. Jollow, D. J.; Mitchell, J. R.; Potter, W. Z.; Davis, D. C.; Gillette, J. R.; Brodie, B. B. Acetaminophen-Induced Hepatic Necrosis. Ii. Role of Covalent Binding *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* **1973**, *187*, 195-202.
45. Noe, M. C.; Gilbert, A. M. Targeted Covalent Enzyme Inhibitors. **2012**, *47*, 413-439.
46. Kalgutkar, A. S.; Dalvie, D. K. Drug Discovery for a New Generation of Covalent Drugs. *Expert Opin Drug Discov* **2012**, *7*, 561-581.
47. Miller, J. A. The Metabolism of Xenobiotics to Reactive Electrophiles in Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis: A Collaboration with Elizabeth Cavert Miller and Our Associates. *Drug Metab Rev* **1998**, *30*, 645-674.
48. Nakayama, S.; Atsumi, R.; Takakusa, H.; Kobayashi, Y.; Kurihara, A.; Nagai, Y.; Nakai, D.; Okazaki, O. A Zone Classification System for Risk Assessment of Idiosyncratic Drug Toxicity Using Daily Dose and Covalent Binding. *Drug Metab Dispos* **2009**, *37*, 1970-1977.
49. Jencks, W. P. Binding Energy, Specificity, and Enzymic Catalysis: The Circe Effect. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1975**, *43*, 219-410.
50. Menger, F. M. On the Source of Intramolecular and Enzymatic Reactivity. *Accounts of Chemical Research* **1985**, *18*, 128-134.
51. Meister, A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 17205-17208.
52. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46*, 3-26.

53. Leeson, P. Drug Discovery: Chemical Beauty Contest. *Nature* **2012**, *481*, 455-456.
54. Gugeler, N. K., U. *Einführung in Die Pharmakokinetik: Pharmakokinetische Grundkenntnisse, Prinzipien Und Ihre Klinische Bedeutung, Terminologie Und Tabellen Pharmakokinetischer Daten.* Govi-Verlag (Pharmazeutischer Verlag) GmbH: **2000**; Vol. 2.
55. Chandrasekaran, A.; Shen, L.; Lockhead, S.; Oganessian, A.; Wang, J.; Scatina, J. Reversible Covalent Binding of Neratinib to Human Serum Albumin *in vitro*. *Drug Metab Lett* **2010**, *4*, 220-227.
56. Gan, J.; Harper, T. W.; Hsueh, M. M.; Qu, Q.; Humphreys, W. G. Dansyl Glutathione as a Trapping Agent for the Quantitative Estimation and Identification of Reactive Metabolites. *Chem Res Toxicol* **2005**, *18*, 896-903.
57. Smith, A. J.; Zhang, X.; Leach, A. G.; Houk, K. N. Beyond Picomolar Affinities: Quantitative Aspects of Noncovalent and Covalent Binding of Drugs to Proteins. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 225-233.
58. Krippendorff, B. F.; Neuhaus, R.; Lienau, P.; Reichel, A.; Huisinga, W. Mechanism-Based Inhibition: Deriving K(I) and K(Inact) Directly from Time-Dependent I_c(50) Values. *J Biomol Screen* **2009**, *14*, 913-923.
59. Schirmeister, T.; Kesselring, J.; Jung, S.; Schneider, T. H.; Weickert, A.; Becker, J.; Lee, W.; Bamberger, D.; Wich, P. R.; Distler, U.; Tenzer, S.; Johe, P.; Hellmich, U. A.; Engels, B. Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors. *J Am Chem Soc* **2016**, *138*, 8332-8335.
60. Swinney, D. C. The Role of Binding Kinetics in Therapeutically Useful Drug Action. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2009**, *12*, 31-39.
61. Lewandowicz, A.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Schramm, V. L. Achieving the Ultimate Physiological Goal in Transition State Analogue Inhibitors for Purine Nucleoside Phosphorylase. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 31465-31468.
62. Sachs, G.; Shin, J. M.; Howden, C. W. Review Article: The Clinical Pharmacology of Proton Pump Inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* **2006**, *23 Suppl 2*, 2-8.
63. Moghaddam, M. F.; Tang, Y.; O'Brien, Z.; Richardson, S. J.; Bacolod, M.; Chaturedi, P.; Apuy, J.; Kulkarni, A. A Proposed Screening Paradigm for Discovery of Covalent Inhibitor Drugs. *Drug Metab Lett* **2014**, *8*, 19-30.
64. Hajduk, P. J. Fragment-Based Drug Design: How Big Is Too Big? *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6972-6976.
65. Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand Efficiency: A Useful Metric for Lead Selection. *Drug Discov Today* **2004**, *9*, 430-431.
66. Wilson, A. J.; Kerns, J. K.; Callahan, J. F.; Moody, C. J. Keep Calm, and Carry on Covalently. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7463-7476.
67. Fry, D. W. Site-Directed Irreversible Inhibitors of the ErbB Family of Receptor Tyrosine Kinases as Novel Chemotherapeutic Agents for Cancer. *Anticancer Drug Des* **2000**, *15*, 3-16.
68. Hallenbeck, K. K.; Turner, D. M.; Renslo, A. R.; Arkin, M. R. Targeting Non-Catalytic Cysteine Residues through Structure-Guided Drug Discovery. *Curr Top Med Chem* **2017**, *17*, 4-15.
69. Leproult, E.; Barluenga, S.; Moras, D.; Wurtz, J. M.; Winssinger, N. Cysteine Mapping in Conformationally Distinct Kinase Nucleotide Binding Sites: Application to the Design of Selective Covalent Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1347-1355.
70. Ahn, K.; Johnson, D. S.; Mileni, M.; Beidler, D.; Long, J. Z.; McKinney, M. K.; Weerapana, E.; Sadagopan, N.; Liimatta, M.; Smith, S. E.; Lazerwith, S.; Stiff, C.; Kamtekar, S.; Bhattacharya, K.; Zhang, Y.; Swaney, S.; Van Becelaere, K.; Stevens, R. C.; Cravatt, B. F. Discovery and

Characterization of a Highly Selective Faah Inhibitor That Reduces Inflammatory Pain. *Chem Biol* **2009**, *16*, 411-420.

71. Honigberg, L. A.; Smith, A. M.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Loury, D.; Chang, B.; Li, S.; Pan, Z.; Thamm, D. H.; Miller, R. A.; Buggy, J. J. The Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor PCI-32765 Blocks B-Cell Activation and Is Efficacious in Models of Autoimmune Disease and B-Cell Malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 13075-13080.
72. King, J. L.; Jukes, T. H. Non-Darwinian Evolution. *Science* **1969**, *164*, 788-798.
73. Requejo, R.; Hurd, T. R.; Costa, N. J.; Murphy, M. P. Cysteine Residues Exposed on Protein Surfaces Are the Dominant Intramitochondrial Thiol and May Protect against Oxidative Damage. *FEBS J* **2010**, *277*, 1465-1480.
74. Bandyopadhyay, A.; Gao, J. Targeting Biomolecules with Reversible Covalent Chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **2016**, *34*, 110-116.
75. Pace, N. J.; Weerapana, E. Diverse Functional Roles of Reactive Cysteines. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 283-296.
76. Weerapana, E.; Wang, C.; Simon, G. M.; Richter, F.; Khare, S.; Dillon, M. B.; Bachovchin, D. A.; Mowen, K.; Baker, D.; Cravatt, B. F. Quantitative Reactivity Profiling Predicts Functional Cysteines in Proteomes. *Nature* **2010**, *468*, 790-795.
77. Tekalia, F.; Yeramian, E.; Dujon, B. Amino Acid Composition of Genomes, Lifestyles of Organisms, and Evolutionary Trends: A Global Picture with Correspondence Analysis. *Gene* **2002**, *297*, 51-60.
78. Visscher, M.; Arkin, M. R.; Dansen, T. B. Covalent Targeting of Acquired Cysteines in Cancer. *Curr Opin Chem Biol* **2016**, *30*, 61-67.
79. Liu, Q.; Sabnis, Y.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Buhrlage, S. J.; Jones, L. H.; Gray, N. S. Developing Irreversible Inhibitors of the Protein Kinase Cysteinome. *Chem Biol* **2013**, *20*, 146-159.
80. Miller, R. M.; Taunton, J. Targeting Protein Kinases with Selective and Semipromiscuous Covalent Inhibitors. *Methods Enzymol* **2014**, *548*, 93-116.
81. Singh, J.; Dobrusin, E. M.; Fry, D. W.; Haske, T.; Whitty, A.; McNamara, D. J. Structure-Based Design of a Potent, Selective, and Irreversible Inhibitor of the Catalytic Domain of the ErbB Receptor Subfamily of Protein Tyrosine Kinases. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1130-1135.
82. Engel, J.; Lategahn, J.; Rauh, D. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med Chem Lett* **2016**, *7*, 2-5.
83. Cohen, M. S.; Zhang, C.; Shokat, K. M.; Taunton, J. Structural Bioinformatics-Based Design of Selective, Irreversible Kinase Inhibitors. *Science* **2005**, *308*, 1318-1321.
84. Schirmer, A.; Kennedy, J.; Murli, S.; Reid, R.; Santi, D. V. Targeted Covalent Inactivation of Protein Kinases by Resorcylic Acid Lactone Polyketides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 4234-4239.
85. Zhou, W.; Hur, W.; McDermott, U.; Dutt, A.; Xian, W.; Ficarro, S. B.; Zhang, J.; Sharma, S. V.; Brugge, J.; Meyerson, M.; Settleman, J.; Gray, N. S. A Structure-Guided Approach to Creating Covalent FGFR Inhibitors. *Chem Biol* **2010**, *17*, 285-295.
86. Hagel, M.; Niu, D.; St Martin, T.; Sheets, M. P.; Qiao, L.; Bernard, H.; Karp, R. M.; Zhu, Z.; Labenski, M. T.; Chaturvedi, P.; Nacht, M.; Westlin, W. F.; Petter, R. C.; Singh, J. Selective Irreversible Inhibition of a Protease by Targeting a Noncatalytic Cysteine. *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 22-24.
87. Gentile, I.; Viola, C.; Borgia, F.; Castaldo, G.; Borgia, G. Telaprevir: A Promising Protease Inhibitor for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *Curr Med Chem* **2009**, *16*, 1115-1121.

88. Hagel, M.; Niu, D.; St Martin, T.; Sheets, M. P.; Qiao, L.; Bernard, H.; Karp, R. M.; Zhu, Z.; Labenski, M. T.; Chaturvedi, P.; Nacht, M.; Westlin, W. F.; Petter, R. C.; Singh, J. Selective Irreversible Inhibition of a Protease by Targeting a Noncatalytic Cysteine. *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 22-24.
89. Wissner, A.; Overbeek, E.; Reich, M. F.; Floyd, M. B.; Johnson, B. D.; Mamuya, N.; Rosfjord, E. C.; Discifani, C.; Davis, R.; Shi, X.; Rabindran, S. K.; Gruber, B. C.; Ye, F.; Hallett, W. A.; Nilakantan, R.; Shen, R.; Wang, Y. F.; Greenberger, L. M.; Tsou, H. R. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 6,7-Disubstituted 4-Anilinoquinoline-3-Carbonitriles. The Design of an Orally Active, Irreversible Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and the Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (Her-2). *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 49-63.
90. Smith, S.; Keul, M.; Engel, J.; Basu, D.; Eppmann, S.; Rauh, D. Characterization of Covalent-Reversible EGFR Inhibitors. *ACS Omega* **2017**, *2*, 1563-1575.
91. Serafimova, I. M.; Pufall, M. A.; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frodin, M.; Taunton, J. Reversible Targeting of Noncatalytic Cysteines with Chemically Tuned Electrophiles. *Nat Chem Biol* **2012**, *8*, 471-476.
92. Pritchard, R.; Lough, C. E.; Currie, D. J.; Holmes, H. L. Equilibrium Reactions of N-Butanethiol with Some Conjugated Heterooid Compounds. *Canadian Journal of Chemistry* **1968**, *46*, 775-781.
93. Pan, Z.; Scheerens, H.; Li, S. J.; Schultz, B. E.; Sprengeler, P. A.; Burrill, L. C.; Mendonca, R. V.; Sweeney, M. D.; Scott, K. C.; Grothaus, P. G.; Jeffery, D. A.; Spoerke, J. M.; Honigberg, L. A.; Young, P. R.; Dalrymple, S. A.; Palmer, J. T. Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for Bruton's Tyrosine Kinase. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 58-61.
94. Bradshaw, J. M.; McFarland, J. M.; Paavilainen, V. O.; Bisconte, A.; Tam, D.; Phan, V. T.; Romanov, S.; Finkle, D.; Shu, J.; Patel, V.; Ton, T.; Li, X.; Loughhead, D. G.; Nunn, P. A.; Karr, D. E.; Gerritsen, M. E.; Funk, J. O.; Owens, T. D.; Verner, E.; Brameld, K. A.; Hill, R. J.; Goldstein, D. M.; Taunton, J. Prolonged and Tunable Residence Time Using Reversible Covalent Kinase Inhibitors. *Nat Chem Biol* **2015**, *11*, 525-531.
95. Adams, J. Proteasome Inhibition in Cancer: Development of Ps-341. *Semin Oncol* **2001**, *28*, 613-619.
96. Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Klunder, J. M.; Ma, Y. T.; Plamondon, L.; Stein, R. L. Potent and Selective Inhibitors of the Proteasome: Dipeptidyl Boronic Acids. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 333-338.
97. Paramore, A.; Frantz, S. Bortezomib. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 611-612.
98. Crueiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. Substituent Effects on the Thermodynamic Stability of Imines Formed from Glycine and Aromatic Aldehydes: Implications for the Catalytic Activity of Pyridoxal-5'-Phosphate. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 15815-15824.
99. Tanaka, T.; Yamada, Y.; Ikehara, M. Polymer Support Synthesis of Oligodeoxyribonucleotide with an Aminoethyl or Aminohexyl Group at the 5' End by the Phosphite-Triester Approach. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1988**, *36*, 1386-1392.
100. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
101. Lössl, P.; van de Waterbeemd, M.; Heck, A. J. The Diverse and Expanding Role of Mass Spectrometry in Structural and Molecular Biology. *EMBO J.* **2016**, *35*, 2634-2657.
102. Tomson, J. J. Cathode Rays. *Philos. Mag.* **1897**, *44*, 1-24.
103. Chait, B. T.; Kent, S. B. Weighing Naked Proteins: Practical, High-Accuracy Mass Measurement of Peptides and Proteins. *Science* **1992**, *257*, 1885-1894.

104. Liko, I.; Allison, T. M.; Hopper, J. T.; Robinson, C. V. Mass Spectrometry Guided Structural Biology. *Curr Opin Struct Biol* **2016**, *40*, 136-144.
105. Hilton, G. R.; Benesch, J. L. Two Decades of Studying Non-Covalent Biomolecular Assemblies by Means of Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J R Soc Interface* **2012**, *9*, 801-816.
106. Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. *Mass Spectrom Rev* **2009**, *28*, 898-917.
107. Li, L.; Garden, R. W.; Sweedler, J. V. Single-Cell MALDI: A New Tool for Direct Peptide Profiling. *Trends Biotechnol* **2000**, *18*, 151-160.
108. Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Balschun, W.; Lange, O.; Strupat, K.; Horning, S. Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal Chem* **2006**, *78*, 2113-2120.
109. Michalski, A.; Damoc, E.; Lange, O.; Denisov, E.; Nolting, D.; Müller, M.; Viner, R.; Schwartz, J.; Remes, P.; Belford, M.; Dunyach, J. J.; Cox, J.; Horning, S.; Mann, M.; Makarov, A. Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC-MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. *Mol Cell Proteomics* **2012**, *11*, O111 013698.
110. Zubarev, R. A.; Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2013**, *85*, 5288-5296.
111. Yost, R. A.; Boyd, R. K. Tandem Mass Spectrometry: Quadrupole and Hybrid Instruments. *Methods Enzymol* **1990**, *193*, 154-200.
112. Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A. Applications of ESI-MS in Drug Discovery: Interrogation of Noncovalent Complexes. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 585-595.
113. Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D. Observation of Noncovalent Enzyme Substrate and Enzyme Product Complexes by Ion-Spray Mass-Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 7818-7819.
114. Leney, A. C.; Heck, A. J. R. Native Mass Spectrometry: What Is in the Name? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2017**, *28*, 5-13.
115. Engel, J.; Becker, C.; Lategahn, J.; Keul, M.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Kollipara, L.; Schultz-Fademrecht, C.; Zahedi, R. P.; Bauer, S.; Rauh, D. Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 10909-10912.
116. Fang, Z.; Simard, J. R.; Plenker, D.; Nguyen, H. D.; Phan, T.; Wolle, P.; Baumeister, S.; Rauh, D. Discovery of Inter-Domain Stabilizers—a Novel Assay System for Allosteric Akt Inhibitors. *ACS Chem Biol* **2015**, *10*, 279-288.
117. Weisner, J.; Gontla, R.; van der Westhuizen, L.; Oeck, S.; Ketzer, J.; Janning, P.; Richters, A.; Mühlenberg, T.; Fang, Z.; Taher, A.; Jendrossek, V.; Pelly, S. C.; Bauer, S.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D. Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54*, 10313-10316.
118. International Agency for Research on Cancer (WHO) Globocan 2012 - Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (**14.11.2012**).
119. National Cancer Institute Seer Cancer Statistics Review 1975-2011. (**14.11.2014**).
120. Hirsch, F. R.; Varella-Garcia, M.; Bunn, P. A., Jr.; Di Maria, M. V.; Veve, R.; Bremmes, R. M.; Baron, A. E.; Zeng, C.; Franklin, W. A. Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *J Clin Oncol* **2003**, *21*, 3798-3807.
121. Nicholson, R. I.; Gee, J. M.; Harper, M. E. EGFR and Cancer Prognosis. *Eur J Cancer* **2001**, *37 Suppl 4*, S9-15.

122. Ohsaki, Y.; Tanno, S.; Fujita, Y.; Toyoshima, E.; Fujiuchi, S.; Nishigaki, Y.; Ishida, S.; Nagase, A.; Miyokawa, N.; Hirata, S.; Kikuchi, K. Epidermal Growth Factor Receptor Expression Correlates with Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with P53 Overexpression. *Oncol Rep* **2000**, *7*, 603-607.
123. Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 169-181.
124. Marmor, M. D.; Skaria, K. B.; Yarden, Y. Signal Transduction and Oncogenesis by ErbB/Her Receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2004**, *58*, 903-913.
125. Chen, P.; Xie, H.; Sekar, M. C.; Gupta, K.; Wells, A. Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Cell Motility: Phospholipase C Activity Is Required, but Mitogen-Activated Protein Kinase Activity Is Not Sufficient for Induced Cell Movement. *J Cell Biol* **1994**, *127*, 847-857.
126. Krause, D. S.; Van Etten, R. A. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 172-187.
127. Prudkin, L.; Wistuba, II Epidermal Growth Factor Receptor Abnormalities in Lung Cancer. Pathogenetic and Clinical Implications. *Ann Diagn Pathol* **2006**, *10*, 306-315.
128. Sordella, R.; Bell, D. W.; Haber, D. A.; Settleman, J. Gefitinib-Sensitizing EGFR Mutations in Lung Cancer Activate Anti-Apoptotic Pathways. *Science* **2004**, *305*, 1163-1167.
129. Wang, Z.; Longo, P. A.; Tarrant, M. K.; Kim, K.; Head, S.; Leahy, D. J.; Cole, P. A. Mechanistic Insights into the Activation of Oncogenic Forms of EGF Receptor. *Nat Struct Mol Biol* **2011**, *18*, 1388-1393.
130. Yun, C. H.; Boggon, T. J.; Li, Y.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Meyerson, M.; Eck, M. J. Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 217-227.
131. Zhang, X.; Gureasko, J.; Shen, K.; Cole, P. A.; Kuriyan, J. An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell* **2006**, *125*, 1137-1149.
132. Carey, K. D.; Garton, A. J.; Romero, M. S.; Kahler, J.; Thomson, S.; Ross, S.; Park, F.; Haley, J. D.; Gibson, N.; Sliwkowski, M. X. Kinetic Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Somatic Mutant Proteins Shows Increased Sensitivity to the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Erlotinib. *Cancer Res* **2006**, *66*, 8163-8171.
133. 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*, 947-957.
134. Rosell, R.; Molina, M. A.; Serrano, M. J. EGFR Mutations in Circulating Tumour DNA. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 971-973.
135. 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.; North-East Japan Study Group. J. S. Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 2380-2388.
136. Paez, J. G.; Jänne, P. A.; Lee, J. C.; Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; Herman, P.; Kaye, F. J.; Lindeman, N.; Boggon, T. J.; Naoki, K.; Sasaki, H.; Fujii, Y.; Eck, M. J.; Sellers, W. R.; Johnson, B. E.; Meyerson, M. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.

137. 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*, 786-792.
138. Kwak, E. L.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Godin-Heymann, N.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Driscoll, D. R.; Fidias, P.; Lynch, T. J.; Rabindran, S. K.; McGinnis, J. P.; Wissner, A.; Sharma, S. V.; Isselbacher, K. J.; Settleman, J.; Haber, D. A. Irreversible Inhibitors of the EGF Receptor May Circumvent Acquired Resistance to Gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 7665-7670.
139. 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*, 3482-3488.
140. Yun, C. H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K. K.; Meyerson, M.; Eck, M. J. The T790M Mutation in EGFR Kinase Causes Drug Resistance by Increasing the Affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2070-2075.
141. Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. Drug-Target Residence Time and Its Implications for Lead Optimization. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 730-739.
142. Heuckmann, J. M.; Rauh, D.; Thomas, R. K. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling and Covalent EGFR Inhibition in Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3417-3420.
143. Katakami, N.; Atagi, S.; Goto, K.; Hida, T.; Horai, T.; Inoue, A.; Ichinose, Y.; Kobayashi, K.; Takeda, K.; Kiura, K.; Nishio, K.; Seki, Y.; Ebisawa, R.; Shahidi, M.; Yamamoto, N. Lux-Lung 4: A Phase II Trial of Afatinib in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Who Progressed During Prior Treatment with Erlotinib, Gefitinib, or Both. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3335-3341.
144. Greig, S. L. Osimertinib: First Global Approval. *Drugs* **2016**, *76*, 263-273.
145. Ercan, D.; Choi, H. G.; Yun, C. H.; Capelletti, M.; Xie, T.; Eck, M. J.; Gray, N. S.; Jänne, P. A. EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clinical Cancer Research* **2015**, *21*, 3913-3923.
146. Zhou, W.; Ercan, D.; Chen, L.; Yun, C. H.; Li, D.; Capelletti, M.; Cortot, A. B.; Chirieac, L.; Jacob, R. E.; Padera, R.; Engen, J. R.; Wong, K. K.; Eck, M. J.; Gray, N. S.; Jänne, P. A. Novel Mutant-Selective EGFR Kinase Inhibitors against EGFR T790M. *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.
147. Thress, K. S.; Paweletz, C. P.; Felip, E.; Cho, B. C.; Stetson, D.; Dougherty, B.; Lai, Z.; Markovets, A.; Vivancos, A.; Kuang, Y.; Ercan, D.; Matthews, S. E.; Cantarini, M.; Barrett, J. C.; Jänne, P. A.; Oxnard, G. R. Acquired EGFR C797S Mutation Mediates Resistance to AZD9291 in Non-Small Cell Lung Cancer Harboring EGFR T790M. *Nat Med* **2015**, *21*, 560-562.
148. Yu, Z.; Boggon, T. J.; Kobayashi, S.; Jin, C.; Ma, P. C.; Dowlati, A.; Kern, J. A.; Tenen, D. G.; Halmos, B. Resistance to an Irreversible Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor in EGFR-Mutant Lung Cancer Reveals Novel Treatment Strategies. *Cancer Res* **2007**, *67*, 10417-10427.
149. Tomassi, S.; Lategahn, J.; Engel, J.; Keul, M.; Tumbrink, H. L.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Bauer, S.; Rauh, D. Indazole-Based Covalent Inhibitors to Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2361-2372.
150. Engel, J. S., S.; Lategahn, J.; Tumbrink, H. L.; Goebel, L.; Becker, C.; Hennes, E.; Keul, M.; Unger, A.; Müller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Günther, G.; Hengstler, J. G.; Rauh, D. Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7725-7744.
151. Becker, C. Charakterisierung Von Rezeptortyrosinkinasen in Tumorzellen. Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2017**.

152. Engel, J. unveröffentlichte Dissertation, Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2017**.
153. Hanke, J. H.; Gardner, J. P.; Dow, R. L.; Changelian, P. S.; Brissette, W. H.; Weringer, E. J.; Pollok, B. A.; Connelly, P. A. Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. Study of Lck- and Fynt-Dependent T Cell Activation. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 695-701.
154. Mahadevi, A. S.; Sastry, G. N. Cation-Pi Interaction: Its Role and Relevance in Chemistry, Biology, and Material Science. *Chem Rev* **2013**, *113*, 2100-2138.
155. Basu, D.; Richters, A.; Rauh, D. Structure-Based Design and Synthesis of Covalent-Reversible Inhibitors to Overcome Drug Resistance in EGFR. *Bioorg Med Chem* **2015**, *23*, 2767-2780.
156. Mitsunobu, O.; Yamada, M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid Via Quaternary Phosphonium Salts. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1967**, *40*, 2380-2382.
157. Mitsunobu, O.; Yamada, M.; Mukaiyama, T. Preparation of Esters of Phosphoric Acid by Reaction of Trivalent Phosphorus Compounds with Diethyl Azodicarboxylate in Presence of Alcohols. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1967**, *40*, 935-939.
158. Elson, K. E.; Jenkins, I. D.; Loughlin, W. A. The Hendrickson Reagent and the Mitsunobu Reaction: A Mechanistic Study. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 2958-2965.
159. Kürti, L. C., B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. Elsevier Academic Press: Burlington, MA, USA, **2005**.
160. Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective Synthesis of Arylated (E)-Alkenes by the Reaction of Alk-1-Enylboranes with Aryl Halides in the Presence of Palladium Catalyst. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1979**, 866-867.
161. Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Letters* **1979**, *20*, 3437-3440.
162. Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synthetic Communications* **1981**, *11*, 513-519.
163. Gao, X.; Zhang, Y.; Wang, B. New Boronic Acid Fluorescent Reporter Compounds. 2. A Naphthalene-Based on-Off Sensor Functional at Physiological Ph. *Org Lett* **2003**, *5*, 4615-4618.
164. Wang, J.; Wan, W.; Jiang, H.; Gao, Y.; Jiang, X.; Lin, H.; Zhao, W.; Hao, J. C-9 Fluorenyl Substituted Anthracenes: A Promising New Family of Blue Luminescent Materials. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3874-3877.
165. Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. Palladium(O)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes - A Direct Procedure for Arylboronic Esters. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 7508-7510.
166. Yang, C. T.; Zhang, Z. Q.; Tajuddin, H.; Wu, C. C.; Liang, J.; Liu, J. H.; Fu, Y.; Czyzewska, M.; Steel, P. G.; Marder, T. B.; Liu, L. Alkylboronic Esters from Copper-Catalyzed Borylation of Primary and Secondary Alkyl Halides and Pseudohalides. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, 528-532.
167. Cassar, L. Synthesis of Aryl-Substituted and Vinyl-Substituted Acetylene Derivatives by Use of Nickel and Palladium Complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, *93*, 253-257.
168. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. Convenient Synthesis of Acetylenes - Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodoarenes, and Bromopyridines. *Tetrahedron Letters* **1975**, 4467-4470.

169. Cisbio Bioassays TR-FRET Basics. <http://www.cisbio.com/other/drug-discovery/tr-fret-basics> (**09.06.2017**).
170. Degorce, F.; Card, A.; Soh, S.; Trinquet, E.; Knapik, G. P.; Xie, B. Htrf: A Technology Tailored for Drug Discovery - a Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Curr Chem Genomics* **2009**, *3*, 22-32.
171. Richters, A. Kinaseinhibitoren Als Molekulare Sonden in der Chemischen Biologie. Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2013**.
172. 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. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22*, 3099-3108.
173. Promega Corporation Celltiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf> (**01.10.2017**).
174. Crouch, S. P.; Kozlowski, R.; Slater, K. J.; Fletcher, J. The Use of ATP Bioluminescence as a Measure of Cell Proliferation and Cytotoxicity. *J Immunol Methods* **1993**, *160*, 81-88.
175. Gazdar, A. F.; Bader, S.; Hung, J.; Kishimoto, Y.; Sekido, Y.; Sugio, K.; Virmani, A.; Fleming, J.; Carbone, D. P.; Minna, J. D. Molecular Genetic Changes Found in Human Lung Cancer and Its Precursor Lesions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1994**, *59*, 565-572.
176. Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors. *J Natl Cancer Inst* **1973**, *51*, 1417-1423.
177. Phelps, R. M.; Johnson, B. E.; Ihde, D. C.; Gazdar, A. F.; Carbone, D. P.; Linnoila, P. R. M. R. I.; Matthews, M. J.; Bunn, P. A.; Carney, D.; Minna, J. D.; Mulshine, J. L. Nci-Navy Medical Oncology Branch Cell Line Data Base. *Journal of Cellular Biochemistry* **1996**, 32-91.
178. Thermo Fisher Scientific Z'-Lyte Kinase Assay Kits. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/kinasebiology/kinase-activity-assays/z-lyte.html> (**08.07.2017**).
179. Thermo Fisher Scientific Z'-Lyte™ Screening Protocol and Assay Conditions https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/20101112_SSBK_Customer_Protocol_and_Assay_Conditions.pdf (**08.07.2017**).
180. Lee, C. U.; Grossmann, T. N. Reversible Covalent Inhibition of a Protein Target. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 8699-8700.
181. Hers, I.; Vincent, E. E.; Tavaré, J. M. Akt Signalling in Health and Disease. *Cell Signal* **2011**, *23*, 1515-1527.
182. Nitulescu, G. M.; Margina, D.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O. T.; Saloustros, E.; Fenga, C.; Spandidos, D.; Libra, M.; Tsatsakis, A. M. Akt Inhibitors in Cancer Treatment: The Long Journey from Drug Discovery to Clinical Use (Review). *Int J Oncol* **2016**, *48*, 869-885.
183. Mundi, P. S.; Sachdev, J.; McCourt, C.; Kalinsky, K. Akt in Cancer: New Molecular Insights and Advances in Drug Development. *Br J Clin Pharmacol* **2016**, *82*, 943-956.
184. Rudolph, M.; Anzeneder, T.; Schulz, A.; Beckmann, G.; Byrne, A. T.; Jeffers, M.; Pena, C.; Politz, O.; Köchert, K.; Vonk, R.; Reischl, J. Akt1 E17k Mutation Profiling in Breast Cancer: Prevalence, Concurrent Oncogenic Alterations, and Blood-Based Detection. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 1-12.

185. Clark, A. S.; West, K.; Streicher, S.; Dennis, P. A. Constitutive and Inducible Akt Activity Promotes Resistance to Chemotherapy, Trastuzumab, or Tamoxifen in Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* **2002**, *1*, 707-717.
186. Pearce, L. R.; Komander, D.; Alessi, D. R. The Nuts and Bolts of Agc Protein Kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11*, 9-22.
187. Lin, J.; Sampath, D.; Nannini, M. A.; Lee, B. B.; Degtyarev, M.; Oeh, J.; Savage, H.; Guan, Z.; Hong, R.; Kassees, R.; Lee, L. B.; Risom, T.; Gross, S.; Liederer, B. M.; Koeppen, H.; Skelton, N. J.; Wallin, J. J.; Belvin, M.; Punnoose, E.; Friedman, L. S.; Lin, K. Targeting Activated Akt with Gdc-0068, a Novel Selective Akt Inhibitor That Is Efficacious in Multiple Tumor Models. *Clinical Cancer Research* **2013**, *19*, 1760-1772.
188. Dumble, M.; Crouthamel, M.-C.; Zhang, S.-Y.; Schaber, M.; Levy, D.; Robell, K.; Liu, Q.; Figueroa, D. J.; Minthorn, E. A.; Seefeld, M. A.; Rouse, M. B.; Rabindran, S. K.; Heerding, D. A.; Kumar, R. Discovery of Novel Akt Inhibitors with Enhanced Anti-Tumor Effects in Combination with the Mek Inhibitor. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100880.
189. Saura, C.; Isakoff, S.; Calvo, I.; Patt, D.; Andersen, J.; Gonzalez-Martin, A.; Fisher, J.; Ciruelos, E.; Gil-Gil, M.; De la Peña, L.; Choi, Y.; Jia, S.; Singel, S.; Patel, P.; Baselga, J.; Oliveira, M. Abstract Ot1-03-09: Fairlane: A Phase II Randomized, Double-Blind, Study of the Akt Inhibitor Ipatasertib (Ipat, Gdc-0068) in Combination with Paclitaxel (Pac) as Neoadjuvant Treatment for Early Stage Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). *Cancer Research* **2016**, *76*, OT1-03-09-OT01-03-09.
190. Spencer, A.; Yoon, S.-S.; Harrison, S. J.; Morris, S. R.; Smith, D. A.; Brigandi, R. A.; Gauvin, J.; Kumar, R.; Opalinska, J. B.; Chen, C. The Novel Akt Inhibitor Afuresertib Shows Favorable Safety, Pharmacokinetics, and Clinical Activity in Multiple Myeloma. *Blood* **2014**, *124*, 2190-2195.
191. Tolcher, A. W.; Patnaik, A.; Papadopoulos, K. P.; Rasco, D. W.; Becerra, C. R.; Allred, A. J.; Orford, K.; Aktan, G.; Ferron-Brady, G.; Ibrahim, N.; Gauvin, J.; Motwani, M.; Cornfeld, M. Phase I Study of the Mek Inhibitor Trametinib in Combination with the Akt Inhibitor Afuresertib in Patients with Solid Tumors and Multiple Myeloma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2015**, *75*, 183-189.
192. Arceci, R. J.; Allen, C. E.; Dunkel, I. J.; Jacobsen, E.; Whitlock, J.; Vassallo, R.; Morris, S. R.; Portnoy, A.; Reedy, B. A.; Smith, D. A.; Noble, R.; Murnane, A.; Cornfeld, M.; Rodriguez-Galindo, C.; Heaney, M. L.; McClain, K.; Vaiselbuh, S. A Phase Iia Study of Afuresertib, an Oral Pan-Akt Inhibitor, in Patients with Langerhans Cell Histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* **2017**, *64*.
193. Manning, B. D.; Cantley, L. C. Akt/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261-1274.
194. Vanhaesebroeck, B. A., D. R. The Pi3k-Pdk1 Connection : More Than Just a Road to PKB. *Biochem J* **2000**, *346*, 561-576.
195. Calleja, V.; Alcor, D.; Laguerre, M.; Park, J.; Vojnovic, B.; Hemmings, B. A.; Downward, J.; Parker, P. J.; Larijani, B. Intramolecular and Intermolecular Interactions of Protein Kinase B Define Its Activation *in vivo*. *PLoS Biol* **2007**, *5*, e95.
196. Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Fu, S.; Hancock, P. J.; Haskell, K. M.; Jones, R. E.; Kahana, J. A.; Kral, A. M.; Leander, K.; Lee, L. L.; Malinowski, J.; McAvoy, E. M.; Nahas, D. D.; Robinson, R. G.; Huber, H. E. Identification and Characterization of Pleckstrin-Homology-Domain-Dependent and Isoenzyme-Specific Akt Inhibitors. *Biochem J* **2005**, *385*, 399-408.
197. Vivanco, I.; Chen, Z. C.; Tanos, B.; Oldrini, B.; Hsieh, W. Y.; Yannuzzi, N.; Campos, C.; Mellinghoff, I. K. A Kinase-Independent Function of Akt Promotes Cancer Cell Survival. *Elife* **2014**, *3*.
198. Fang, Z.; Grütter, C.; Rauh, D. Strategies for the Selective Regulation of Kinases with Allosteric Modulators: Exploiting Exclusive Structural Features. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 58-70.

199. Lindsley, C. W.; Zhao, Z.; Leister, W. H.; Robinson, R. G.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Hartman, G. D.; Huff, J. R.; Huber, H. E.; Duggan, M. E. Allosteric Akt (PKB) Inhibitors: Discovery and SAR of Isozyme Selective Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 761-764.
200. Wu, W. I.; Voegtli, W. C.; Sturgis, H. L.; Dizon, F. P.; Vigers, G. P.; Brandhuber, B. J. Crystal Structure of Human Akt1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition. *PLoS One* **2010**, *5*, e12913.
201. Hirai, H.; Sootome, H.; Nakatsuru, Y.; Miyama, K.; Taguchi, S.; Tsujioka, K.; Ueno, Y.; Hatch, H.; Majumder, P. K.; Pan, B. S.; Kotani, H. Mk-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*, 1956-1967.
202. ClinicalTrials.gov A Phase Ii Study of Akt Inhibitor Mk2206 in the Treatment of Recurrent Platinum-Resistant Ovarian, Fallopian Tube, or Peritoneal Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01283035?term=MK2206&draw=1&rank=2> (**20.09.2017**).
203. Lapierre, J. M.; Eathiraj, S.; Vensel, D.; Liu, Y.; Bull, C. O.; Cornell-Kennon, S.; Iimura, S.; Kelleher, E. W.; Kizer, D. E.; Koerner, S.; Makhija, S.; Matsuda, A.; Moussa, M.; Namdev, N.; Savage, R. E.; Szwaya, J.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Schwartz, B. Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)Phenyl)-5-Phenyl-3h-Imidazo[4,5-*b*]Pyridin-2-Yl)Pyridin -2-Amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric Akt Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6455-6469.
204. ClinicalTrials.gov Phase 1 Dose Escalation Study of ARQ 092 in Adult Subjects with Advanced Solid Tumors and Recurrent Malignant Lymphoma. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01473095?term=ARQ092&rank=3> (**27.09.2017**).
205. Fang, Z. Development of a Conformation-Sensitive Assay for the Detection of Inter-Domain Interactions Mediated by Allosteric Akt Inhibitors. Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2013**.
206. Uhlenbrock, N. Synthese Und Biochemische Charakterisierung Allosterischer Akt Interdomänen-Inhibitoren. unveröffentlichte Masterarbeit, Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2015**.
207. Missbach, M. Pyrrolo[2,3-*d*]Pyrimidines and Their Use. WO096/10028, 09.02.1999, **1999**.
208. Hantzsch, A. Neue Bildungsweise Von Pyrrolderivaten. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **1890**, *23*, 1474-1476.
209. Suzuki, N.; Azuma, T.; Kaneko, Y.; Izawa, Y.; Tomioka, H.; Nomoto, T. Diazotization and Sandmeyer Reactions of Arylamines in Poly(Ethylene Glycol)-Methylene Dichloride - Usefulness of PEG in Synthetic Reactions. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1987**, 645-647.
210. Engelhardt, H.; Schultes, S.; de Graaf, C.; Nijmeijer, S.; Vischer, H. F.; Zuiderveld, O. P.; Dobler, J.; Stachurski, K.; Mayer, M.; Arnhof, H.; Scharn, D.; Haaksma, E. E.; de Esch, I. J.; Leurs, R. Bispyrimidines as Potent Histamine H(4) Receptor Ligands: Delineation of Structure-Activity Relationships and Detailed H(4) Receptor Binding Mode. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4264-4276.
211. Caliendo, G.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Gessi, S.; Cattabriga, E.; Borea, P. A.; Santagada, V. Synthesis by Microwave Irradiation and Binding Properties of Novel 5-HT(1a) Receptor Ligands. *Eur J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 873-886.
212. Lepore, S. D.; He, Y. Use of Sonication for the Coupling of Sterically Hindered Substrates in the Phenolic Mitsunobu Reaction. *J Org Chem* **2003**, *68*, 8261-8263.
213. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures(1). *J Org Chem* **1996**, *61*, 3849-3862.

214. Roughley, S. D.; Jordan, A. M. The Medicinal Chemist's Toolbox: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3451-3479.
215. Mohamed, M. S.; Hussein, W. M.; McGeary, R. P.; Vella, P.; Schenk, G.; Abd El-Hameed, R. H. Synthesis and Kinetic Testing of New Inhibitors for a Metallo-Beta-Lactamase from *Klebsiella Pneumonia* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Eur J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 6075-6082.
216. Wan, Z. K.; Wacharasindhu, S.; Binnun, E.; Mansour, T. An Efficient Direct Amination of Cyclic Amides and Cyclic Ureas. *Org Lett* **2006**, *8*, 2425-2428.
217. Guram, A. S.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with in-Situ Generated Aminostannanes. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 7901-7902.
218. Kosugi, M.; Kameyama, M.; Migita, T. Palladium-Catalyzed Aromatic Amination of Aryl Bromides with N,N-Diethylamino-Tributyltin. *Chemistry Letters* **1983**, 927-928.
219. Albers, P.; Pietsch, J.; Parker, S. F. Poisoning and Deactivation of Palladium Catalysts. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **2001**, *173*, 275-286.
220. Hirama, M.; Uei, M. Chiral Total Synthesis of Compactin. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104*, 4251-4253.
221. Nagaoka, H.; Rutsch, W.; Schmid, G.; Iio, H.; Johnson, M. R.; Kishi, Y. Total Synthesis of Rifamycins .1. Stereocontrolled Synthesis of the Aliphatic Building Block. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 7962-7965.
222. Still, W. C.; Murata, S.; Revial, G.; Yoshihara, K. Synthesis of the Cyto-Toxic Germacranolide Eucannabinolide. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 625-627.
223. King, L. C.; Ostrum, G. K. Selective Bromination with Copper(II) Bromide. *Journal of Organic Chemistry* **1964**, *29*, 3459-3461.
224. Boarland, M. P. V.; Mcomie, J. F. W. Monosubstituted Pyrimidines, and the Action of Thiourea on Chloropyrimidines. *Journal of the Chemical Society* **1951**, 1218-1221.
225. Dave, C. G.; Shah, R. D. Synthesis of 7h-Tetrazolo[1,5-C]Pyrrolo[3,2-e]Pyrimidines and Their Reductive Ring Cleavage to 4-Aminopyrrolo[2,3-d]Pyrimidines. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1998**, *35*, 1295-1300.
226. Scheinpflug, R. Expression, Aufreinigung Und Kristallisation Von Akt in Komplex Mit Kovalent-Allosterischen Inhibitoren. unveröffentlichte Masterarbeit, Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2016**.
227. Ashwell, M. A.; Lapierre, J. M.; Brassard, C.; Bresciano, K.; Bull, C.; Cornell-Kennon, S.; Eathiraj, S.; France, D. S.; Hall, T.; Hill, J.; Kelleher, E.; Khanapurkar, S.; Kizer, D.; Koerner, S.; Link, J.; Liu, Y.; Makhija, S.; Moussa, M.; Namdev, N.; Nguyen, K.; Nicewonger, R.; Palma, R.; Szwaya, J.; Tandon, M.; Uppalapati, U.; Vensel, D.; Volak, L. P.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Yang, R. Y.; Chan, T. C. Discovery and Optimization of a Series of 3-(3-Phenyl-3h-Imidazo[4,5-b]Pyridin-2-Yl)Pyridin-2-Amines: Orally Bioavailable, Selective, and Potent ATP-Independent Akt Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5291-5310.
228. Friedländer, P. G., C.F. Über Die Darstellungsmethode Im Pyridinkern Substituierter Chinolinderivate. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **1883**, *16*, 1833-1839.
229. Laue, T. P., A. *Namen- Und Schlagwort-Reaktionen Der Organischen Chemie*. Vieweg+Teubner Verlag: **1998**.
230. Clayden, J. G., N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*. 7th Edition ed.; Oxford University Press: Oxford, N.Y., USA, **2008**.
231. Greene, T. W. W., P. G. *Protective Groups in Organic Synthesis*. John Wiley: New York, **1991**.

232. Hasan, I.; Marinelli, E. R.; Lin, L. C. C.; Fowler, F. W.; Levy, A. B. Synthesis and Reactions of N-Protected 2-Lithiated Pyrroles and Indoles - the tert-Butoxycarbonyl Substituent as a Protecting Group. *Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 157-164.
233. Rawal, V. H.; Jones, R. J.; Cava, M. P. Photocyclization Strategy for the Synthesis of Antitumor Agent CC-1065 - Synthesis of Dideoxy PDE-I and PDE-II - Synthesis of Thiophene and Furan Analogs of Dideoxy PDE-I and PDE-II. *Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*, 19-28.
234. Tom, N. J.; Simon, W. M.; Frost, H. N.; Ewing, M. Deprotection of a Primary Boc Group under Basic Conditions. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 905-906.
235. Armstrong, D. J.; Hu, E. H.; Kelly, M. J.; Layton, M. E.; Li, Y.; Liang, J.; Rodzinak, K. J.; Rossi, M. A.; Sanderson, P. E.; Wang, J. Inhibitors of Akt Activity. 07.06.2006, **2006**.
236. Leuckart, R. B., E. Über Die Einwirkung Von Ammoniumformiat Auf Benzaldehyd Und Benzophenon. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **1886**, *19*, 2128-2131.
237. Wallach, O. Über Methylamin. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **1891**, *24*, 3992-3993.
238. Lee, S. C.; Park, S. B. Novel Application of Leuckart-Wallach Reaction for Synthesis of Tetrahydro-1,4-Benzodiazepin-5-Ones Library. *Chemical Communications* **2007**, 3714-3716.
239. Frederick, M. O.; Kjell, D. P. A Synthesis of Abemaciclib Utilizing a Leuckart-Wallach Reaction. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56*, 949-951.
240. Pollard, C. B. Y., D. C. The Mechanism of the Leuckart Reaction. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 661-672.
241. Siebert, C. D. Das Bioisosterie-Konzept *Chem. Unserer Zeit* **2004**, *38*, 320-324.
242. Hansen, F. K. Pyrimidin-Analoga Des Analgetikums Flupirtin PhD Thesis, Universität Hamburg, Universität Hamburg, **2009**.
243. Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem Rev* **1996**, *96*, 3147-3176.
244. Fadeyi, N. Fluorine in Medicinal Chemistry. <http://fluoride-class-action.com/wp-content/uploads/fluorine-in-medicinal-chemistry-vanderbilt-edu.pdf> (**28.08.2017**).
245. Thayer, A. M. Fabulous Fluorine. <http://cen.acs.org/articles/84/i23/Fabulous-Fluorine.html> (**28.08.2017**).
246. Åkerlöf, G. T. H. E. The Solubility of Some Strong, Highly Soluble Electrolytes in Methyl Alcohol and Hydrogen Peroxide-Water Mixtures at 25° *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1746-1750.
247. Pownceby, M. I.; Jenkins, D. H.; Ruzbacky, R.; Saunders, S. Solubilities of Ammonia and Ammonium Chloride in Ammoniated and Nonammoniated Methanol and Ethylene Glycol between 298 K and 353 K. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2012**, *57*, 1449-1455.
248. Gamble, A. B.; Garner, J.; Gordon, C. P.; O'Conner, S. M. J.; Keller, P. A. Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under Ultrasonic Irradiation. *Synthetic Communications* **2007**, *37*, 2777-2786.
249. Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Curr Med Chem* **2005**, *12*, 23-49.
250. Dawe, C. J.; Banfield, W. G.; Morgan, W. D.; Slatick, M. S.; Curth, H. O. Growth in Continuous Culture, and in Hamsters, of Cells from a Neoplasm Associated with Acanthosis Nigricans. *J Natl Cancer Inst* **1964**, *33*, 441-456.
251. Keydar, I.; Chen, L.; Karby, S.; Weiss, F. R.; Delarea, J.; Radu, M.; Chaitcik, S.; Brenner, H. J. Establishment and Characterization of a Cell Line of Human Breast Carcinoma Origin. *Eur J Cancer* **1979**, *15*, 659-670.

252. Engel, L. W.; Young, N. A.; Tralka, T. S.; Lippman, M. E.; O'Brien, S. J.; Joyce, M. J. Establishment and Characterization of Three New Continuous Cell Lines Derived from Human Breast Carcinomas. *Cancer Res* **1978**, *38*, 3352-3364.
253. McGrath, C. M.; Grant, P. M.; Soule, H. D.; Glancy, T.; Rich, M. A. Replication of Oncornavirus-Like Particle in Human Breast Carcinoma Cell Line, MCF-7. *Nature* **1974**, *252*, 247-250.
254. Lasfargues, E. Y.; Coutinho, W. G.; Redfield, E. S. Isolation of Two Human Tumor Epithelial Cell Lines from Solid Breast Carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **1978**, *61*, 967-978.
255. Tachibana, M.; Miyakawa, A.; Tazaki, H.; Nakamura, K.; Kubo, A.; Hata, J.; Nishi, T.; Amano, Y. Autocrine Growth of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder Induced by Granulocyte-Colony Stimulating Factor. *Cancer Res* **1995**, *55*, 3438-3443.
256. Niederst, M. J.; Engelman, J. A. Bypass Mechanisms of Resistance to Receptor Tyrosine Kinase Inhibition in Lung Cancer. *Sci Signal* **2013**, *6*.
257. Wang, S.; Song, Y.; Liu, D. Eai045: The Fourth-Generation EGFR Inhibitor Overcoming T790M and C797S Resistance. *Cancer Lett* **2017**, *385*, 51-54.
258. Jia, Y.; Yun, C. H.; Park, E.; Ercan, D.; Manuia, M.; Juarez, J.; Xu, C.; Rhee, K.; Chen, T.; Zhang, H.; Palakurthi, S.; Jang, J.; Lelais, G.; DiDonato, M.; Bursulaya, B.; Michellys, P. Y.; Epple, R.; Marsilje, T. H.; McNeill, M.; Lu, W.; Harris, J.; Bender, S.; Wong, K. K.; Jänne, P. A.; Eck, M. J. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) Resistance with Mutant-Selective Allosteric Inhibitors. *Nature* **2016**, *534*, 129-132.
259. Narayanan, A.; Jones, L. H. Sulfonyl Fluorides as Privileged Warheads in Chemical Biology. *Chem Sci* **2015**, *6*, 2650-2659.
260. Sodhi, J. K.; Delarosa, E. M.; Halladay, J. S.; Driscoll, J. P.; Mulder, T.; Dansette, P. M.; Khojasteh, S. C. Inhibitory Effects of Trapping Agents of Sulfur Drug Reactive Intermediates against Major Human Cytochrome P450 Isoforms. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*.
261. Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten Things You Should Know About Protein Kinases: Iuphar Review 14. *Br J Pharmacol* **2015**, *172*, 2675-2700.
262. Quambusch, L. Design Und Synthese Kovalent-Allosterischer Liganden Zur Isoform-Selektiven Adressierung Der Proteinkinase Akt. unveröffentlichte Masterarbeit, Technische Universität Dortmund, Dortmund, Deutschland, **2017**.

Eidesstattliche Versicherung

Smith, Steven

Name, Vorname

172234

Matrikelnummer

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Dortmund, 19. Oktober 2017

Ort, Datum

UnterschriftTitel der Dissertation:**„Design, Synthese und massenspektrometrische Analyse kovalenter und kovalent-reversibler Kinaseinhibitoren“**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

Dortmund, 19. Oktober 2017

Ort, Datum

Unterschrift

Anhang

Tabelle A1 Bestimmung der EC₅₀-Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren und literaturbekannter Referenzverbindungen gegen die Krebszelllinien A549 und H358.^a

N°	EC ₅₀ [μ M]	
	A549 (KRAS ^{G12S})	H358 (KRAS ^{G12C})
1a	n.i. ^b	n.i.
1b	23.3 ± 7.77	19.7 ± 11.4
1c	21.7 ± 7.44	19.9 ± 7.44
1d	3.45 ± 1.05	2.30 ± 0.85
1e	22.2 ± 3.83	17.7 ± 4.62
1f	n.i.	n.i.
1g	n.i.	n.i.
1h	n.i.	n.i.
1i	n.i.	11.8 ± 2.56
1j	20.0 ± 4.75	6.23 ± 1.52
1k	n.i.	n.i.
1n	n.i.	n.i.
1o	n.i.	n.i.
1p	27.1 ± 2.88	16.8 ± 0.82
1q	19.9 ± 4.20	16.3 ± 1.91
23g	n.i.	n.i.
23h	n.i.	n.i.
23i	n.i.	n.i.

^a Die ermittelten EC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmungen generiert wurden. Die EC₅₀-Werte der EGFR-Varianten wurden von M.Sc Hanna Lea Tumbrink und M.Sc Jonas Lategahn bestimmt. ^b n.i. kein inhibitorischer Effekt bei einer Inhibitorkonzentration von 30 μ M.

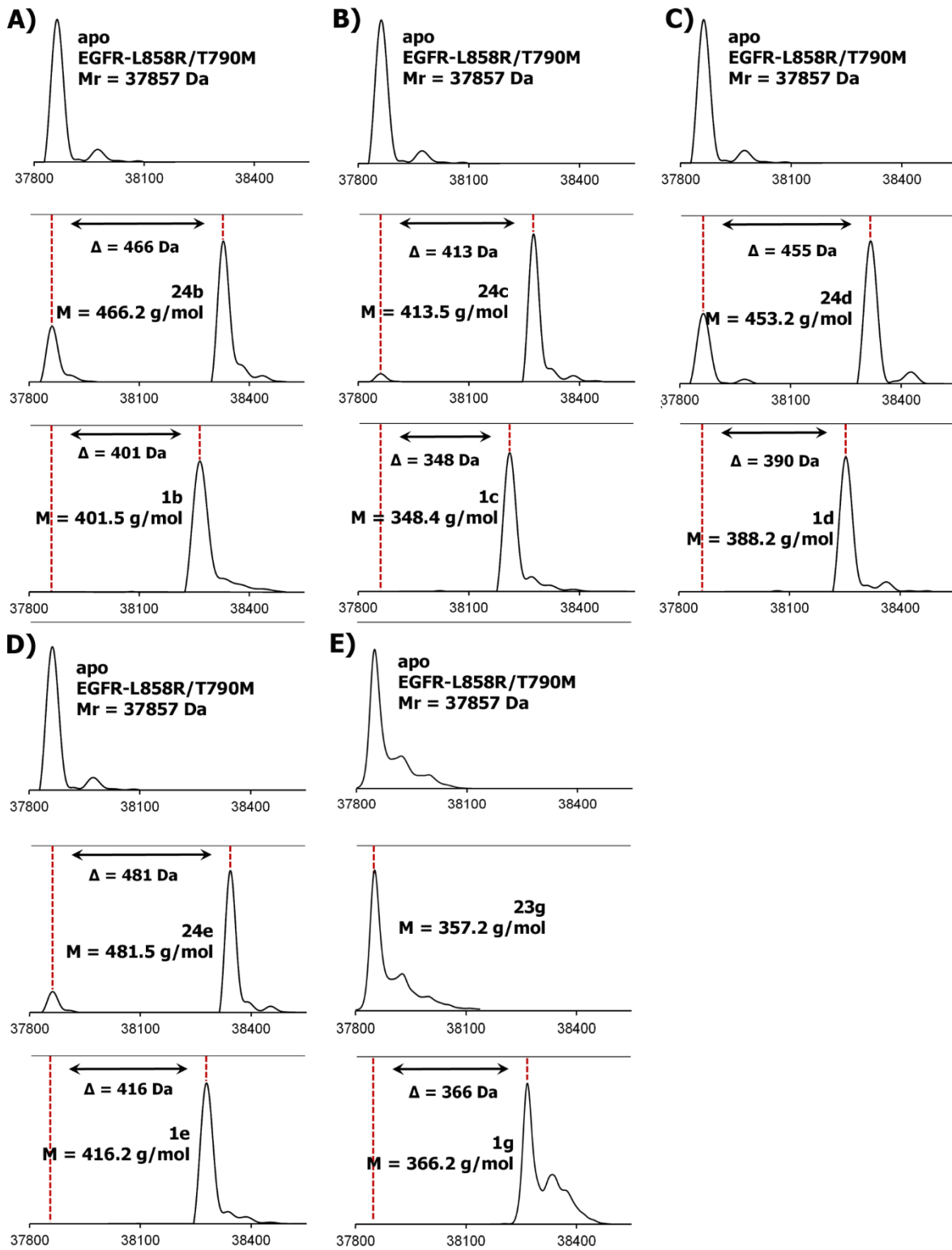


Abbildung A1 Dekonvolvierte MS-Spektren von EGFR^{L858R/T790M} inkubiert mit DMSO (jeweils oberes Spektrum **A – E**) und verschiedenen Kombinationen von Inhibitoren. **A – D**) kovalent-reversibler Inhibitoren **24b – e** (mittleres Spektrum) und kovalente Inhibitoren **1b – e** (unteres Spektrum). **E**) reversibler Inhibitor **23g** (mittleres Spektrum) sowie kovalenter Inhibitor **1g** (unteres Spektrum).

Lebenslauf

Steven Smith

Geburtstag	10. Februar 1985
Geburtsort	Darmstadt
Staatsangehörigkeit	deutsch-amerikanisch

Studium und berufliche Ausbildung

seit Sep. 2013	Technische Universität Dortmund (Prof. Dr. Daniel Rauh) Promotion im Fach Chemie und chemische Biologie
März- 2011 – Mai 2013	Technische Universität Darmstadt Master Studium im Fach Chemie Schwerpunktfach: Organische Chemie Hauptfach: Biochemie, Makromolekulare Chemie abgeschlossen als Master of Science
Nov. 2012 – Mai 2013	Merck KGaA, Darmstadt (Dr. Tatjana Ross/Prof. Dr. Boris Schmidt) Master Thesis <i>Synthese neuartiger bizyklischer Heteroaromaten und deren Verwendung in der Wirkstoffentwicklung</i>
Sep. 2012 – Okt. 2012	Merck KGaA, Darmstadt (Dr. Tatjana Ross / Prof. Dr. Boris Schmidt) Forschungspraktikum im Bereich des Organischen Chemie (TU Darmstadt)
Nov. 2011 – Feb. 2012	Evonik Industries AG, Darmstadt (Dr. Jan-Hendrik Schattka / Prof. Dr. Markus Biesalski) Forschungspraktikum im Bereich der Makromolekularen Chemie (TU Darmstadt)
Okt. 2007 – Feb. 2011	Technische Universität Darmstadt Bachelor Studium im Fachbereich Chemie abgeschlossen als Bachelor of Science Bachelor Thesis (Prof. Dr. Schmidt): <i>Entwicklung von GSK-3 Inhibitoren</i>
Sep. 2004 – Jul. 2007	Degussa-Röhm GmbH & Co. KG (Evonik Industries AG) Ausbildung zum Chemielaboranten
Sep. 2001 – Jun. 2004	Gymnasium Schuldorf Bergstraße Abitur