

Design, Synthese, biochemische und zelluläre
Evaluierung von Inhibitoren zur Umgehung von
Wirkstoffresistenzen in KIT-abhängigen
gastrointestinalen Stroma-Tumoren (GIST)

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Helena Kaitsiotou

aus Dortmund

Dortmund 2018

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

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2014 bis Dezember 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich Medizinische Chemie und Chemische Biologie in der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden in der Taros Chemicals GmbH & Co. KG erstellt. Im Rahmen dieser Arbeit ist folgende Publikation entstanden:

Kaitsiotou, H.; Keul, M.; Hardick, J.; Mühlenberg, T.; Ketzer, J.; Ehrh, C.; Krüll, J.; Medda, F.; Koch, O.; Giordanetto, F.; Bauer, S.; Rauh, D., Inhibitors to Overcome Secondary Mutations in the Stem Cell Factor Receptor KIT. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (21), 8801-8815.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in der oben genannten Publikation veröffentlicht. Außerdem entstand im Rahmen dieser Arbeit die Masterarbeit von Jasmin Krüll (2015), übernommene Ergebnisse sind gekennzeichnet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1. Proteinkinasen.....	1
1.1.1 Struktur und Aktivitätsregulierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	5
1.1.2 Die Rezeptor-Tyrosinkinase KIT.....	11
1.1.3 Kinaseinhibitoren.....	17
1.1.4 Therapie KIT-abhängiger gastrointestinaler Stromatumore.....	20
2 Motivation und Zielsetzung.....	25
3 Strukturbasiertes Design von KIT-Inhibitoren.....	27
3.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign.....	27
3.2 Grundlagen von MD-Simulationen.....	30
3.3 Strukturelle Analyse von KIT ^{wt} , KIT ^{V559D/V654A} und KIT ^{V559D/T670I} Mutanten..	31
3.3.1 Strukturbasiertes Inhibitor-design zu Adressierung von KIT.....	39
3.3.2 Optimierung des Selektivitätsprofils der Inhibitoren zu VEGFR2.....	45
3.3.3 Synthese der fokussierten strukturbasierten Substanz-Bibliothek.....	51
3.3.4 Biochemische Charakterisierung der KIT-Inhibitoren.....	64
3.3.4.1 Theoretischer Hintergrund.....	64
3.3.4.2 KIT-Varianten - Biochemische Evaluierung.....	66
3.3.4.3 VEGFR2 - Biochemische Evaluierung.....	71
3.3.5 Aktivität der Inhibitoren in GIST-Zellkulturen.....	73
3.3.5.1 Etablierung zellulärer Testsysteme zur Charakterisierung von TKIs für KIT.....	73
3.3.5.1.1 Vorstellung der verwendeten Zelllinien.....	73
3.3.5.1.2 Theoretischer Hintergrund.....	75
3.3.5.1.3 Zellzahloptimierung.....	75
3.3.5.2 Evaluierung in humanen GIST-Zelllinien.....	81

3.3.6	Pharmakokinetische Charakterisierung.....	86
3.3.7	Profilierung von 7f und 10	88
3.4	<i>Scaffold Hopping</i> zur Generierung von Hybridinhibitoren für KIT	91
3.4.1	<i>Scaffold Hopping</i>	91
3.4.2	Entwicklung der Hybridinhibitoren	92
3.4.3	Synthese einer fokussierten Hybridsbibliothek.....	95
3.4.4	Biochemische Evaluierung	98
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	102
4	Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden KIT-Inhibitoren.....	106
4.1	Kovalente Inhibitoren	106
4.2	Kovalente Adressierung von KIT ^{wt}	108
4.2.1	Synthese kovalenter KIT-Inhibitoren	112
4.2.2	Biochemische Charakterisierung.....	113
4.2.3	Zelluläre Charakterisierung.....	116
4.2.4	Massenspektrometrische Evaluierung	119
4.2.5	Tandem-Massenspektrometrie	122
4.2.6	Kinetische Parameter K_i und k_{inakt}	123
4.3	Zusammenfassung und Ausblick: Kovalente KIT-Inhibitoren	125
5	Kurzfassung.....	132
	Abstract	135
6	Experimenteller Teil	138
6.1	Organische Synthese.....	138
6.1.1	Allgemeine Anmerkungen	138
6.1.2	Materialien und Methoden	138
6.2	Synthesvorschriften und Charakterisierung der Verbindungen.....	140
6.2.1	Synthese reversibler KIT-Inhibitoren	140
6.2.2	Synthese reversibler KIT Inhibitoren: Oxadiazole-Derivate	168

6.2.3	Synthese irreversibler KIT Inhibitoren	181
6.3	Biochemische Charakterisierung	188
6.3.1	Allgemeine Anmerkungen.....	188
6.3.2	Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™)	189
6.3.2.1	Etablierung des HTRF-System	189
6.3.2.2	Arbeitsanweisung zur Generierung von IC ₅₀ -Werten mittels HTRF®	191
6.3.2.3	Arbeitsanweisung zur Herstellung der verwendeten Puffer	192
6.4	Charakterisierung in GIST-Zelllinien	193
6.4.1	GIST-Zelllinien.....	193
6.4.2	Methoden und Materialien	193
6.4.2.1	Arbeitsanweisung zur Generierung von GI ₅₀ -Werten mittels Zellviabilitätsassay	196
6.4.2.2	Western Blot Analyse.....	197
6.4.3	Charakterisierung der pharmakokinetischen Parameter.....	197
6.5	Computergestützte Methoden.....	199
6.5.1	Molekulardynamik Simulation.....	199
6.5.2	MM-PB(GB)SA Berechnungen.....	201
6.5.3	Docking	202
6.5.4	Liganden-Bindungsstellenvergleich.....	202
7	Literaturverzeichnis.....	204
	Danksagung	218
	Eidesstattliche Erklärung	220
	Lebenslauf	221

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AIBN	2,2'-Azobis(2-methylpropionitril)
AKT	Proteinkinase B
AS	Aminosäure(n)
AUC	<i>Area under the curve</i>
Boc	<i>tertiär-Butyloxycarbonyl</i>
bp	Basenpaar
BRAF	<i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Stoffmengenkonzentration
ca.	circa
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
cSrc	Proto-Onkogene Tyrosin-Protein Kinase Src (Sarkoma)
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethen
DCM	Dichlormethan
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Em	Emission
eq.	Äquivalent(e)
ErbB	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor Family</i>

ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
Flt1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
Flt3	<i>Fms related tyrosine kinase 3</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GC	Gaschromatographie
GI ₅₀	Halmaximale Wachstumsinhibition
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HATU	1-[bis(Dimethylamin)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]pyridinium-3-oxid-hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HSPG/Heparin	Heparansulfat Proteoglykan/Herparin
HTRF®	<i>homogeneous time resolved fluorescence</i>
HTS	Hochdurchsatzdurchmusterung (<i>high throughput screening</i>)
Hz	Hertz
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IGF1	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren 1
<i>J</i>	Kopplungskonstante
JAK2	Janus Kinase 2
k	Geschwindigkeitskonstante
kcal/mol	Kilokalorie pro Mol
KD	Kinase-Domäne
KDR	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2/ Kinase insert domain receptor</i>
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor

K_M	Michaelis-Konstante
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LRR	<i>Leucine-rich repeat receptor kinases</i>
LYN	Tyr-Proteinkinase Lyn
M	mol/L
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD-Simulation	Molekulardynamik-Simulation
MEK1/2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 1
min	Minute(n)
MM-PB(GB)SA	molekularmechanische Poisson Boltzmann (<i>Generalized Born</i>) Lösemittel zugänglicher Oberflächenbereich
MS	Massenspektrometrie
MuSK	Muskelspezifische Rezeptortyrosinkinase
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NMR	Kernmagnetische Resonanz
ns	Nanosekunde(n)
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
p38	Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PCP	Pyridinchromiumperoxid
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDB	Protein-Datenbank
PE	Petrolether
PFS	Progressionsfreies Überleben
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC- γ	Phosphoinositid-Phospholipase C- γ
PLI	<i>Serpin family F member 2</i>
PMEMD	<i>Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics PMEMD</i>

ppm	<i>parts per million</i>
PTB	Phosphotyrosin-bindende Domänen
R	Rest
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
Ret	Rezeptor-Tyrosinkinase Ret
RLU	<i>Relative light unit</i>
RMSD	<i>root-mean-square deviation of atomic positions</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
rt	Raumtemperatur
RTK(s)	Rezeptortyrosinkinase(n)
SAR	Struktur-Aktivitätsbeziehung (<i>structure activity relationship</i>)
SCF	Stammzellfaktor
SFK	SCR Kinasefamilie
SH2	Src-Homologiedomäne 2
SH3	Src-Homologiedomäne 3
SOCS6	<i>Suppressor of cytokine signaling 6</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIE2	Angiopoetin-Rezeptor
TK(s)	Tyrosinkinase(n)
TKD(s)	Tyrosinkinasedomäne(n)
TMSA	Trimethylsilylacetylen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol <i>p</i> -(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenylether
TrkA	<i>Tropomyosin receptor kinase A</i>
Troc	2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
vgl.	vergleiche
vs.	versus

vSrc	Virale Sarkoma Kinase
wt	Wildtyp
XL665	Heterohexameres Phycobiliprotein-Pigment aus Rotalgen
z. B.	zum Beispiel
δ	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1. Proteinkinasen

Viele Erkrankungen wie Krebs, Immuninsuffizienz und Stoffwechselstörungen sind auf eine durch Mutation, Amplifikation und/oder Chromosomentranslokation verursachte, fehlerhafte Regulation von Proteinkinasen zurückzuführen. Aus diesem Grund stellen Proteinkinasen eine wichtige Klasse an Zielmolekülen für die moderne Wirkstoffforschung und -entwicklung dar. Das menschliche Genom codiert für über 500 Proteinkinasen, die die reversible Phosphorylierung der Hydroxyl-Seitenketten der Aminosäuren (AS) Ser, Thr und Tyr ihrer Substratproteine durch die Übertragung des γ -Phosphates von ATP katalysieren. Die dadurch resultierende Einflussnahme auf die globale Struktur und damit einhergehend die Aktivität und/oder Lokalisation ihrer Substrate ermöglicht Proteinkinasen, wichtige zelluläre Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren bzw. zu inhibieren.¹⁻⁵

Dadurch regulieren sie ein weites Spektrum physiologischer Prozesse, wie zum Beispiel zelluläre Proliferation und Differenzierung, Metabolismus, Zellzyklusregulation, Wachstum und Koordination von Immunantworten. Durch diese wesentliche Rolle in der Signaltransduktion kann die Fehlregulation von Proteinkinasen gravierende Folgen für den gesamten Organismus haben. Die Konsequenz kann die Entwicklung einer Vielzahl von Erkrankungen sein, beispielsweise Krebs, Autoimmun- und Stoffwechselerkrankungen.¹⁻⁴ Die Aktivität von Proteinkinasen wird durch Phosphatasen, die als ihre Antagonisten fungieren, durch Interaktionen mit anderen Proteinen sowie durch sogenannte *second messenger* oder Rezeptor-Ligand-Interaktionen reguliert.⁶

Die posttranslationale Phosphorylierung von Substratproteinen wurde bereits 1954 von Burnett *et al.* nachgewiesen, wobei ihre physiologische Relevanz bei der Entstehung von Erkrankungen erst über 20 Jahre später erkannt wurde.⁷ Die fehlerhaft regulierte Signaltransduktion durch Proteinkinasen als Ursache bestimmter Erkrankungen wurde erstmals 1976 mit der Entdeckung des Proto-Onkogens *c-src* durch Michael Bishop und Harold E. Varmus nachgewiesen. Das entsprechende Genprodukt Src (*sarcoma*) ist eine Tyrosinkinase (TK), welche als zelleigenes Homolog des ersten entdeckten Onkogens vSrc des Rous-Sarkom-Virus erkannt wurde.

Src Fehlregulationen sind mit einer unkontrollierten Zellproliferation assoziiert.⁸⁻⁹ Die Entdeckung von Bishop und Varmus lieferte den Grundstein für das Verständnis der molekularen Genetik von Krebs als Produkt unkontrolliertem Zellwachstums durch fehlregulierte Kinaseaktivität und wurde 1989 mit den Nobelpreis für Physiologie und Medizin honoriert. Diese Erkenntnis bildete außerdem das Fundament für die rationale Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe für die Krebstherapie, was 2001 zur Zulassung des ersten Kinaseinhibitors Imatinib (Gleevec[®]) zur Therapie von chronischer myeloischer Leukämie (CML) führte.¹⁰⁻¹¹ Die Veröffentlichung der ersten gelösten Ko-Kristallstruktur der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA)¹² im Jahr 1991 trug ebenfalls entscheidend zur Entwicklung von Kinaseinhibitoren bei. Anhand dieser Komplexstruktur konnten erstmals die konservierten, übergeordneten Struktur motive der katalytischen Domäne von Proteinkinasen illustriert werden (Abbildung 1A).¹³

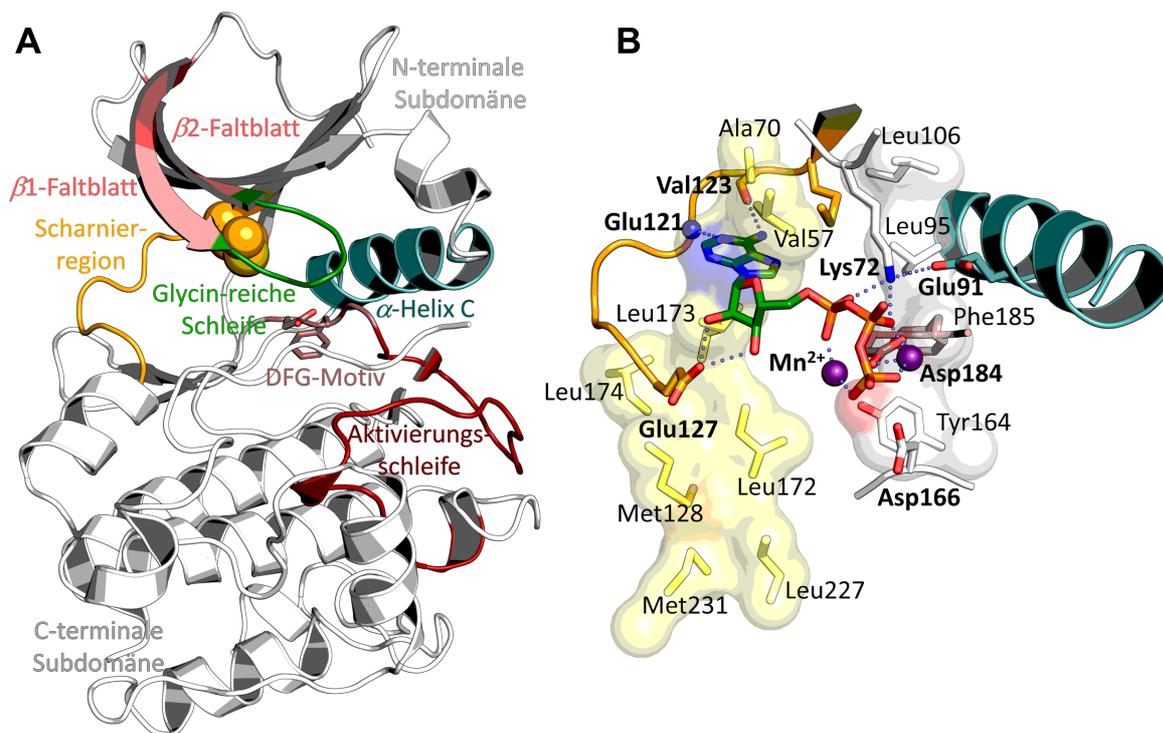


Abbildung 1: **A**) Röntgenkristallstruktur (PDB 1atp) der konservierten katalytischen Domäne einer Proteinkinase (PKA). Die spezifischen Strukturelemente sind farblich gekennzeichnet. **B**) ATP im aktiven Zentrum der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). Das Wasserstoffbrückennetzwerk sowie die Koordination zu Mn^{2+} -Ionen (violette Kugeln), die den Transfer des Phosphats einleiten, sind als blaue Punkte dargestellt. Die am Phosphattransfer beteiligten Aminosäurereste sind graphisch hervorgehoben (PDB 1atp). Das regulatorische (rechts, weiß) sowie das katalytische (links, hellgelb) Rückgrat sind als Oberflächendarstellung hervorgehoben.

Die katalytische Domäne setzt sich aus einer N-terminalen, aus fünf antiparallel ausgerichteten β -Faltblättern und der α -Helix C aufgebauten, sowie einer C-terminalen, vorwiegend aus α -helikalen Strukturen geformten Subdomäne zusammen. Die beiden Domänen werden über eine flexible Scharnierregion miteinander verbunden.

Die zwischen den beiden Domänen befindliche Region wird als ATP-Bindungstasche oder als aktives Zentrum bezeichnet. Hier wird die Adenin-Einheit des Kofaktors ATP über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptid-Rückgrat der Scharnierregion und dem der Glycin-reichen Schleife gebunden und für die Katalyse-Funktion der Kinase bereitgestellt (Abbildung 1B). Am Übergang von N-terminaler Subdomäne und Scharnierregion befindet sich der sogenannte Türsteherrest. Diese Aminosäure begrenzt durch ihre relative Größe und Polarität den Zugang zur ATP-Bindetasche sowie zu der dahinter liegenden hydrophoben Tasche. Besonders in Bezug auf Entwicklung von Wirkstoffresistenzen hat dieser Aminosäurerest eine Sonderstellung. Die mutationsbedingte Substitution dieses Restes durch sterisch anspruchsvolle, hydrophobe AS wie beispielsweise Ile oder Met kann zur Repulsion zwischen Türsteherrest und Wirkstoff führen, was dessen inhibitorische Aktivität gegenüber der Kinase verringern kann.¹⁴⁻¹⁵ Die zwischen β 1- und β 2-Faltblatt der N-terminalen Subdomäne befindliche Glycin-reiche Schleife (GxGx Φ G, G: Gly; x: beliebige AS; Φ : meist Tyr oder Phe) fixiert über ionische Wechselwirkungen die α - und β -Phosphatgruppen des ATP-Moleküls und positioniert so das γ -Phosphat für die Katalyse.¹⁶ Der Glycin-reichen Schleife folgt ein konserviertes Val (PKA: Val57), welches van der Waals Wechselwirkungen mit ATP eingeht. Ein weiteres Motiv innerhalb dieser Schleife (AxK) beinhaltet das katalytische Lysin (PKA: Lys72), welches über Wasserstoffbrücken mit den Phosphaten des ATP-Moleküls und mit der α -Helix C (hier: Glu91) interagiert. Die α -Helix C ist ein essentielles regulatorisches Element in Proteinkinasen.¹⁷ Sie fungiert als weiteres Bindeglied zwischen N- und C-terminaler Subdomäne, wechselwirkt mit der Aktivierungsschleife und ist dadurch maßgeblich an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt. Die Konformation der α -Helix C kann durch den Aktivierungszustand der Kinase sowie durch die Bindung von Liganden stabilisiert werden. Die α -Helix C beinhaltet zudem ein konserviertes Glu (PKA: Glu91), das eine Salzbrücke zum Lys (Lys72) bildet, die in allen Kinasefamilien vorhanden ist und als typisches Kennzeichen der aktiven Konformation einer Kinase gilt (Abbildung 1B).¹³ Die Aktivierungsschleife ist ein weiteres wichtiges Strukturelement für die Regulation der Kinaseaktivität.

Sie enthält das konservierte DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly), welches ebenfalls unterschiedliche Konformationen annehmen kann und damit Einfluss auf die Bildung der aktiven und inaktiven Kinasekonformation hat.

Die durch die Phosphorylierung eines Ser-, Thr- oder Tyr-Restes (PKA: Thr197) in der Aktivierungsschleife eingeführte Ladungsdichte führt zur Ausbildung eines komplexen Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen den Aminosäure-Resten der α -Helix C (Glu91), des DFG-Motivs (Asp184) und der Aktivierungsschleife, was die aktive Konformation der Kinase definiert bzw. stabilisiert. In dieser aktiven Konformation richtet sich die Phe-Seitenkette in Richtung α -Helix C aus und besetzt dort eine hydrophobe Tasche, während das Asp (PKA: Asp184) sich im aktiven Zentrum an der Katalyse des Phosphattransfers beteiligt (DFG-*in*). Die Phe-Seitenkette partizipiert auf diese Weise in der Ausbildung eines weiteren konservierten Strukturmotivs, dem sogenannten regulatorischen Rückgrat (*R-Spine*), welches zur Stabilisierung der aktiven Konformation beiträgt.¹³ Neben dem Phe185 des DFG-Motivs setzt es sich aus den hydrophoben Aminosäureseitenketten von Leu106 (N-terminale Subdomäne), Leu95 (α -Helix C) und Tyr164 (C-terminale Subdomäne) zusammen (Abbildung 1B, gelbe Oberflächendarstellung) und durchzieht und verbindet so die beiden Subdomänen im Inneren der Kinase wie ein flexibles Rückgrat, dessen strukturelle Assemblierung ein weiteres Merkmal der aktiven Konformation der Kinasedomäne darstellt. Die Mg^{2+} -Ionen dienen der Koordination der anionischen Phosphatreste des ATPs um dessen elektrostatische Repulsion mit der ebenfalls stark elektronegativen Region im aktiven Zentrum, welche die ATP Phosphate umgibt, zu kompensieren. Mit Asp166 als katalytische Base ermöglichen die Mg^{2+} -Kofaktoren den nukleophilen Angriff des Substratproteins auf den γ -Phosphatrest des ATP-Moleküls und damit den Phosphat-Transfer.^{13, 18-19} Das konservierte Strukturmotiv des katalytischen Rückgrats (*catalytic Spine; C-spine*)²⁰, welches ebenfalls Aminosäurereste beider Subdomänen umfasst, unterscheidet sich von dem regulatorischen Rückgrat darin, dass dessen Ausbildung erst nach der Bindung von ATP unter Einbeziehung des aromatischen Adeninrings komplettiert wird.¹³ In der katalytisch inaktiven Kinasekonformation (DFG-*out*) ist das regulatorische Rückgrat unterbrochen, die Aktivierungsschleife liegt in einer ungeordneten Konformation vor und das DFG-Motiv ist um ca. 180° gedreht, sodass die sterisch anspruchsvolle Phe-Seitenkette in die ATP-Bindungstasche hineinragt und die ATP-Bindung verhindert. Der Asp-Rest nimmt die Position des Phe-Restes außerhalb des aktiven Zentrums ein und steht für die Bindung von ATP nicht mehr zur Verfügung. In der DFG-*out* Konformation öffnet sich eine an die ATP-Bindetasche angrenzende, hydrophobe allosterische Tasche im Bereich des regulatorischen Rückgrats.²¹

1.1.1 Struktur und Aktivitätsregulierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Das menschliche Genom codiert für 90 Tyrosinkinasen, von denen 58 zum Rezeptor-Tyrosinkinasentyp gehören, die in 20 Subfamilien aufgeteilt sind.²² Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) sind aufgrund ihrer Rolle in der zellulären Signaltransduktion die Mediatoren für die Zell-Zell-Kommunikation und spielen als Proteinkinasen eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung, Metabolismus und Apoptose.²³ Allen RTKs ist die konservierte molekulare Struktur der katalytischen Domäne (KD) gemein. Bei ihnen handelt es sich um *singlepass* Transmembran-Rezeptoren, die im Allgemeinen durch Liganden induzierte Oligomerisation (typischerweise Dimerisierung) aktiviert werden.²³ Sie werden in eine extrazelluläre Domäne, welche die Liganden-Bindungs-Domäne beinhaltet und unter anderem aus Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Domänen, Leu- oder Cys-reichen Domänen oder aus einer Kombination von beiden besteht, und in eine cytoplasmatische Domäne unterteilt. Die cytoplasmatische Domäne setzt sich zusammen aus der Proteintyrosinkinase-Domäne (TKD), einer zusätzlichen Carboxy-(C-)terminalen- und einer Juxtamembran (JM)-Regulationsregion. Eine einzelne transmembrane Helix verbindet die beiden Domänen miteinander (siehe Abbildungen 4 und 5). Es wird vermutet, dass diese α -Helix in manchen Fällen zur Dimerisierung beiträgt, ihre genaue Funktion ist allerdings noch nicht geklärt.²⁴

Die Di- und Oligomerisierung der RTKs wird durch extrazelluläre Bindung ihrer Liganden, den Wachstumsfaktoren induziert, wobei allerdings auch RTKs existieren, die ohne das Wirken eines Liganden oligomerisieren können (z. B. Insulin Rezeptor und der IGF1-Rezeptor).²⁵ Die Bindung eines Liganden ist allerdings zwingend notwendig, um die aktive Dimer- bzw. Oligomerkonformation der individuellen Rezeptormoleküle zu stabilisieren, unabhängig vom Vorliegen einer inaktiven monomeren Konformation oder eines bereits ausgebildeten inaktiven Oligomers.²⁴ Im Allgemeinen werden für die meisten RTKs vier Dimerisierungsmodi unterschieden, die eine zugehörige, intrazellulär liegende TKD final aktivieren.

Bei der Liganden-induzierten Dimerisierung von RTKs interagiert ein bivalenter Ligand (z. B. ein Wachstumsfaktor) gleichzeitig mit zwei Rezeptormolekülen und induziert die Ausbildung eines dimeren Komplexes.²⁴ Dieser Liganden-vermittelte Dimerisierungsmodus wurde in Röntgenkristallstrukturen von Fragmenten der Liganden-bindenden Domäne mit ihren entsprechenden Liganden für z. B. KIT²⁶, Flt1²⁷ und NGF/TrkA²⁸ nachgewiesen.

Dabei wird zwischen zwei mechanistischen Extremen und zwei intermediären Fällen unterschieden (Abbildung 2).

Zum einen kann die Dimerisierung entweder Liganden-vermittelt erfolgen, wobei die Rezeptoren keinen direkten Kontakt eingehen (Abbildung 2A), oder Rezeptor-vermittelt ablaufen, wobei der Ligand nicht direkt zur Dimer-Verknüpfung beiträgt (Abbildung 2D). Zum anderen sind im intermediären Fall sowohl Rezeptor-vermittelte als auch Liganden-vermittelte Komponenten an der Dimerisierung beteiligt (Abbildung 2B und C).²⁴

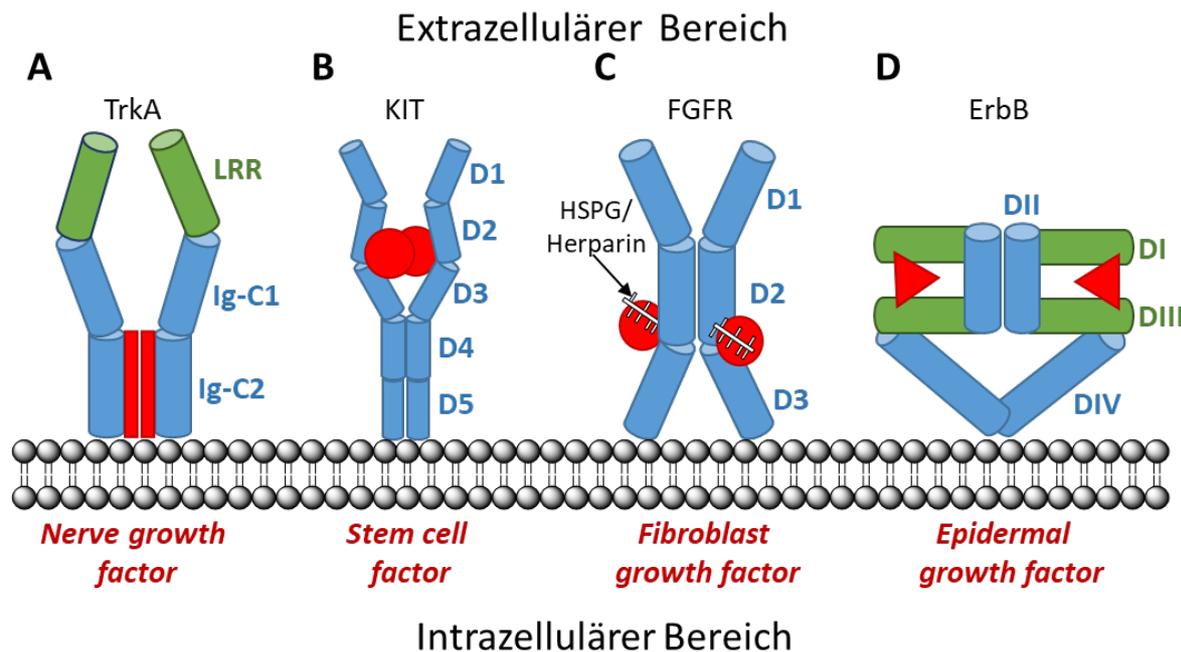


Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Dimerisierungsmodi von RTKs am Beispiel von TrkA, KIT, FGFR und ErbB. **A)** Die Vernetzung der TrkA-Monomere erfolgt über den *nerve growth factor* (rot) ohne direkten Kontakt zwischen den Rezeptormolekülen.²⁹ **B)** KIT wird durch den *stem cell factor* (rot) verbunden. Die Liganden-induzierte Rezeptoraktivierung führt zur Umorientierung zweier Ig-ähnlichen Domänen (D4 und D5), welche innerhalb des Rezeptordimers in Wechselwirkung zueinander treten. KIT ist ein Beispiel für die Kombination von Liganden- und Rezeptor-vermittelten Dimerisierungsmodus.³⁰ **C)** Das FGFR-Dimer ist über die Ig-ähnliche Domäne D2 verbunden. Die akzessorischen Heparin oder Heparansulfat-Proteoglycan Moleküle (weiße Stäbchen) wechselwirken ebenfalls mit der D2-Domäne.³¹ Zusätzlich dazu wechselwirkt jeweils ein *fibroblast growth factor*-Molekül (rot) jeweils mit den Ig-ähnlichen Domänen D2 und D3 der beiden FGFR-Moleküle. **D)** Die Rezeptordimerisierung des ErbB-Rezeptors ist vollständig Rezeptor-vermittelt. Der *epidermal growth factor* bindet gleichzeitig zwei Bindungsstellen (DI und DIII) innerhalb desselben Rezeptormoleküls, was zu konformationellen Änderungen im Rezeptor führt, die eine zuvor verdeckte Dimerisierungsbindestelle in Domäne II freilegt. (Angelehnt an Lemmon *et al.*²⁴)

Der Aktivierungsmechanismus der intrazellulären TKD der verschiedenen RTKs weist wesentliche Unterschiede auf. Allen RTKs ist der charakteristische konservierte Aufbau der KD gemein.³² Sie nehmen in der aktiven Form die oben beschriebene Konfiguration an, um den γ -Phosphattransfer zu katalysieren.³³ Die Struktur der inaktiven Konformation der KD von RTKs unterscheidet sich allerdings deutlich von Rezeptor zu Rezeptor.

Die TKDs der Rezeptoren sind durch ein rezeptorspezifisches Netzwerk an intramolekularen Interaktionen *cis*-autoinhibiert. Das regulatorische Schlüsselereignis, welches zu der Aktivierung der RTKs führt, ist eine der Liganden-induzierten Rezeptordimerisierung folgende Auflösung der *cis*-Autoinhibition.

Einer dieser Regulationsmechanismen ist die Autoinhibition durch die Aktivierungsschleife. Am Beispiel des Insulin-Rezeptors wurde gezeigt, dass ein in der Aktivierungsschleife befindlicher Tyr-Rest an Stelle des physiologischen Substrats treten kann und somit zur *cis*-Autoinhibition führt. Die Aktivierungsschleife ist auf diese Weise in einer Konformation stabilisiert, die das aktive Zentrum blockiert und somit die Zugänglichkeit von ATP und Protein-Substraten verhindert.²⁴ FGFR1 weist eine andere Art von Aktivierungsschleifen-Interaktionen auf. Die Tyr-Seitenketten in der Aktivierungsschleife sind hier an einem intramolekularen Wechselwirkungsnetzwerk beteiligt, welches die inaktive Konformation stabilisiert und die den Rezeptor *cis*-autoinhibiert, indem er die Protein-Substrat-Bindung verhindert (Abbildung 3A).^{24, 34} Die Autoinhibition der RTKs in *cis* durch die Aktivierungsschleife weist also einen ähnlichen Mechanismus auf, der sich aber für die jeweilige RTK in der Konfiguration der Aktivierungsschleifen-Interaktionen zur Ausbildung einer *cis*-Autoinhibition unterscheiden kann. Die Liganden-vermittelte Dimerisierung und damit Aktivierung des Rezeptors führt zu der Phosphorylierung der Tyr-Reste in der Aktivierungsschleife in einer TKD des Dimers durch ihren Dimerpartner. Dieser Prozess wird als *trans*-Autophosphorylierung bezeichnet und resultiert in der Auflösung der *cis*-autoinhibitorischen Interaktionen und ermöglicht die Ausbildung der aktiven Konformation der TKD.³³

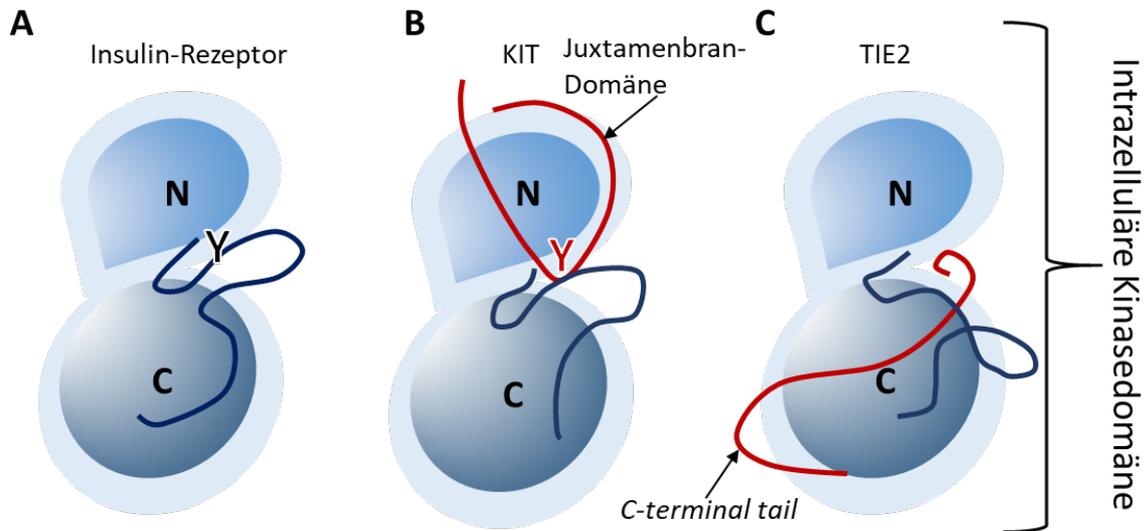


Abbildung 3: Die Dimerisierung der extrazellulären Domänen der RTKs aktiviert die intrazelluläre TKD. Hier sind die C-terminale Subdomäne (C; blau), die N-terminale Subdomäne (N; blau) und die Aktivierungsschleife (dunkelblau) dargestellt. Die Struktur der aktivierten TKDs sind sich sehr ähnlich³²; die Strukturen der inaktiven TKDs variieren stark von Rezeptor zu Rezeptor. Viele Rezeptoren werden durch folgende intramolekulare- oder *cis*-Interaktionen inhibiert; **A) *Insulin receptor-like*/Aktivierungsschleifen-Inhibition:** Die Aktivierungsschleife wechselwirkt direkt mit dem aktiven Zentrum der Kinase und blockiert entweder die Substratbindetasche oder die ATP-Bindetasche sowie Substratbindetasche gleichzeitig. Die Phosphorylierung des Schlüsseltyrosins (Y) führt zu konformationellen Änderungen innerhalb der Kinase, welche diese autoinhibitorischen Interaktionen unterbrechen und die aktive Konformation der Kinase stabilisieren. **B) *KIT-like*/JM-Domäne-Inhibition:** Die JM (rot) Wechselwirkt mit Strukturelementen des aktiven Zentrums (Aktivierungsschleife, α -Helix C, etc.) und stabilisiert die inaktive Konformation der Kinase. Die Phosphorylierung des Schlüsseltyrosins in der JM destabilisiert die autoinhibitorischen Wechselwirkungen und die Kinase kann die aktive Konformation einnehmen. **C) *Tie2-like* (*C-terminal tail inhibition*):** Das *C-terminal tail*-Ende wechselwirkt mit dem aktiven Zentrum der TKD und stabilisiert die inaktive Konformation. Auch hier führt die Phosphorylierung der Schlüsseltyrosine zur Auflösung des autoinhibierten Zustands.³⁵(Angelehnt an Lemmon *et al.*²⁴)

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die *cis*-Autoinhibition der RTK durch die JM-Domäne. Ein Strukturelement, das außerhalb der TKD liegt. Dieser Autoinhibitionsmechanismus ist beispielsweise bei MuSK³⁶, KIT³⁷ und Flt3³⁸ vorzufinden. Bestimmte Sequenzabschnitte der JM-Region interagieren mit mehreren Strukturelementen der TKD, einschließlich der beiden Subdomänen und der Aktivierungsschleife. Durch dieses Wechselwirkungsnetzwerk wird die inaktive Konformation der TKD stabilisiert (Abbildung 3B). Die Sequenz der JM und die daraus resultierenden autoinhibitorischen Wechselwirkungen mit der TKD variieren innerhalb der unterschiedlichen RTKs. Allen sind strukturell konservierte Tyr-Reste gemein, die maßgeblich an den autoinhibitorischen Wechselwirkungen beteiligt sind. Diese Tyrosine werden im Zuge der Rezeptordimerisierung *trans*-phosphoryliert, lösen die *cis*-autoinhibitorischen Wechselwirkungen auf und führen so zu der Aktivierung des Rezeptors.³⁹⁻⁴¹

In einigen RTKs (z. B. Tie2) wird die TKD durch eine Region im *C-terminal tail cis*-autoinhibiert. Eine Region dieses Strukturelements, welche Tyrosin-Autophosphorylierungsstellen besitzt, blockiert die Substratzugänglichkeit zum aktiven Zentrum, sodass die TKD reversibel autoinhibiert wird. Durch die *trans*-Autophosphorylierung der Tyr des *C-terminal tails* werden diese autoinhibitorischen Wechselwirkungen gestört und die aktive Konformation kann stabilisiert werden (Abbildung 3C).⁴²⁻⁴³

Die *trans*-Autophosphorylierung der Tyrosine in den oben genannten regulatorischen Strukturelementen der TKDs ist ausschlaggebend für deren Aktivierung. Es wird davon ausgegangen, dass die autoinhibierte TKD eine ausreichende Kinaseaktivität besitzt, um im Liganden-stabilisiertem Rezeptordimer ihre Partnerrezeptorkinase zu *trans*-phosphorylieren.²⁴ Die beschriebenen *cis*-autoinhibitorischen Interaktionen sind flexibel, sodass die TKD zeitweise ihre Partnerkinase phosphorylieren kann und auch selbst phosphoryliert werden kann. Des Weiteren wird in Betracht gezogen, dass aus der Erhöhung der lokalen TKD-Konzentration bei der Liganden-induzierten Dimerisierung allosterische Effekte resultieren, die die Wahrscheinlichkeit der *trans*-Phosphorylierung einer TKD durch eine vorrübergehend aktive TKD erhöhen und die Rezeptoren aktivieren (allosterische Aktivierung).²⁴ Studien von Zhang und Knowles *et al.*⁴⁴⁻⁴⁵ zufolge existieren Ausnahmen für die oben genannten Regulationsmechanismen der RTK. EGFR/ErbB und Ret benötigen beispielsweise keine *trans*-Phosphorylierung, um aktiviert zu werden.⁴⁴⁻⁴⁵ Die gezielte Mutagenese und anschließende Kristallisation dieser RTK zeigten einen komplexen allosterischen Mechanismus für die Aktivierung der TKD.⁴⁴⁻⁴⁹

Das Primärsubstrat der RTKs sind die Rezeptoren selbst, die im Zuge der *trans*-Autophosphorylierung aktiviert werden. Die Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstellen (Tyrosine) in den TKD-Strukturelementen der RTK, die schlussendlich zur Aktivierung und Signaltransduktion durch den Rezeptor führen, erfolgt in einer bestimmten Reihenfolge.^{36, 50-51} Die erste Phase der Autophosphorylierung dient in erster Linie der Erhöhung der katalytischen Aktivität des Rezeptors, nachdem dieser einen aktivierenden Liganden gebunden hat. Nach der vorangegangenen Aktivitätserhöhung folgt die zweite Phase der Phosphorylierung. Es bilden sich Phosphotyrosin-basierte Bindungsstellen, welche direkt oder indirekt (durch die Bindung an Docking-Proteine) nachgeschaltete cytoplasmatische Signalmoleküle rekrutieren und aktivieren.⁵²

Diese Signalmoleküle besitzen entweder eine *Src homology* (SH2, SH3)-, eine *phosphotyrosine-binding* (PTB)- und/oder eine *pleckstrin homology* (PH)-Domäne, die spezifisch an die Phosphotyrosine der RTKs bindet.⁵³⁻⁵⁴ An FGFR1 durchgeführte Studien weisen auf eine dritte Phase der Autophosphorylierung hin.⁵¹ Durch eine zusätzliche Phosphorylierung von Tyrosinresten wird die Kinaseaktivität weiterhin für die Aktivierung von nachgeschalteten Signalmolekülen erhöht. Aktivierte RTKs rekrutieren und regulieren mit ihren multiplen Phosphotyrosinen eine Vielzahl an verschiedenen Signalmolekülen und bilden so einen regulatorischen Knotenpunkt in einem komplexen Signalnetzwerk⁵⁵, welches Informationen vom Äußeren in das Innere der Zelle übermittelt und so wichtige Zellprozesse wie z. B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern.^{24, 53-54}

Die Steuerung der Signaltransduktionsnetzwerke durch die RTK-Aktivität wird durch positive bzw. negative Rückkopplungsmechanismen feinreguliert. Positive Rückkopplung z. B. in Form von Liganden-stimulierter Kinaseaktivierung und Liganden-inhibierter Protein-Tyrosinphosphataseaktivität verstärken das zu übermittelnde Signal.^{24, 56-58} Negative Rückkopplung z. B. in Form von direkter Phosphataseaktivierung, Internalisierung und Degradation reduzieren das Signal. Die negativen Rückkopplungsmechanismen setzen an vielen Stellen in der nachgeschalteten Signalkaskade an und regulieren die RTK-Aktivität auf komplexe Weise.^{24, 56-58}

Fehler im Ablauf der Kinaseaktivitätsregulationsmechanismen und damit im Turnus nachgeschalteter Signalkaskaden führen zu Störungen in den oben genannten physiologischen Prozessen. Eine Vielzahl von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen und Krebs haben ihren Ursprung in solch einer anomalen Kinaseaktivierung. Dieses Erkenntnis macht RTKs zu wichtigen molekularen Zielstrukturen in der Wirkstoffforschung.⁵⁹⁻⁶⁰

1.1.2 Die Rezeptor-Tyrosinkinase KIT

Das Onkogen *v-kit* wurde 1986 als transformierendes Gen im Hardy-Zuckerman-4-Feline-Sarkoma-Virus (“*kitten*“-KIT) identifiziert.⁶¹ Die Entdeckung des analogen humanen Proto-Onkogens *c-kit* folgte kurz darauf.⁶² Das entsprechende Genprodukt ist die Rezeptortyrosinkinase KIT, dessen Struktur-, molekulare Funktions- und nachgeschaltete Signaltransduktions-Aufklärung aufgrund seiner Rolle in bestimmten Krebserkrankungen von großem Interesse sind.⁶³⁻⁶⁵ KIT wird von mehreren Zelltypen exprimiert, darunter Keimzellen hämatopoetischer Stammzellen, Mastzellen, Melanozyten, Epithelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen der Nabelvene.⁶⁶⁻⁶⁸ In menschlichen Zellen sind vier Isoformen von KIT bekannt: c-KIT, c-KITA, tr-KIT und eine Variation von c-KIT, die sich in der Präsenz oder Abwesenheit eines Serinrestes (Ser715) in der *kinase-insert-Domäne* (*kinase insert domain*) unterscheidet.⁶⁹⁻⁷¹ Die Konsequenz für die Funktionalität der Kinase, resultierend aus dem Fehlen bzw. Vorhandensein dieses Tyrosinrestes, ist jedoch noch nicht geklärt.⁷² Bei tr-KIT (*truncated c-KIT*) handelt es sich um eine verkürzte (Gesamtlänge: 202 AS) Variante von c-KIT ohne katalytische Kinaseaktivität, die als Gerüstprotein fungiert.⁷³⁻⁷⁴ Die beiden verbleibenden Isoformen unterscheiden sich in der Präsenz oder Abwesenheit einer Tetrapeptid-Sequenz (Gly-Asn-Asn-Lys) in der extrazellulären JM-Domäne.⁷⁵⁻⁷⁶ Beide Isoformen haben die gleiche Affinität zu ihrem Liganden⁷⁶ und einen identischen Aufbau der Kinasedomäne. Die GNNK-enthaltende Isoform (GNNK+) wird hierbei zwar langsamer und weniger intensiv von ihrem Liganden aktiviert, der Rezeptor bleibt aber im Vergleich zu der GNNK-defizienten Isoform (GNNK-) länger aktiv.⁷⁵⁻⁷⁶ Beide Isoformen werden in den meisten Gewebearten co-exprimiert, wobei die GNNK-Isoform allerdings die überwiegende Form darstellt.⁶⁹⁻⁷¹

KIT ist eine Typ III-Rezeptortyrosinkinase und gehört somit zu der *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor Familie. Sie besitzt fünf Immunoglobulin-ähnliche (*Ig-like*) Domänen im extrazellulären Bereich sowie eine *kinase-insert*-Sequenz (76 AS), welche sich im Zentrum der KD befindet (Abbildung 4 und 5). Die extrazelluläre Domäne wird über die Transmembranregion mit ihrer intrazellulären Domäne, beginnend mit der JM-Region, verbunden. Die beiden Subdomänen der Kinasedomäne werden durch die *kinase-insert*-Sequenz unterbrochen. Den Abschluss der RTK KIT bildet der COOH-Terminus.^{37, 63, 72, 77} KIT bindet den Liganden SCF (*stem cell factor*) im extrazellulären Bereich, leitet das externe Signal dadurch in das Zellinnere weiter und reguliert grundlegende physiologische Prozesse über die nachgeschalteten Signalkaskaden.

Die Aktivierung von KIT erfolgt durch die Dimerisierung des Rezeptors.⁷⁸ Der SCF ist ein antiparalleles Homodimer, dessen Monomere jeweils eine zugängliche KIT-Bindungsregion besitzen.^{72, 79} Das SCF-Dimer vernetzt zwei KIT-Monomere und induziert konformationelle Änderungen im Rezeptor, die zur Dimerisierung und Aktivierung von KIT führen.³⁰ Die ersten drei Ig-ähnlichen Domänen (D1-D3) interagieren über komplementäre Bindungsoberflächen mit SCF, bleiben aber selbst strukturell unverändert.^{30, 63, 80} Anders verhalten sich die Ig-ähnlichen Domänen vier und fünf (D4 und D5), die bei Liganden-induzierter Dimerisierung eine Umorientierung durchlaufen. Die beiden Domänen bilden die direkte Interaktion zwischen den beiden KIT-Monomeren und orientieren diese für die Aktivierung. Folglich werden die Transmembranregionen der beiden KIT-Monomere in räumliche Nähe gebracht, ermöglichen so die Protein-Protein-Interaktion und damit eine entsprechende Positionierung der intrazellulären KDs für die *trans*-Phosphorylierung (Abbildung 4).^{30, 63, 72, 81}

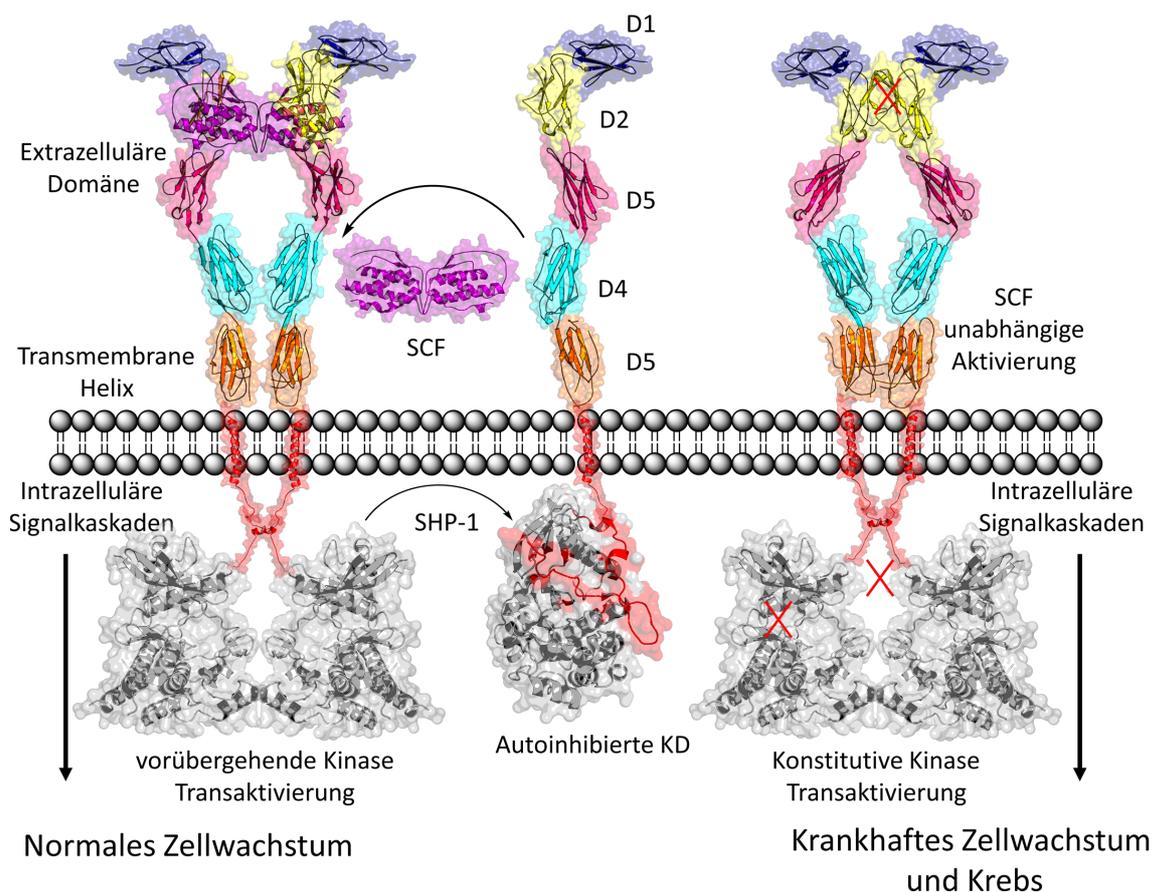


Abbildung 4: In seiner Wild-Typ-Form existiert KIT als Monomer in der Zellmembran (Mitte) (PDB 1t45; PDB 2ec8). Bindet SCF (Purpur) über die Ig-ähnlichen Domänen D1-D3 wird die Dimerisierung und Aktivierung von KIT in *trans* durch Autophosphorylierung der Tyrosin-Reste induziert (links) (2e9w). Das aktive Kit-Dimer aktiviert seinerseits Proteinkinase-vermittelte Signalkaskaden, die spezifische physiologische Prozesse regulieren wie z. B. das normale Zellwachstum. Die negative Regulation dieser Signalkaskade wird unter anderem durch die SHP-1 Tyrosinphosphatase gesteuert. Aus onkogenen KIT-Mutationen (rote X) resultiert die SCF-unabhängige Aktivierung von KIT (PDB 4u0i), die die Kinase konstitutiv aktiviert und zu abnormen Zellwachstum und Krebs führt (rechts) (Angelehnt an Mol *et al.*⁷⁷).

Die Strukturen der KIT-KD wurden sowohl für die aktive (PDB 1pkg)⁷⁷ als auch für die inaktive (PDB 1t45)³⁷ Konformation von Mol *et al.* aufgeklärt. Die KD von KIT hat einen klassischen Aufbau wie in 1.1. beschrieben, bestehend aus zwei Subdomänen zwischen denen sich das aktive Zentrum mit all seinen Strukturelementen befindet.^{37, 72, 77} Die von Mol *et al.* gelöste Struktur untermauert die in Studien zuvor gezeigte inhibitorische Funktion der JM-Domäne (Abbildung 4, Mitte; PDB 1t45). In der inaktiven Konformation liegt die JM zwischen den beiden Subdomänen gefaltet vor und inhibiert dadurch die enzymatische Aktivität der KD.^{37, 40, 77} Die Tyrosine (Tyr568 und 570) in der JM werden nach der Bindung von SCF als erstes phosphoryliert und induzieren eine Konformationsänderung in der JM-Domäne, welche die Autoinhibition aufhebt.^{37, 40, 77, 82}

Damit nimmt die JM-Domäne eine wichtige Rolle in der Regulation der enzymatischen Aktivität von KIT ein. Wie bereits beschrieben unterliegt die Autophosphorylierung in RTKs einer bestimmten Reihenfolge, die für die Regulation der Kinaseaktivität essentiell ist. In KIT folgt der Phosphorylierung der JM zur Aufhebung der Autoinhibition die Phosphorylierung der Tyrosine der Kinase-Insertions-Domäne und des COOH-Terminus (Tyr703, 721, 730, 823, 900 und 936).⁸³ Sieben von diesen Tyrosinen, die maßgeblich an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt sind, fungieren als Interaktionsstellen für Signalmoleküle, die eine SH2-Domäne besitzen.⁶³ Das in der Aktivierungsschleife lokalisierte Tyr823 ist in der inaktiven Konformation als Pseudo-Substrat an der Autoinhibition beteiligt. DiNitto *et al.* zeigten in einem Mutagenese-Experiment, dass eine Phosphorylierung von Tyr823 die Kinaseaktivität nicht beeinflusst. Bislang konnten noch keine Interaktionspartner von Tyr823 identifiziert werden. Seine Rolle in der enzymatischen Funktion von KIT ist bis dato nicht aufgeklärt (Abbildung 5).⁸²⁻⁸³

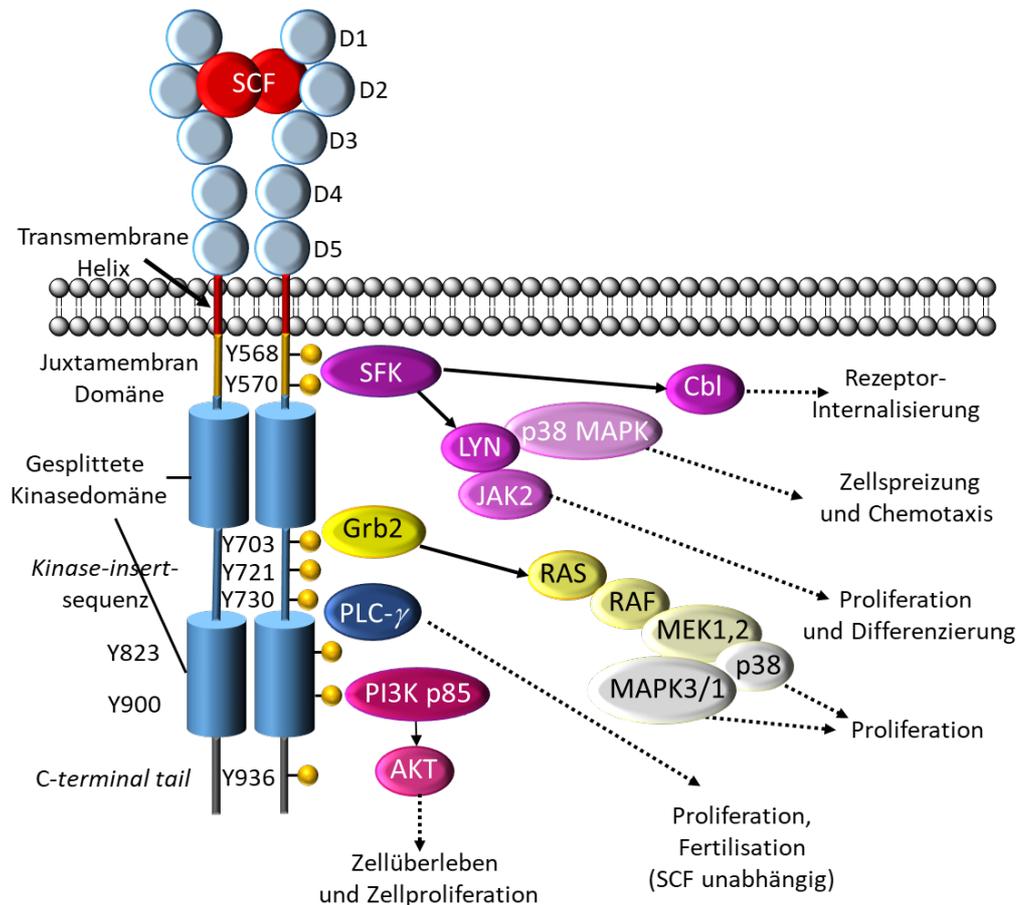


Abbildung 5: Schematische Darstellung von KIT und den relevanten Phosphorylierungsstellen (gelb) sowie der nachgeschalteten Signaltransduktionswege und der entsprechenden zellulären Antworten. Die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, an die KIT-Substratproteine binden repräsentieren außerdem multifunktionale Interaktionsstellen für eine Vielzahl von Proteinen. Hier aufgezeigt ist lediglich eine Substratauswahl des weitaus komplexeren KIT-Interaktionsnetzwerks (Angelehnt an Lennartsson *et al.*^{63, 84})

Eine fein-regulierte Intensität und Dauer der KIT-induzierten Signaltransduktion ist wichtig für einen korrekten Ablauf der dadurch gesteuerten physiologischen Prozesse. Daher bedarf es mehrerer Mechanismen zur Feinregulation der Signaltransduktion und -intensität. Dies wird durch mehrere parallel ablaufende Rückkopplungsmechanismen erreicht, die die Aktivität von KIT einschränken. Diesbezüglich sind mindestens drei Ebenen der KIT Herunterregulierung (*downregulation*) bekannt.^{63, 72}

Die Aktivierung von KIT induziert die Rekrutierung von Ubiquitin Ligasen (E3 Ubiquitin Ligase C-Cbl⁸⁵⁻⁸⁶ und *Suppressor of cytokine signaling 6* (SOCS6)⁸⁷⁻⁸⁸, welche KIT ubiquitinieren und dadurch dessen Internalisierung und Degradation einleiten.⁸⁵⁻⁹⁰ Ein weiterer negativer Rückkopplungsmechanismus im KIT-Signaltransduktionsweg stellt die als Konsequenz der KIT-Aktivierung erhöhte Aktivität der Proteinkinase C (PKC) dar. Die Verringerung der KIT Kinaseaktivität ist mit der Phosphorylierung zweier Serin-Reste in KIT (Ser741, Ser746) durch PKC assoziiert.^{72, 91}

Zudem fördert die Aktivierung von PKC die Freisetzung der extrazellulären KIT-Domäne von der Zelloberfläche, welche wiederum SCF binden und inhibieren kann (S-KIT).^{72, 92-93} Des Weiteren wird der KIT-Signalweg durch Dephosphorylierung der Tyrosin-Reste in KIT oder dessen Signalmoleküle herunterreguliert. Die entsprechende Tyrosin-Phosphatase SHP1 wurde für die negative Regulation der KIT-Aktivität identifiziert.⁹⁴⁻⁹⁵ Es gibt eine Vielzahl von Signalkaskaden die von KIT aktiviert werden. Hierzu zählen u. a. die Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K), Src-Familien-Kinase-, Mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK) und Phospholipasen-Signalwege (Abbildung 5). Diese Signalwege sind dabei nicht isoliert zu betrachten, sondern weisen einen hohen Grad an Vernetzung auf.^{63, 72} Wird KIT mit onkogenen Mutationen in Zellen exprimiert, dann wird das oben beschriebene Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Herabregulierung bzw. Deaktivierung gestört. Dies führt zu einer Fehlregulation der nachgeschalteten Signalkaskaden, was Störungen der dadurch kontrollierten physiologischen Prozesse, wie Zellwachstum und Apoptose, bewirkt und in der Entstehung des Krankheitsbildes Krebs münden kann (Abbildung 4).

Der Großteil der onkogenen KIT-Mutationen ist in der JM-Region (z. B. V560G; Exon 11) oder innerhalb der KD (z. B. D816H; Exon 17 (Aktivierungsschleifenmutation)) lokalisiert. Diese Mutationen bewirken eine SCF-unabhängige KIT-Phosphorylierung und haben die konstitutive Aktivierung der Kinase zur Folge. Der exakte Mechanismus der konstitutiven Aktivierung von KIT ist bislang nicht geklärt, wobei jedoch angenommen wird, dass die Mutationen zu konformationellen Änderungen in der JM-Domäne und/oder der KD führen, die die Autoinhibition verhindern und das Gleichgewicht auf die Seite der aktiven Konformation verschieben.^{63, 96} Als Konsequenz liegt die JM als Verlängerung der Kinase solvatisiert vor und kann potentiell mit einem anderen KIT-Monomer interagieren und eine SCF-unabhängige Dimerisierung und damit Aktivierung von KIT induzieren.⁹⁷ Des Weiteren zeigen *in silico*-Studien von Laine *et al.*, dass die D816-Mutation in der Aktivierungsschleife nicht nur die Konformation dieser verändert, sondern auch zu einer schwächeren Bindung der JM zur KD führen.⁹⁷ Zudem konnte gezeigt werden, dass Aktivierungsschleifenmutationen die Autophosphorylierung beschleunigen und die Affinität für ATP erhöhen.⁹⁸

Als negativer Hauptregulationsmechanismus der KIT-Aktivität wird die JM-Region durch beide Mutationen beeinflusst, zum einen direkt durch Mutationen in der JM-Region selbst und zum anderen indirekt durch Mutationen in der Aktivierungsschleife. Es sind mehr als 500 Mutationen von KIT in menschlichen Tumoren bekannt.⁹⁹ Die oben genannten Exon 11- und 17-Mutationen sind die häufigsten Treibermutationen, viele der anderen sind Passagiermutationen.⁶³ Die konstitutive Aktivierung von KIT kann Krebserkrankungen zur Folge haben, wozu beispielsweise maligne Melanome¹⁰⁰, kolorektaler Krebs¹⁰¹, akute myeloische Leukämie¹⁰² und in mehr als 80 % der Fälle von gastrointestinale Stromatumoren¹⁰³ zählen. Eine erfolgreiche Strategie zur Behandlung von Krebserkrankungen, bei denen das molekulare Zielmolekül bekannt ist, stellen niedermolekulare Kinaseinhibitoren dar.^{96, 101}

1.1.3 Kinaseinhibitoren

Die konstitutiv dysregulierte Aktivierung von Kinasen durch onkogene Mutationen ist der molekulare Treiber vieler Krankheitsbilder. Die spezifische Hemmung dieser Kinasen durch niedermolekulare organische Moleküle, den sogenannten Kinaseinhibitoren, hat sich als wertvolles Behandlungsprinzip etabliert. Mittlerweile sind 38 niedermolekulare Inhibitoren von der FDA zugelassen¹⁰⁴. Diese Kinaseinhibitoren werden basierend auf ihrem Bindungsmodus nach Roskoski *et al.*¹⁰⁵ in Typ I-¹⁰⁶, Typ I₂-¹⁰⁸, Typ II-¹⁰⁶, Typ III¹⁰⁶-, Typ IV-¹⁰⁷, Typ V-¹⁰⁸ und Typ VI-Inhibitoren klassifiziert.^{105, 109} Die Beschreibung der spezifisch belegten Taschen und Subtaschen basiert auf der von Linde *et al.* vorgenommenen Einteilung (Abbildung 6).

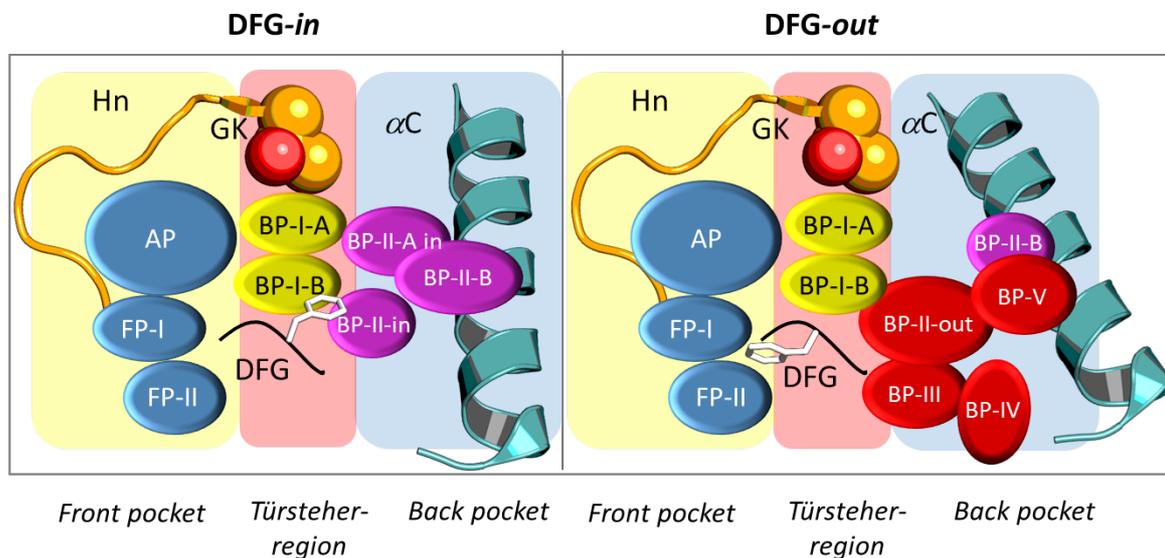


Abbildung 6: Schematischer Überblick der Subtaschen im aktiven Zentrums nach Linde *et al.*¹⁰⁹ in der aktiven DFG-*in* Konformation und der inaktiven DFG-*out*-Konformation. Die Besetzung der dargestellten Subtaschen durch die Inhibitoren und die dadurch induzierte Konformation der Kinase entscheiden über den Typ des Inhibitors. AP: Adeninbindetasche, BP: back pocket, FP: front pocket, GK: Türsteher und Hn: Scharnierregion (Adaptiert von Linde *et al.*¹⁰⁹).

Typ I-Inhibitoren binden reversibel an die aktive DFG-*in*-Konformation von Proteinkinasen. Sie blockieren dabei die Bindungsstelle des Cofaktors ATP, indem sie dessen Platz im aktiven Zentrum einnehmen (AP, FP-I und FP-II). Die Inhibitoren bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu der Scharnierregion aus und wirken auf diese Weise als ATP-kompetitive Mimetika. Die Kinase befindet sich in der aktiven Konformation, wobei jedoch kein Phosphattransfer katalysiert werden kann. Zu den zugelassenen Typ I-Inhibitoren in der Krebstherapie zählen z. B. Gefitinib (Iressa®), in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC), und Dasatinib (Sprycel®), in der Behandlung von Nierenzellkarzinomen.^{105, 110}

Typ I $\frac{1}{2}$ -Inhibitoren binden ebenfalls reversibel in der ATP-Bindetasche der Proteinkinase. Auch sie sind ATP-kompetitiv, adressieren aber eine inaktive *DFG-in* Konformation. Sie ist inaktiv, da die α Helix C sich in der *out* Konformation befindet und das regulatorische Rückgrat ungeordnet vorliegt. Es wird zwischen der Subgruppe A und B unterschieden. Typ I $\frac{1}{2}$ der Subgruppe A besetzen neben der Adeninbindetasche auch die Türsteherregion (BP-I-A) und erstrecken sich in die *back pocket* (B-II) der Zielkinase. Der Subtyp B besetzt nur die ATP-Bindetasche und die Türsteherregion (BP-I-B) (Abbildung 6). Wirkstoffe die einen Typ I $\frac{1}{2}$ Inhibitor Bindemodus aufweisen können sind z. B. der Wirkstoff Dasatinib (Sprycel[®]) zur Behandlung von CML und Lapatinib (Tykerb[®]) für die Behandlung HER2-positiver Mammakarzinome.¹⁰⁵

Typ II-Inhibitoren adressieren die inaktive *DFG-out*-Konformation der Proteinkinase. Man unterscheidet auch hier die Subtypen A und B. Typ IIA-Inhibitoren binden im aktiven Zentrum und besetzen die Adeninbindetasche, wobei ebenfalls die nur in der inaktiven Konformation zugängliche hydrophobe allosterische Tasche (*back pocket*) in der hinteren Region des aktiven Zentrums (B-II-V) adressiert wird. Typ IIB-Inhibitoren dagegen besetzen ebenfalls die ATP-Bindetasche, erstrecken sich aber nur bis in die Türsteherregion (Kinasekonformation: *DFG-out*) (B-I-A/B). Für die Bindung dieser Inhibitor Klasse ist eine kinetisch kontrollierte Konformationsänderung des Zielproteins notwendig (*DFG-in* zu *DFG-out*), wodurch die anschließende Besetzung der hydrophoben allosterischen Tasche durch den Inhibitor dessen Verweildauer verlängert.^{105, 110} Imatinib (Gleevec[®]) ist einer der bekanntesten Vertreter dieser Inhibitor Klasse und wird in der Behandlung von z. B. CML und Gastrointestinalen Stroma-Tumoren (GIST) verwendet.^{105, 110}

Typ III-Inhibitoren binden nur in der hydrophoben allosterischen Tasche (B-II-V), die in der *DFG-out* Konformation neben der ATP-Bindetasche zugänglich ist. Sie bilden oftmals Wasserstoffbrückenbindungen zur α -Helix C und zum DFG-Motiv, aber nicht zu der Scharnierregion aus. Typ-III-Inhibitor und ATP können also simultan an das Protein binden und befinden sich nicht in Konkurrenz zueinander (nicht-kompetitive Inhibition). Beispielhaft für diese Inhibitor Klasse ist Trametinib, ein Kinaseinhibitor zur therapeutischen Behandlung von Melanomen mit einer BRAF V600E/K-Mutation. Abgesehen von diesem Inhibitor haben Typ III-Inhibitoren zu diesem Zeitpunkt noch keine große therapeutische Anwendung, allerdings finden sie als Ausgangspunkt für das Design von Typ II-Inhibitoren Verwendung.^{105, 110}

Typ IV-Inhibitoren werden auch als allosterische Inhibitoren bezeichnet. Sie binden abseits des aktiven Zentrums, sind aber in der Lage durch andere Mechanismen die Kinaseaktivität zu beeinflussen.^{108, 111} Darunter fällt die Kontrolle der Kinaseaktivität z. B. durch die Blockierung von regulatorischen Domänen in der Zielkinase, durch Rekrutierung anderer Proteine oder durch Induktion von konformationellen Änderungen. Besonders vielversprechend sind Typ IV-Inhibitoren in der Wirkstoffforschung, da sie in nicht konservierten allosterischen Bindetaschen von Proteinkinasen binden und dadurch eine hohe Selektivität aufweisen können. Voraussetzung ist allerdings, dass eine allosterische Bindetasche in der Zielkinase vorhanden ist, welche die Kinaseaktivität zielorientiert kontrollieren kann. Beispiele für solche Inhibitoren ist GNF-2¹¹²⁻¹¹³, ein BCR-Abl-Antagonist, welcher an der Myristoyl-Bindetasche bindet und die inaktive Kinasekonformation stabilisiert^{105, 107, 110} und ABL001 (Asciminib[®]), ebenfalls ein BCR-ABL-Inhibitor, der sich für die Behandlung von CML und Philadelphia-Chromosom-positiver akuter lymphatischer Leukämie in Entwicklung befindet und auch die Myristoyl-Bindetasche adressiert.¹¹⁴

Typ V-Inhibitoren adressieren zwei Regionen der KD. Sie werden in zwei Kategorien unterteilt: Inhibitoren, die sowohl die ATP-Bindetasche als auch Proteinsubstrat-Bindetaschen adressieren (Bisubstrat-analoge Inhibitoren) und Inhibitoren, die die ATP-Bindetasche und ein anderes Epitop als die der Substratbindetaschen binden (bivalente Inhibitoren).^{105, 111, 115} Durch die Kombination von einem Inhibitor mit hoher Affinität (z. B. ein ATP-kompetitiver Inhibitor) und einem Inhibitor mit hoher Selektivität (z. B. ein allosterischer Inhibitor) können hierbei Hybridverbindungen generiert, die diese beiden Eigenschaften vereinen. Ein Beispiel für einen Bisubstrat-Inhibitor ist ein von van Ameijde *et al.* hergestelltes Staurosporin-Mimetikum, das mit einem Pseudosubstrat zur Isozym-selektiven Adressierung von PKC kombiniert wurde.¹¹⁶

Typ VI-Inhibitoren sind kovalent an eine Zielkinase bindende Liganden. Prinzipiell können sie alle oben genannten Bindungsmodi einnehmen, besitzen allerdings zusätzlich ein reaktives Elektrophil, mit dem sie eine nukleophile Aminosäureseitenkette (i. d. R. Cystein) in ihrer Zielkinase irreversibel binden.^{105, 117} Die kovalente Bindungsbildung erfolgt hierbei in zwei Schritten: Im ersten Schritt bindet der Inhibitor reversibel an sein Zielprotein. Im zweiten Schritt erfolgt die kovalente Bindungsbildung.¹¹⁷⁻¹¹⁸ Die kovalente Bindung bewirkt eine maximale Verweilzeit des Inhibitors am Zielprotein bis zu dessen Abbau und Neuexpression.¹¹⁸

In der Krebstherapie werden z. B. die von der FDA zugelassenen Typ VI-Inhibitoren Afatinib (Gilotrif[®]), Osimertinib (Tagrisso[®]) und Neratinib (Nerlynx[®]) zur Behandlung von NSCLC eingesetzt.^{105, 119}

1.1.4 Therapie KIT-abhängiger gastrointestinaler Stromatumore

KIT ist als wichtiges Signalprotein an der Entwicklung von Melanozyten, Erythrozyten, Keimzellen, Mastzellen und auch von interstitiellen Zellen von Cajal (gastrointestinale Schrittmacherzellen) beteiligt.^{64, 120-121} Die konstitutive Aktivierung von KIT als onkogener Treiber hat unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge und führt somit zu Krebserkrankungen wie Melanomen¹²²⁻¹²³, systemischer Mastozytose und GIST.^{101, 124} GIST gehören zu den Krebserkrankungen, die hauptsächlich durch die Fehlregulation von KIT und des *platelet-derived growth factor receptors* (PDGFR) resultieren. Die Behandlung dieser Krebsart durch Kinaseinhibitoren wie z. B. Imatinib ist ein Beispiel für eine erfolgreiche zielgerichtete Krebstherapie.^{101, 124}

GIST repräsentieren die am häufigsten vorkommenden Mesenchymaltumoren des Gastrointestinaltrakts und entwickeln sich aus den interstitiellen Zellen von Cajal, den intestinalen Schrittmacher-Zellen, welche zur Peristaltik und Segmentierung von glatten Muskelzellen führen.¹²⁵⁻¹²⁸ Die Tumore können entlang des gesamten Gastrointestinaltrakts vorkommen (Esophagus-Rektum)¹²⁹, wobei der Magen (mit 60 %) und der Dünndarm (35 %) allerdings am häufigsten befallen sind.¹³⁰ Extra-gastrointestinale GIST kommen im Vergleich seltener vor. Typischerweise handelt es sich bei GIST um örtlich begrenzte Tumore (einige mm bis 30 cm), die zu exophytischem Wachstum neigen.¹³⁰⁻¹³¹ Es werden drei histologische Subtypen unterschieden:¹²⁹ Der Spindelzelltyp (zu 70 %), der epitheloide Zelltyp (20 %) und ein aus verschiedenen Anteilen dieser Typen gemischter Zelltyp (10 %).^{129, 131} Die Behandlungsmethode erster Wahl ist die chirurgische Resektion (GIST < 5 cm), gefolgt von einer zielgerichteten Tumorthherapie zur Rezidivkrebs- und Metastasenprävention. Ist das Tumorwachstum bereits zu weit fortgeschritten, wird direkt mit einer zielgerichteten Tumorthherapie¹³² mit Kinaseinhibitoren begonnen, da sich GIST als resistent gegen Chemotherapie und Strahlentherapie erwiesen haben.^{131, 133-134} Für die zielgerichtete Tumorthherapie ist eine konkrete Diagnose durch molekularpathologische Verfahren unabdingbar. Diese beinhalten die genaue Typisierung der genetischen Läsionen im Tumorgewebe der Patienten, die den Phänotypen der Tumorzellen bestimmen.

Die Prüfung auf Verfügbarkeit eines Wirkstoffs für das entsprechende genetische Profil, der die fehlregulierten Proteine inhibiert, erfolgt individuell und angepasst an den identifizierten Treiber des unkontrollierten Tumorwachstums (Präzisionsmedizin).^{124, 134}

Annäherungsweise 85 % aller GIST weisen onkogene *gain-of-function*-Mutationen von KIT (79 %) oder PDGFR (6 %) auf.^{103, 135} Die Aktivierungsmutationen in KIT repräsentieren ein frühes onkogenes Ereignis, verbleiben aber auch der zentrale onkogene Treiber im Patienten mit weit vorgeschrittenen GIST.^{124, 136-137} Die primären Aktivierungsmutationen von KIT in GIST treten vor allem in der JM-Region (Exon 11), in der extrazellulären Region (Exon 9) und vergleichsweise selten in anderen Exons (8, 13, 17) auf (Abbildung 7).¹³⁸⁻¹⁴¹

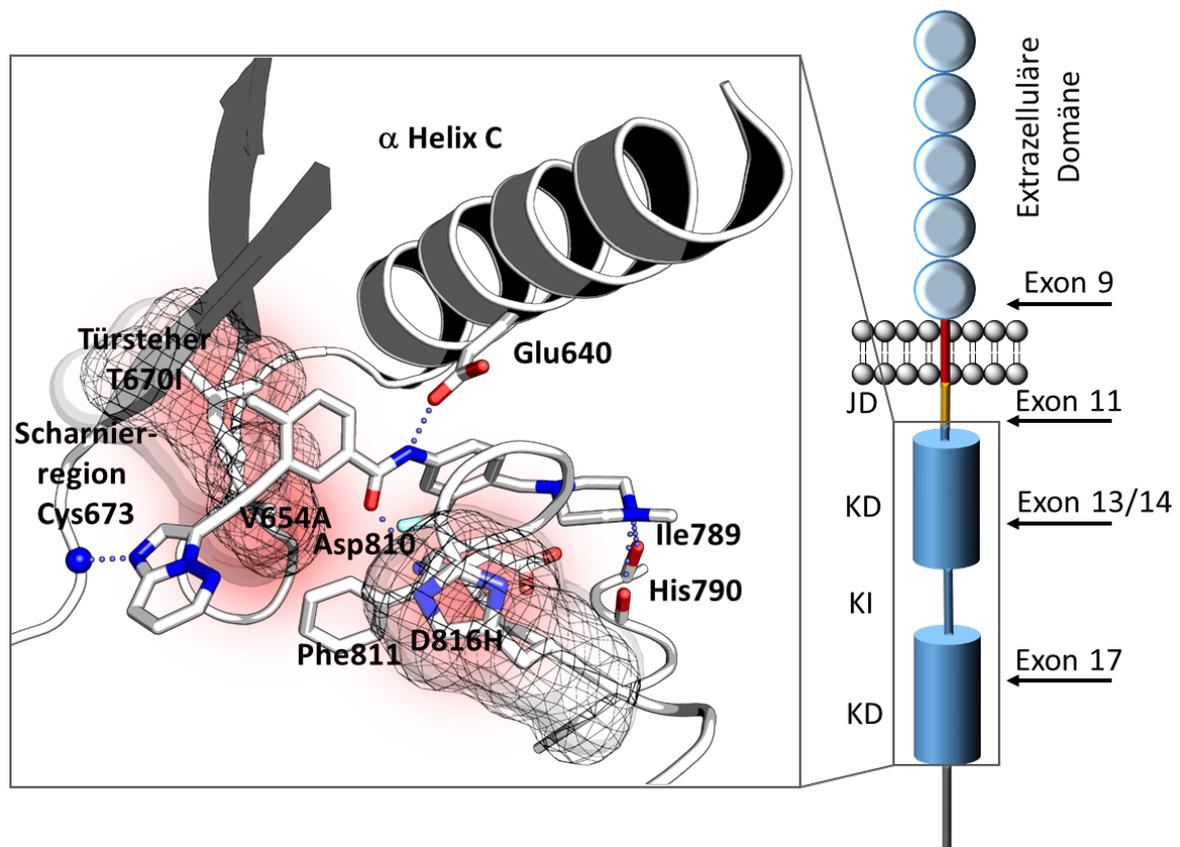


Abbildung 7: Lokalisation der Mutation in KIT. Exon 9-Mutationen in der extrazellulären Domäne; Exon 11-Mutationen in der JM-Domäne; Exon 13/14-Mutationen im aktiven Zentrum der KD (V654A und T670I); Exon 17-Mutationen in der Aktivierungsschleife der KD (Codon 816-829) (rechts). Kristallstruktur von Ponatinib im Komplex mit Wild-Typ KIT (PDB 4u0i, links). Die Sekundärmutationen wurden mit der Mutagenesefunktion des Programms Pymol¹⁴² modelliert und ihre Lokalisation sowie räumliche Ausdehnung durch die Oberflächen-, und Elektronendichte-Gitter-Darstellung, sowie roter Hinterlegung hervorgehoben. Wasserstoffbrückenbindungen sind als blau gepunktete Linien dargestellt. JD entspricht der JM-Domäne, KI der *kinase-insert*-Sequenz, und KD der Kinasedomäne.

Zu diesem Zeitpunkt sind drei Inhibitoren für die Behandlung von GIST zugelassen, von denen jedoch keiner speziell für die Inhibition von KIT entwickelt wurde.¹⁴³⁻¹⁴⁶

Imatinib (Gleevec®¹⁴⁷) wurde ursprünglich für BCR-Abl, Sunitinib (Sutent®¹⁴⁸) für VEGFR entwickelt und Regorafenib (Stivarga®¹⁴⁹) kommt als Multikinaseinhibitor zum Einsatz (Abbildung 8).

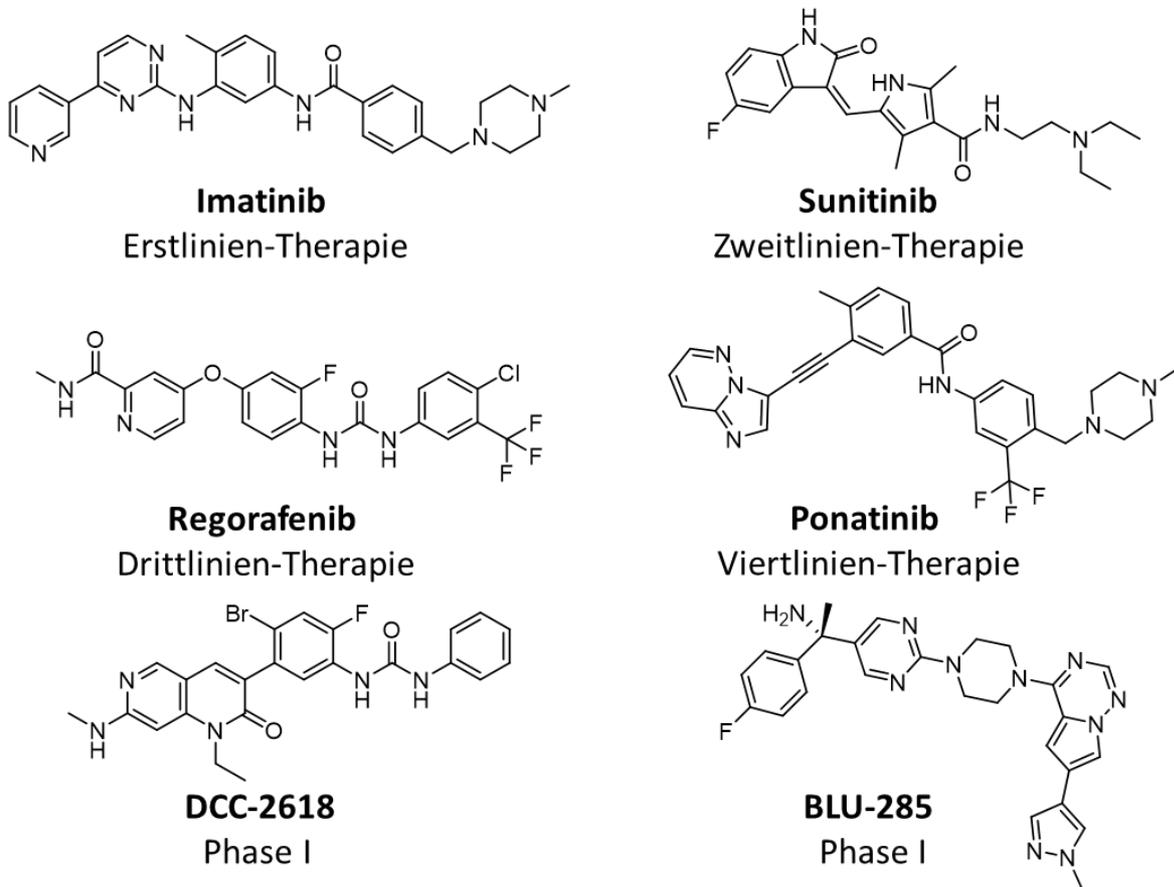


Abbildung 8: FDA-zugelassene Inhibitoren zur Behandlung von GIST (Imatinib, Sunitinib und Regorafenib) sowie der Phase II-Inhibitor Ponatinib und die Phase I-Inhibitoren BLU-285 und DCC-2618.

Der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) zur Behandlung von deregulierten Tyrosinkinasen hat sich bei GIST bezüglich des Nebenwirkungsspektrums und dem gesamten klinischen Verlauf der Patienten als vorteilhaft im Vergleich zur traditionellen Krebstherapie (Chemotherapie und anschließende Bestrahlung) erwiesen.¹³⁹⁻¹⁴⁰

Der Kinaseinhibitor Imatinib ist oral verfügbar, wird schnell vom Organismus absorbiert und inhibiert KIT-Exon 11 und Exon 9-Mutationen sehr effektiv.¹⁵⁰⁻¹⁵¹ Die Ansprechrate der mit Imatinib behandelten GIST-Patienten und auch die Dauer des therapeutischen Nutzens korrelieren mit dem Genotypen.¹⁵⁰⁻¹⁵¹ Das durchschnittliche progressionsfreie Überleben während der Therapie mit Imatinib (*median progression-free survival* (mPFS)) für Kit-Exon 11-Mutationen beträgt 2,3 Jahre, für Exon 9-Mutationen 1,6 Jahre.¹⁵²

Diese langanhaltende Krankheitskontrolle gepaart mit dem vorteilhaften Nebenwirkungsprofil machen Imatinib zu dem standardmäßigen Erstlinien-Therapeutikum für GIST. Obwohl zu Beginn der Imatinib-Therapie eine Tumorregression erreicht werden kann, wird für den Großteil der Patienten eine erneute GIST-Progression beobachtet.

Trotz direkter Adressierung der relevanten Zielkinase in der Erstlinientherapie mit Imatinib, bleibt das Wachstum und Überleben der GIST-Tumorzellen nach wie vor vom KIT-Signalweg abhängig (*onkogen-addiction*). Sekundäre Mutationen innerhalb der ATP-Bindetasche (Exon 13, V654A; Exon 14, T670I) und der Aktivierungsschleife (Codon 816-829) sind bekannte Auslöser für eine Wirkstoffresistenz gegenüber Imatinib und einer damit einhergehenden Tumorprogression (Abbildung 7).¹⁵³⁻¹⁵⁴

Sowohl Sunitinib als auch Regorafenib zeigen eine höhere Aktivität gegen KIT-Mutanten mit sekundären Resistenzmutationen, gepaart mit einer verbesserten PFS von vier bis fünf Monaten, woraufhin die Zulassung der Inhibitoren zur Zweitlinien-¹⁵⁵ und Drittlinien-Therapie¹⁵⁶ erfolgte. Die Ansprechrate der Patienten für beide Inhibitoren fällt allerdings gering aus (< 8 %). Die überwiegende Anzahl der GIST-Patienten mit fortschreitendem GIST-Wachstum entwickeln trotz Behandlung mit Imatinib multiple, polyklonale Resistenzmutationen (genomische Heterogenität). Keines der zugelassenen Medikamente erwies sich gegen das gesamte Spektrum dieser Resistenzmutationen als wirksam, woraus sich ebenfalls die beobachtete moderate klinische Aktivität ableiten lässt.¹⁵⁷ Zudem inhibieren Sunitinib und Regorafenib im Vergleich zu Imatinib ein sehr breites Kinasespektrum, darunter insbesondere angiogenetische Kinasen wie VEGFR1-3 und TIE2, was erhebliche Nebenwirkungen wie Haut- und gastrointestinale Toxizität sowie Hypertonie-Folgesymptome/-Erkrankungen begünstigt.^{156, 158-160} Gegenwärtig befindet sich der Kinaseinhibitor Ponatinib (Iclusig®) in Phase II-Studien zur Behandlung von GIST (Abbildung 8).¹⁶¹⁻¹⁶² Der Inhibitor gehört ursprünglich zur nächsten Generation rational designter hochpotenter ATP-kompetitiver Typ II-Inhibitoren zur Adressierung der Türsteher-Resistenzmutation T315I in BCR-Abl.¹⁶¹⁻¹⁶² Ponatinib ist für T315I BCR-Abl-positive chronische myelogene sowie akute lymphoblastische Leukämien (CMA und AML) aufgrund signifikanter antileukämischer Aktivität über mehrere Krankheits- und Mutationsstadien innerhalb der PACE (*pac*ing, *act*ivity, and *cog*nitive *beh*aviour *ther*apy: a *rand*omised *eval*uation)-Studie zugelassen.¹⁶³

Ponatinib inhibiert allerdings auch eine Vielzahl von Imatinib-resistenten KIT-Mutanten, einschließlich der Exon 17 D816-Mutanten, welche sich als resistent gegenüber den übrigen zugelassenen Medikamenten für GIST erweisen. Allerdings zeigt sich Ponatinib weniger potent gegenüber der Sekundärmutation V564A (Exon 13).¹⁵⁷ In GIST-Patienten zeigt Ponatinib eine vielversprechende Aktivität mit einer klinischen Benefit-Rate von bis zu 55 % in einer kleinen Gruppe von vortherafierten Patienten mit primärer Exon 11-Mutation. Eine aktuelle klinische Studie (POETIG, NCT03171389) untersucht den therapeutischen Nutzen Ponatinibs als Zweitlinientherapie und in austherapierten Patienten. Ponatinib adressiert unter anderem die Kinasen der VEGFR-, PDGFR- und SCR-Familie. Dieses Multikinaseinhibitor-Profil von Ponatinib resultiert in einem entsprechenden Nebenwirkungsspektrum. Die häufigsten Nebenwirkungen, die bei der Ponatinib-Therapie auftreten, sind Hautausschlag, Müdigkeit, Myalgie, trockene Haut, Kopfschmerzen, Mukositis. Diese werden jedoch von den Patienten weniger intensiv wahrgenommen als unter der Behandlung mit Sunitinib und Regorafenib. Eine schwerwiegendere Nebenwirkung sind Dosis-abhängige arterielle Thrombenbildungen, die in 11.8 % der Patienten mit BCR-Abl positiver Leukämie beobachtet werden konnten.^{158, 164}

Ob die Inhibition von an der Angiogenese beteiligten Kinasen wie VEGFR1-3 und TIE2 durch Ponatinib im Zusammenhang mit der arteriellen Thrombenbildung steht, ist noch nicht aufgeklärt.^{157, 165} Gegenwärtig stellen die neuen Verbindungen BLU-285¹⁶⁶ (NCT02508532), ein potenter PDGFRA-D842- und KIT-Exon 17-Mutanten-Inhibitor und DCC-2618¹⁶⁷ (NCT02571036), ein Typ III-KIT- und PDGFRA-Inhibitor, sowie PLX9486/PLX3397²⁹ erstmals speziell für KIT entwickelte Inhibitoren mit guter Aktivität gegen Exon 13/14 und 17 dar. Diese Inhibitoren könnten nach erfolgreichem Durchlaufen der klinischen Studien nicht nur für GIST-Patienten, sondern auch für KIT-positive Leukämie- und Melanom-Erkrankungen im Rahmen einer zielgerichteten Tumorthherapie genutzt werden (Abbildung 8).¹⁶⁸

2 Motivation und Zielsetzung

Als Genprodukt des Proto-Onkogens *c-kit* ist die Proteinkinase KIT ein attraktives Zielmolekül für die Wirkstoffforschung. KIT ist eine membranständige RTK und reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen wie Zellwachstum und Apoptose. Die durch onkogene Mutationen verursachte Fehlregulation von KIT führt zu unkontrolliertem Tumorzellwachstum und so zu Erkrankungen wie Krebs und im Speziellen GIST. Die gegenwärtig zugelassenen Inhibitoren für GIST wurden allesamt nicht für die genetischen Läsionen in KIT-abhängigen Tumoren entwickelt und sind ursprünglich aus der Wirkstoffentwicklung für andere Krankheitsbilder hervorgegangen. Obwohl der Inhibitor der ersten Generation (Imatinib) sehr erfolgreich in der Adressierung der primären Aktivierungsmutationen in KIT ist und auch der klinische Nutzen für die Patienten sehr positiv zu bewerten ist, wird nach Auftreten der Aktivierungsschleifen- und Sekundärmutationen in der KD eine Resistenz gegenüber Imatinib beobachtet. Die in Folge dessen eingesetzten Inhibitoren der zweiten und dritten Generation Sunitinib und Regorafenib zeigen im Vergleich zu Imatinib nur eine moderate inhibitorische Wirkung und ein schlechtes Selektivitäts- und Nebenwirkungsprofil. Ponatinib, ein Inhibitor entwickelt zur Behandlung von BCR-Abl-T315I-positiver Leukämie, zeigt gegenüber der analogen T670I Türsteher KIT-Mutation eine sehr gute inhibitorische Effektivität, allerdings ebenfalls eine Abnahme der Aktivität gegenüber der V654A-Sekundärmutation in KIT, die als Resistenz gewertet wird. Daraus ergibt sich die dringende Notwendigkeit Inhibitoren zu entwickeln, die spezifisch klinisch relevante Mutationen in KIT adressieren und ein verbessertes therapeutisches Profil mit einem reduziertem Nebenwirkungs-spektrum aufweisen, um erfolgreich KIT-abhängige Erkrankungen wie GIST zu therapieren. Die Voraussetzung dafür ist ein fundiertes Verständnis der Auswirkung der Mutationen auf die Struktur von KIT und die damit verbundenen Resistenzmechanismen gegen vorhandene Kinaseinhibitoren. Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst MD-Simulationen der wenig erforschten Exon 13- und 14- Sekundärmutationen durchgeführt werden, um deren Auswirkungen auf die Struktur von KIT näher zu untersuchen und Erklärungsansätze für den jeweiligen Resistenzmechanismus gegenüber den zugelassenen Inhibitoren zu entwickeln.

Von besonderem Interesse ist dabei die Sekundärmutation in Exon 13, da zum jetzigen Zeitpunkt kein schlüssiger Erklärungsansatz für den Mechanismus der Resistenz bekannt ist und effektive Inhibitoren mit ausreichender Selektivität für diese Variante fehlen. Die Kombination der aus der MD-Simulationen erhaltenen Informationen mit rationalem, strukturbasiertem Moleküldesign und Dockingstudien sollten zur Entwicklung verbesserter Ponatinib-basierter Inhibitoren mit optimierter Affinität sowie Selektivität gegenüber KIT führen. Im Anschluss an die chemische Optimierung sollten die Inhibitoren sowohl biochemisch als auch zellulär charakterisiert werden. Insbesondere sollte dabei die Optimierung der Wechselwirkungen zur Scharnierregion erreicht werden, sowie unterschiedliche Ansätze zur Verbesserung der Selektivität gegenüber VEGFR2 verfolgt werden. Im Zuge einer Kooperation mit der Firma Taros Chemicals sollten aus den Ergebnissen eines *patent-* bzw. *scaffold-hopping* neuartige Hybridinhibitoren zur Adressierung der klinisch relevanten Sekundärmutationen synthetisiert und ebenfalls biochemisch und zellulär evaluiert werden. Abschließend sollte die Möglichkeit der irreversiblen Adressierung von KIT untersucht werden. Die gezielte Positionierung eines Elektrophils in dem Molekülgerüst der entwickelten Verbindungen sollte zur Adressierung eines in der *back pocket* befindlichen Cysteins herangezogen werden. Eine entsprechende Syntheseroute sollte zu diesem Zweck etabliert werden. Der kovalente Bindungsnachweis sollte über kinetische sowie massenspektrometrische Untersuchungen erfolgen. Voraussetzung für die biochemische und zelluläre Evaluierung und das damit verbundene Aufstellen von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (*Structure-Activity-Relationships*; SARs) aller Substanzen sind auf die entsprechenden Zielproteine anwendbare Assay-Systeme. Dazu mussten sowohl für die biochemische als auch die zelluläre Substanzcharakterisierung Assaysysteme etabliert und validiert werden, um robuste und reproduzierbare Daten zu generieren. Zusammenfassend sollten in dieser Arbeit reversible und irreversible Modulatoren speziell für die Adressierung der klinisch relevanten KIT-Mutationen entwickelt und auf ihre Aktivität getestet werden. Die potentiellen KIT-Inhibitoren sollten in einem interdisziplinären Ansatz mit Hilfe von computergestützten, organischen Synthese- und biochemischen sowie zellulären Charakterisierungsmethoden entwickelt werden.

3 Strukturbasiertes Design von KIT-Inhibitoren

3.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign ist neben dem Hochdurchsatz-Screening (*high throughput screening* (HTS)) eine der Methoden zur Entdeckung von niedermolekularen Molekülen, die Affinität und/oder inhibitorische Aktivität zu einem bestimmten Zielprotein aufweisen. Während die Entdeckung und Optimierung von Leitstrukturen im Hochdurchsatz-Screening auf der Identifikation von niedermolekularen Molekülen aus Substanzbibliotheken, bestehend aus mehreren Millionen Vertretern unterschiedlicher Substanzklassen in automatisierten *in vitro*-Testsystemen basiert, beginnt der Prozess des strukturbasierten Designs mit der Untersuchung der Struktur des Zielproteins (*target*).¹⁶⁹⁻¹⁷⁰ Die Zielproteine sind i. d. R. beteiligt an der Entstehung einer Erkrankung bzw. von Erkrankungen und durch die Interaktion mit einem Liganden in ihrer Aktivität reguliert. Sie sind entweder Treiber der Erkrankung oder tragen als nachgeschaltete Substrate in einer für das Krankheitsbild essentiellen Signalkaskade zu dessen Entstehung bei. Die Generierung des Strukturmodells eines Zielproteins erfolgt hauptsächlich durch drei Methoden: Röntgenkristallographie, NMR und Homologiemodellierung. Durch die Analyse der 3D-Struktur des Zielproteins können Ligandenbindetaschen identifiziert werden, die eine Schlüsselrolle in dessen Regulation einnehmen.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Mit ihrer Strukturaufklärung bieten auch andere Makromolekülgruppen Ansatzpunkte für das strukturbasierte Design. So sind Sekundärstrukturelemente der RNA beispielsweise attraktive Bindungsstellen für die Adressierung durch Liganden.¹⁷²⁻¹⁷³ Die identifizierte Bindetasche wird unter Zuhilfenahme von Computeralgorithmen weiter untersucht. Die dabei angewandten computergestützten Methoden werden in drei Kategorien unterteilt: die Inspektionsmethode, die virtuelle Durchmusterungsmethode und die *de novo*-Designmethode. Bei der Inspektionsmethode werden bekannte zielproteinbindende Moleküle, wie Substrate, Kofaktoren und Peptide, basierend auf einer Maximierung der komplementären Wechselwirkung zu der Zielbindetasche modifiziert, um aus ihnen Inhibitoren zu generieren.^{170, 174-175} Bei der virtuellen Durchmusterungsmethode (*virtual screening*) werden in Datenbanken aufgeführte kleine Moleküle *in silico* in die zuvor ermittelten Bindetaschen gedockt und basierend auf sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb dieser bewertet (*scoring*).^{170,}

Für den *de novo*-Design-Ansatz werden Molekülfragmente in die Bindetasche positioniert (*docking*), hinsichtlich ihrer Bindungsgeometrie bewertet (*scoring*) und gegebenenfalls *in silico* miteinander verbunden. Die generierten Hybridmoleküle werden anschließend zur weiteren Untersuchungen chemisch synthetisiert.¹⁷⁰

Neben den computerunterstützten Methoden können Leitstrukturen auch mittels einer Kombination aus *in vitro*-Testung und Strukturermittlung entwickelt werden.¹⁷⁰ Die wesentliche Voraussetzung für ein erfolgreiches strukturbasiertes Wirkstoffdesign ist eine iterative Vorgehensweise. Der Ausgangspunkt ist hierbei stets die 3D-Struktur bzw. ein Modell des Zielproteins. Basierend auf einer Komplex- und/oder Apoproteinstruktur wird ein entsprechender Ligand entworfen, welcher im nächsten Schritt synthetisiert und in passenden Testsystemen (biochemisch und/oder zelluläre Assays) evaluiert wird. Bei einem positiven Evaluationsergebnis (mindestens mikromolare Inhibition *in vitro*) wird versucht, die 3D-Struktur des Zielprotein-Liganden-Komplexes mit der neuen Verbindung aus dem vorangegangenen Zyklus zu ermitteln. Diese Struktur dient dann als Startpunkt für einen nächsten Designzyklus (Abbildung 9).¹⁶⁹⁻¹⁷¹

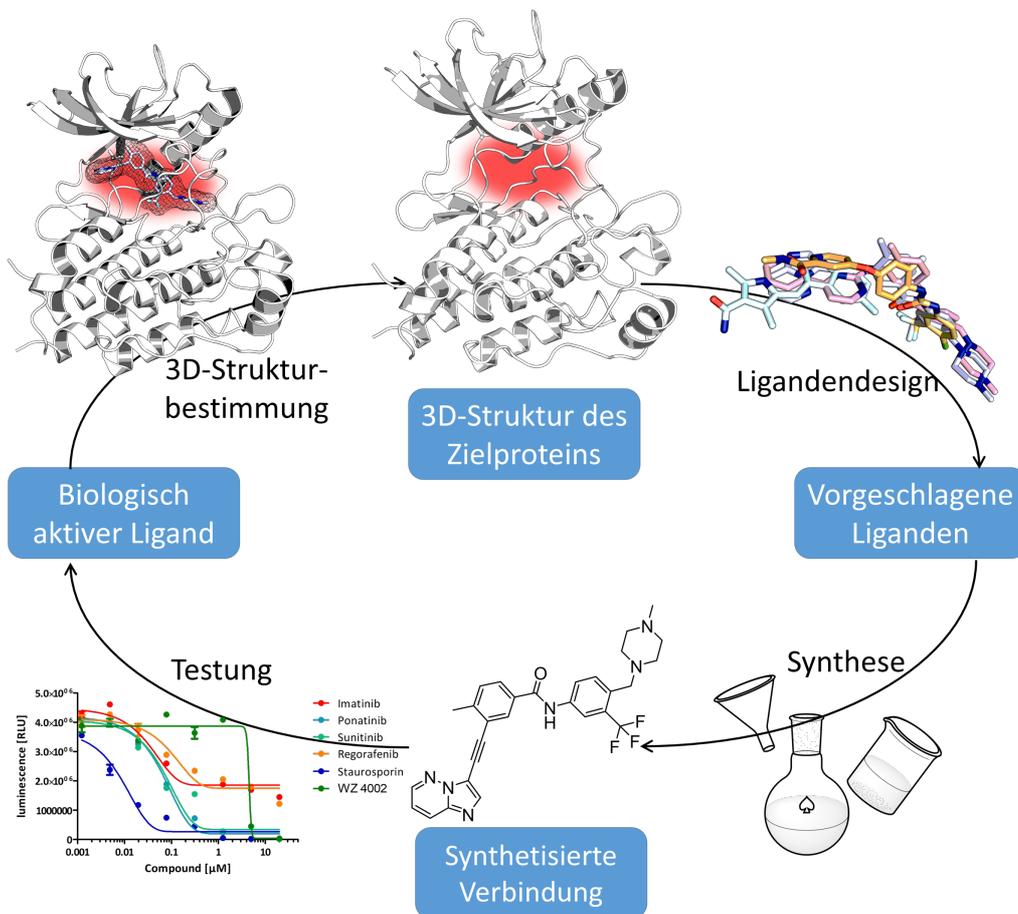


Abbildung 9: Schematische Darstellung des iterativen Designprozesses eines strukturbasierten Wirkstoffdesigns.¹⁶⁹

Diese Vorgehensweise ermöglicht es nach jedem durchlaufenen Zyklus die getroffenen Annahmen bezüglich der Wechselwirkungen und des Bindungsmodus des Liganden zum Zielprotein zu überprüfen und SAR aufzustellen. Aus der 3D Struktur des Zielprotein-Liganden Komplexes können die den Bindungsprozess kontrollierenden nicht-bindenden Wechselwirkungen (van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Wasser-vermittelte Wechselwirkungen und Salzbrücken) zwischen Ligand und Protein antizipiert werden. Die daraus gewonnenen Informationen werden für den Optimierungsprozess des Liganden hinsichtlich seines *targets* genutzt. Auf diese Weise kann eine möglichst hohe strukturelle und chemische Komplementarität und damit Affinität und Selektivität zum *target* generiert werden¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Allerdings weisen das strukturbasierte Wirkstoffdesign und auch die verwendeten computergestützten Verfahren Schwachstellen auf. Zum einen erschwert die limitierte Verfügbarkeit von Röntgenkristallstrukturen oder aussagekräftigen Homologiemodellen die Anwendung des strukturbasierten Designs,^{171, 177} zum anderen gestaltet sich die verlässliche Berechnung und Vorhersage von Bindungsaffinitäten aufgrund der enormen Komplexität als herausfordernd.^{171, 178-179} Die Bindungsaffinität setzt sich nicht nur aus enthalpischen Beiträgen, sondern auch aus entropischen Beiträgen zusammen. Die Bindung eines Liganden scheint zunächst mehr Ordnung in das System zu bringen, dies ist aber nicht zwangsläufig der Fall. Beispielsweise erhöht sich die Unordnung (Entropie) durch Bindung der hydrophoben Anteile eines Liganden, da dadurch geordnete Wassercluster aufgebrochen werden.¹⁸⁰ Dies gilt aber nicht für Wassermoleküle die tief vergraben und fest gebunden in Spalten der Proteinoberfläche und des aktiven Zentrums vorhanden sind.¹⁸¹ Obwohl Fortschritte bezüglich der Berechnung der Rolle der Wassermoleküle gemacht wurden (z. B. durch Einbezug von Molekulardynamik (MD)-Simulationen)^{178, 182}, sind diese dennoch nicht ausreichend um das Problem in Gänze zu erfassen.^{171, 181-182}

Trotzdem ist es möglich, mittels des strukturbasierten Wirkstoffdesigns ausreichende Informationen über die Struktur-Aktivitätsbeziehung der Liganden zu ihren *targets* zu erhalten. Dadurch können vor allem in der Leitstrukturoptimierungsphase rationale Modifikationen durchgeführt werden, die die Anpassung des ADME (Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination)- und Toxizitäts-Profiles und dem gleichzeitigen Erhalt der Affinität und Selektivität erlauben.¹⁷⁰⁻¹⁷¹ Die Methode des strukturbasierten Wirkstoffdesigns ist somit ein wichtiges Werkzeug für die Identifikation, den Entwurf und die Weiterentwicklung von Liganden hin zum potentiellen Arzneistoff.

3.2 Grundlagen von MD-Simulationen

Die MD-Computersimulation ist eine Methode, um näherungsweise die klassisch-dynamische Entwicklung der Atompositionen von Flüssigkeiten oder Molekülen in fluiden Umgebung (z. B. ein gelöstes Protein) über die Zeit zu berechnen.¹⁸³ Dazu werden die Bahnen aller N Teilchen (i) unter dem Einfluss eines Kraftfeldes, dem sogenannten Wechselwirkungspotentials $V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$, berechnet.¹⁸³ Für Moleküle beinhaltet das Wechselwirkungspotential die intramolekularen Beiträge in Form von Bindungslängen, Bindungswinkeln und Diederwinkeln und die intermolekularen Beiträge wie van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen sowie die Wechselwirkungen mit dem Lösemittel.¹⁸³ Durch quantenmechanische Berechnungen und unter Einbezug physikalischer Eigenschaften des Systems, wie strukturellen, spektroskopischen und thermodynamischen Daten, wird das Kraftfeld parametrisiert und die daraus erhaltene potentielle Energie dem Newton'schen Gesetzen zur Bewegung (Newton'sche Bewegungsgleichungen) makroskopischer Körper unterworfen.¹⁸³ Die Newton'schen Bewegungsgleichungen werden in der MD-Simulation über kleine Zeitintervalle Δt (ca. 10^{-15} s) numerisch integriert, sodass eine Animation entsteht, welche die Bewegung und Wechselwirkungen der Teilchen des entsprechenden Systems während des untersuchten Zeitraums beinhaltet.¹⁸³ Zur Vereinfachung der Berechnungen werden die Teilchen i näherungsweise als Massepunkte, die über Spiralfedern miteinander verbunden sind, beschrieben. Aus den erhaltenen Gradienten der potentiellen Energie V wird die Kraft \vec{F}_i für jedes Teilchen i (Atom, Moleküle oder Molekülgruppen) nach dem zweiten Newton'schen Gesetz berechnet.¹⁸³⁻¹⁸⁴

$$\vec{F}_i = -\nabla V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) = m_i \vec{a}_i \quad (1)$$

∇ ist die Ableitung nach den Ortskoordinaten x , y und z . \vec{a}_i beschreibt die Beschleunigung und m_i die Masse des Teilchens i .

Die Trajektorien, das heißt die neuen Orte $\vec{r}_i(t + \Delta t)$ und die neuen Geschwindigkeiten $\vec{v}_i(t + \Delta t)$ des Teilchens i , werden nach Festlegung der Anfangsgeschwindigkeit \vec{v}_i und der Anfangsorte \vec{r}_i durch Integration für jedes Zeitintervall Δt berechnet. Folgende Näherungen können dafür herangezogen werden.¹⁸³

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) \approx \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}_i(t)\Delta t^2 \quad (2)$$

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) \approx \vec{v}_i(t) + \vec{a}_i(t)\Delta t \quad (3)$$

Die daraus ermittelten Trajektorien besitzen ihrerseits veränderte potenzielle Energien $V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$, die für die Berechnung der Orte und Geschwindigkeiten nach dem nächsten Zeitintervall verwendet werden. Gegenwärtig werden für MD-Simulationen bis zu hunderttausend dieser Zeitintervalle für die zu untersuchenden Systeme generiert, aus denen sich strukturelle, thermodynamische und dynamische Eigenschaften des Systems ableiten lassen.¹⁸³

3.3 Strukturelle Analyse von KIT^{wt}, KIT^{V559D/V654A} und KIT^{V559D/T670I} Mutanten^I

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Adressierung der Sekundärmutationen von KIT, die den Hauptgrund von Wirkstoff-Resistenzen in GIST darstellen. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten allerdings keine Kristallstrukturen der Sekundärmutanten von KIT aufgeklärt werden. Einzig die 3-D Struktur der Aktivierungsschleifenmutation D816H als Primärmutation und der Wild-Typ (KIT^{wt/wt}) sind bekannt. Aufgrund dessen wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Koch (TU Dortmund) basierend auf der Sequenz und der Kristallstruktur von KIT^{wt} (PDB 4u0i) durch molekulare Modellierung und MD-Simulationen Modelle der Exon 13/14-Mutationen KIT^{V559D/V654A} und KIT^{V559D/T670I} generiert. Die nachfolgenden Berechnungen wurden basierend auf im Zuge dieser Arbeit aufgetretenen Fragestellungen von M. Sc. Christiane Ehr^{II} iterativ durchgeführt. Um ein besseres Verständnis für den Bindungsmodus des in der KIT^{wt}-Kristallstruktur befindlichen Liganden Ponatinib in den beiden Varianten (V559D/V654A; V559D/T670I) zu erhalten, wurden Dockingstudien von Ponatinib mit den erstellten Modellen durchgeführt. Durch diese konnte gezeigt werden, dass Ponatinib die zu untersuchenden KIT-Mutanten in analoger Art zum wt binden kann. Die detaillierte visuelle Untersuchung der höchsträngigen Posen für alle Dockingstudien in der KIT^{V654A}- und KIT^{T670I}-Variante zeigten vernachlässigbare Abweichungen im Vergleich zum nativen Bindungsmodus von Ponatinib in der Ursprungskristallstruktur des wt.

^I In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Oliver Koch an der TU Dortmund.

^{II} Die vorliegenden Berechnungen wurden von M. Sc. Christiane Ehr^{II} durchgeführt.

Aus diesem Grund wurden die Posen mit den kleinsten *root-mean-square deviations* (RMSDs) zum in der Kristallstruktur (PDB 4u0i) beobachteten Bindungsmodus von Ponatinib gewählt und MD-Simulationen mit dem wt und den Mutanten von KIT in Präsenz und Absenz von Ponatinib über einen Zeitraum von 300 ns durchgeführt (siehe experimenteller Teil Kapitel 6.5). So sollten mögliche Unterschiede im Bindungsmodus im Liganden-gebundenen und -ungebundenen Zustand in der KIT-KD aufgedeckt werden. Die Liganden-gebundenen KIT-Varianten verhalten sich während der 300 ns langen Simulation annähernd identisch bezüglich ihres RMSD-Profiles (Abbildung 10A).

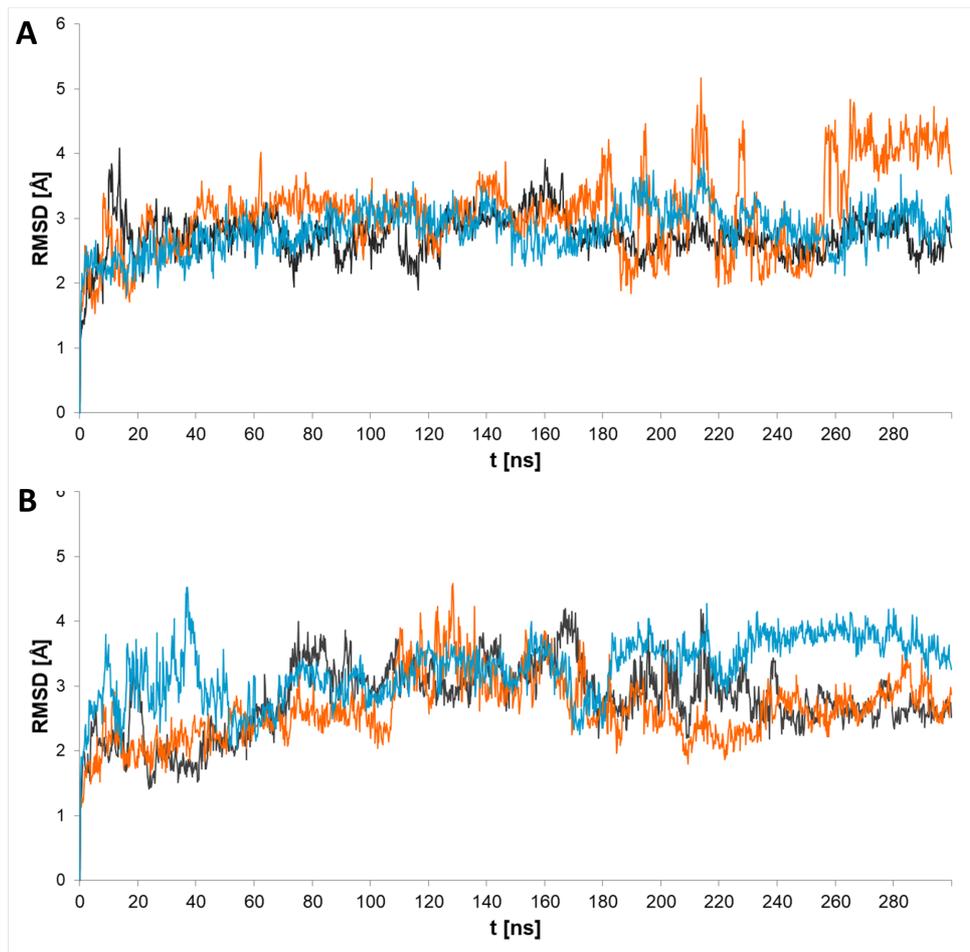


Abbildung 10: RMSD-Profilen für die MD-Simulationen von KITwt (dunkelgrau), KITT670I (orange) und KITV654A (blau) berechnet aus MD-Simulationen für alle Proteinerückgrat C α -Atome über einen Zeitraum von 300 ns. A) RMSD-Profilen der Strukturen für die berechneten Trajektorien in der Präsenz von Ponatinib. B) RMSD-Profilen in der Abwesenheit des Liganden Ponatinib. Die RMSD-Daten wurden von M. Sc. Christiane Ehrt erhoben und visualisiert.

Auch die prominentesten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Protein sind über allen drei Trajektorien stabil (Tabelle 1).

Tabelle 1: Wasserstoffbrückenbindungsanalyse für die Trajektorien von KIT^{wt} und beiden Mutanten über 300 ns. Die Besetzungsdichte der jeweiligen Wasserstoffbrückenbindungen ist pro AS-Rest berechnet. Besetzungsdichten unter 1 % werden übersichtshalber nicht aufgeführt. Die Berechnungen wurden von M. Sc. Christiane Ehrh durchgeführt.

Besetzungsdichte der Wasserstoffbrückenbindungen pro AS [%]			
	KIT^{V654A}	KIT^{wt}	KIT^{T670I}
Glu78 (Seitenkette)	24.0	19.7	18.5
Cys111 (Rückgrat)	4.7	5.3	6.6
Ile169 (Rückgrat)	16.7	15.1	24.5
His170 (Rückgrat)	20.4	21.1	10.1
Asp190 (Rückgrat)	15.4	18.8	23.9

Des Weiteren zeigten Berechnungen der molekularmechanischen Poisson-Boltzmann (*Generalized Born*) Lösemittel zugänglichen Oberflächenbereiche (*molecular mechanics Poisson-Boltzmann (Generalized Born) solvent-accessible surface area* (MM-PB(GB)SA)) ähnliche Resultate für KIT^{wt} und für die beiden untersuchten Mutanten (Tabelle 2) (siehe experimenteller Teil Kapitel 6.5.2). Es zeigen sich kaum Unterschiede in den freien Bindungsenergien im Liganden-gebundenen Zustand der KIT-Varianten.

Tabelle 2: Aus den MM-PB(GB)SA-Berechnungen für die Komplexe zwischen Ponatinib und KIT^{wt}, KIT^{T670I} und KIT^{V654A} ermittelten freien Bindungsenergien. Die aus den MM-GBSA erhaltenen Ergebnisse stehen in Klammern. Bei der Berechnung der freien Bindungsenergie (ΔG_{bind}) wurde der Term, der die Lösungsentropie beschreibt, vernachlässigt. Die Berechnungen wurden von M. Sc. Christiane Ehrh durchgeführt.

	freie Energien [kcal/mol]		
	KIT^{wt}	KIT^{T670I}	KIT^{V654A}
ΔG_{vdW}	-70.2 ± 3.1	-70.4 ± 3.3	-70.2 ± 3.4
ΔG_{ele}	-69.4 ± 9.1	-37.9 ± 11.6	-36.1 ± 11.1
$\Delta G_{\text{non-polar}}$	-6.1 ± 0.1 (-9.9 ± 0.2)	-6.1 ± 0.1 (-9.1 ± 0.2)	-6.1 ± 0.1 (-9.0 ± 0.2)
ΔG_{polar}	92.1 ± 8.3 (76.1 ± 8.7)	59.9 ± 11.1 (43.1 ± 11.2)	60.8 ± 10.7 (41.3 ± 10.9)
ΔG_{gas}	-139.7 ± 9.2	-108.3 ± 11.7	-106.3 ± 11.5
ΔG_{solv}	86.1 ± 8.3 (67.1 ± 8.6)	53.8 ± 11.1 (34.0 ± 11.2)	54.7 ± 10.7 (32.3 ± 10.8)
ΔG_{bind}	-53.6 ± 4.2 (-72.6 ± 3.8)	-54.5 ± 3.8 (-74.3 ± 3.9)	-51.6 ± 4.0 (-74.0 ± 4.1)

Ein Vergleich der berechneten freien Bindungsenergien mit den in der Literatur ermittelten GI_{50} -Werten¹⁸⁵ von Ponatinib für die Varianten zeigt, dass die berechneten Daten die experimentell ermittelten Affinitäten nicht reflektieren. Insbesondere die Mutante V654A, für die ein nahezu 20-facher Aktivitätsverlust von Ponatinib im Vergleich zu KIT^{T670I} ermittelt werden konnte, sollte eine höhere freie Bindungsenergie aufweisen.

Die Methode der MM-PB(GB)SA-Berechnung wurde von Genheden *et al.* kritisch untersucht und es wurde deutlich, dass sich die Methode in stetiger Entwicklung befindet und die Ergebnisse je nach Programm und Methode, mit denen die Terme und einzelnen Parameter berechnet werden, stark variieren können.¹⁸⁶ Aufgrund dieser Unsicherheiten der Methode wurden zusätzliche Faktoren, die Auswirkung auf die Bindungsaffinität des Liganden Ponatinib zum Protein haben können, untersucht. Zum Vergleich wurden MD-Simulationen der KIT-Varianten ohne Ponatinib als Liganden durchgeführt. Diese Apo-Strukturen wiesen wesentliche Unterschiede in den Trajektorien der Varianten im Vergleich zu den Ponatinib gebundenen auf (Abbildung 10B). Eine detailliertere Analyse der RMSF (*root-mean-square fluctuation*) der einzelnen AS der ATP-Bindetasche der untersuchten Varianten in der Absenz von Ponatinib demonstriert insbesondere für KIT^{V654A} eine erhöhte Flexibilität bezüglich der AS-Reste, die an der Bindung von Ponatinib beteiligt sind (Abbildung 11).

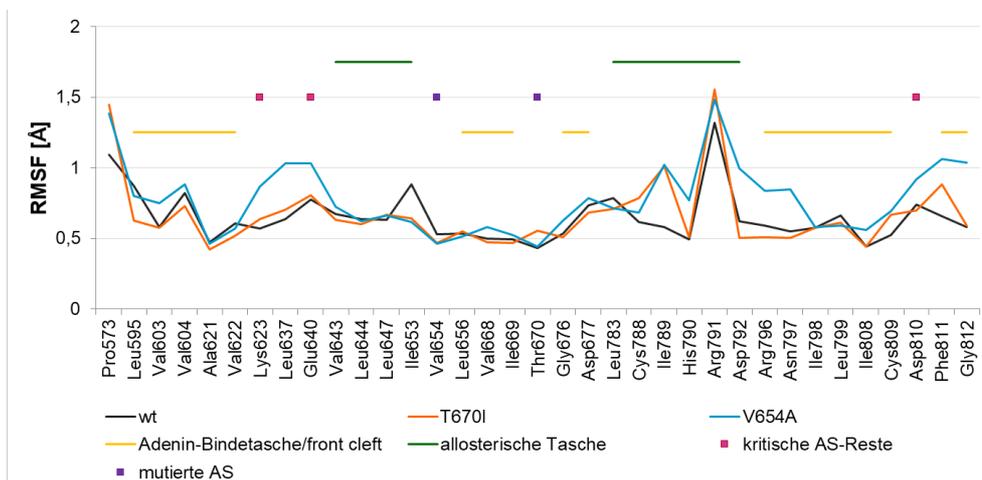


Abbildung 11: RMSF-Werte der AS-Reste im aktiven Zentrum von KIT^{wt} (dunkelgrau), KIT^{T670I} (orange) und KIT^{V654A} (blau) ohne gebundenen Inhibitor in einem Simulationszeitraum von 300 ns. Die mutierten Reste sind als violette Punkte, die Lokalisation des AS-Rests innerhalb des aktiven Zentrums als gelbe bzw. als grüne horizontale Linien und die AS-Reste (Lys623, Glu640, und Asp810) mit der größten Fluktuation der Atomkoordinaten bezogen auf die Startgeometrie als pinke Punkte hervorgehoben. Die RMSF-Daten von M. Sc. Christiane Ehrh erhoben und visualisiert.

Um auszuschließen, dass die erhöhte Flexibilität aufgrund der Mutation KIT^{V654A} eine Auswirkung auf das Volumen und somit auf die Ponatinib-Protein-Komplexbildung hat, wurde eine molekulardynamische Analyse der Trajektorie der Liganden-Bindetasche in Abwesenheit von Ponatinib durchgeführt. Diese zeigte in allen drei KIT-Varianten keine signifikanten Unterschiede in dem Volumen der Liganden-Bindetasche (Abbildung 12).

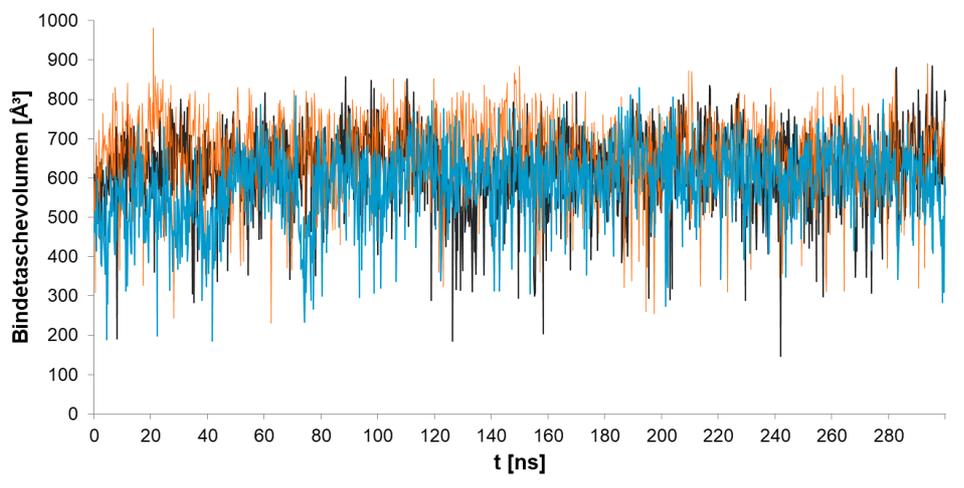


Abbildung 12: Dargestellt ist das Volumen des aktiven Zentrums (Ponatinib-Bindetasche) über den Zeitraum einer 300 ns MD-Simulation in der Abwesenheit von Ponatinib von KIT^{wt} (dunkelgrau), KIT^{V559D/V654A} (blau), und KIT^{V559D/T670I} (orange). Die Daten wurden von M. Sc. Christiane Ehrt erhoben und visualisiert.

Die Gruppierung der Konformationen der MD-Trajektorien hinsichtlich der AS-Reste, die an der Bindung von Ponatinib beteiligt sind, und der anschließende Bindetaschenvergleich der Repräsentative der Gruppierungen mit der höchsten Besetzungsdichte mit dem Programm SiteHopper¹⁸⁷ verdeutlicht, dass KIT^{wt} und KIT^{V654A} sich hinsichtlich ihrer Bindetaschenform und physikochemischen Eigenschaften unterscheiden. Die Unterschiede zwischen KIT^{wt} und KIT^{T670I} bezüglich dieser Parameter sind weniger ausgeprägt (Abbildung 13). Die aufgeführten Unterschiede konnten in den MD-Simulationen der Liganden-gebundenen Varianten nicht beobachtet werden. Beide Mutanten von KIT weisen im Ponatinib-gebundenen Zustand eine höhere Ähnlichkeit zum wt auf. Demgegenüber steht die von KIT^{T670I} zu KIT^{V654A} abnehmende Ähnlichkeit im Ponatinib-ungebundenen Zustand, die auf größere Abweichungen in der Ligandenbindetasche-Konformation im Apo-Zustand der Mutanten hindeutet. Diese konformationellen Unterschiede innerhalb der Ligandenbindetasche der Apo-KIT-Varianten scheinen sich auf die Bindungsaffinität von Ponatinib auszuwirken und resultieren vermutlich in der verminderten Aktivität des Ponatinibs gegenüber der KIT^{V654A}-Variante (Abbildung 13).

Die erhöhte Bindetaschenflexibilität der Apo-Formen, vor allem in der Variante $\text{KIT}^{\text{V654A}}$, könnte auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktiver und inaktiver Konformation der Kinase hindeuten, die nicht im Protein-Ligand Komplex beobachtet werden kann, da der Ligand in der Simulation die Kinase in eine bestimmte Konformation „zwingt“, die für die Bindung notwendig ist.^{3, 13} Hinsichtlich dieser Hypothese wurden weitere Untersuchungen bezüglich der Ligandenbindetaschen-Konformation durchgeführt.

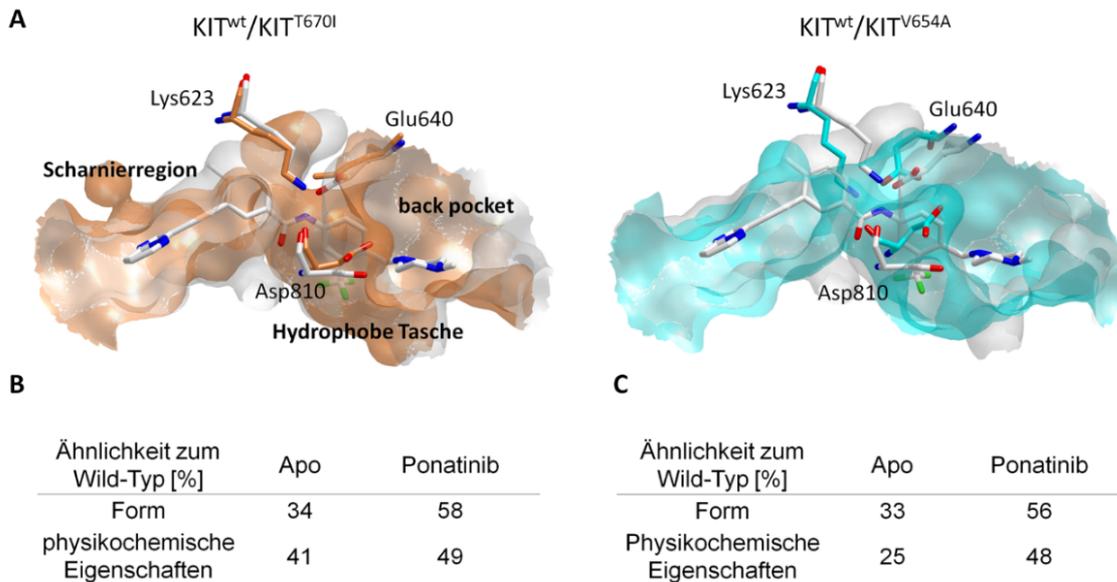


Abbildung 13: **A)** Vergleich der Liganden-Bindetaschen-Oberflächen anhand repräsentativer Konformere der MD-Simulationen, die von den Gruppierungen (*Clustering*) anhand der RMSD-Werte der Bindetaschenaminoacids abgeleitet wurden. Die Visualisierung und Anordnung von Ponatinib in KIT^{wt} (grau), $\text{KIT}^{\text{V654A}}$ (blau), und $\text{KIT}^{\text{T670I}}$ (braun) wurde mit SiteHopper¹⁸⁷ generiert. **B)** Ergebnisse des Vergleichs der Ponatinib-Bindungsstelle der $\text{KIT}^{\text{T670I}}$ -Mutante in der Ponatinib-gebundenen und der Apo-Form mit KIT^{wt} in Bezug auf die Form und physikochemischen Eigenschaften der Bindetasche (Wasserstoffbrückendonator-, Wasserstoffbrückenakzeptor- und hydrophoben Eigenschaften). Für den Vergleich zwischen Apo-Varianten (Apo) und Ponatinib-gebundene Varianten (Ponatinib) wurden die Bindetaschen der repräsentativen Strukturen der Cluster mit der größten Anzahl von *MDSnapshots* in der Simulation gewählt. Die Mutanten wurden mit der Kristallstruktur von KIT^{wt} im Komplex mit Ponatinib (PDB 4u0i) verglichen. **C)** Ergebnisse des Vergleichs der Ponatinib-Bindungsstelle der $\text{KIT}^{\text{V654A}}$ -Mutante in der Ponatinib-gebundenen und der Apo-Form mit KIT^{wt} in Bezug auf die Form und physikochemischen Eigenschaften der Bindetasche. Der Vergleich wurde analog zu **(B)** durchgeführt. Die Daten wurden von M. Sc. Christiane Ehrt erhoben und visualisiert.

Da sich keine klare SAR für die Aktivität bekannter Inhibitoren auf $\text{KIT}^{\text{V654A}}$ ableiten ließ, wurden die Aktivierungseigenschaften von $\text{KIT}^{\text{V654A}}$ im Vergleich zu denen von KIT^{wt} und $\text{KIT}^{\text{T670I}}$ analysiert, um eventuelle Unterschiede zu identifizieren. Tatsächlich wurde in den MD-Simulationen von Apo- $\text{KIT}^{\text{V654A}}$ eine hohe Flexibilität der α -Helix C beobachtet.

Da die α -Helix C ein entscheidendes Strukturelement für die Unterscheidung der aktiven bzw. inaktiven Kinasekonformation sowie wesentlich für die Stabilisierung der aktiven Konformation ist, wurde die konformative Variation der Helix in den simulierten Trajektorien durch eine zeitabhängige Beobachtung des Winkels zwischen der Achse der α -Helix C (N-terminal) von AS-Rest Leu631 zu Leu637 und der Einheitszellachse x (Abbildung 14) untersucht. Die Auswertung der Daten deutet darauf hin, dass die V654A-Mutation in KIT die Dynamik der α -Helix C beeinflusst und somit konformationelle Änderungen in KIT^{V654A} hervorruft, die die Komplexbildung mit einem Typ II-Inhibitor im Vergleich zum wt erschweren könnten.

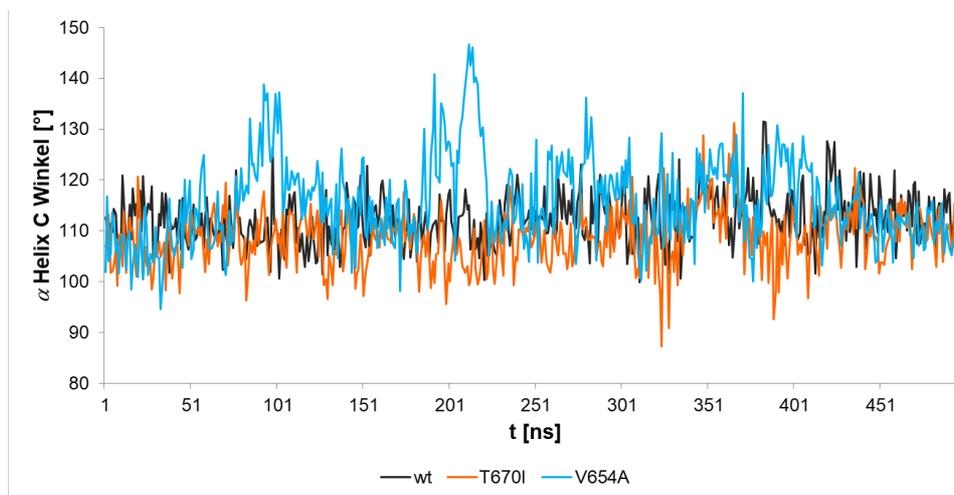


Abbildung 14: Gezeigt wird der Winkel zwischen der Achse der α -Helix C (N terminal) von AS Rest Leu631 zu Leu637 und der Einheitszellachse x während eines Simulationszeitraums von 300 ns für KIT^{wt} (dunkelgrau), KIT^{V654A} (blau) und KIT^{T670I} (orange). Die Daten wurden von M. Sc. Christiane Ehrt erhoben und visualisiert.

Um die Flexibilität in der gesamten KIT-KD zu visualisieren und die Einzigartigkeit der erhöhten α -Helix C-Flexibilität im Vergleich zum wt und der T670I-Mutante zu untersuchen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis* (PCA)) durchgeführt. Die Analyse zeigt, dass die Haupttrichtungsänderungen innerhalb der KIT-KD-Struktur für die Variante KIT^{V654A} eine Beugungsbewegung der α -Helix C aufweist. Die Beugung in Richtung KD deutet auf eine Stabilisierung der aktiven Konformation in dieser speziellen Mutante hin (Abbildung 15). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die Mutante KIT^{V654A} eine Stabilisierung des regulatorischen Rückgrats zur Folge hat. Damit würde die Einnahme einer aktiven KD-Konformation auf eine ähnliche Weise induziert wie durch die Türstehermutationen in c-Abl und c-Scr.¹⁸⁸⁻¹⁸⁹

Die räumliche Nähe von Ala654 in KIT^{V654A} zum regulatorischen Rückgrat kombiniert mit der in der MD-Simulation beobachteten Beugungsrichtung der α -Helix C, sowie die verringerte Bindungsaffinität von Ponatinib stützen diese Hypothese. Diese Ergebnisse liefern einen plausiblen Ansatzpunkt für ein besseres Verständnis der KIT^{V654A}-Mutation und können für ein rationales Wirkstoffdesign herangezogen werden.

Dennoch erschwert ein solcher Aktivierungsmechanismus ein rationales Design von Molekülen für diese KIT-Variante, da kein konkreter molekularer Angriffspunkt, wie beispielsweise im Fall einer Türstehermutation, gegeben ist und als Lösungsansatz nur die Erhöhung der Affinität der vorhandenen Liganden zur Zielvariante oder die Entwicklung bzw. Entdeckung von Liganden mit gänzlich unterschiedlichem Bindungsmodus verbleibt. Die Herausforderung besteht dabei darin, eine Erhöhung der Affinität kombiniert mit einer ausreichenden Selektivität zum *target* durch neu entwickelte Moleküle zu erreichen.

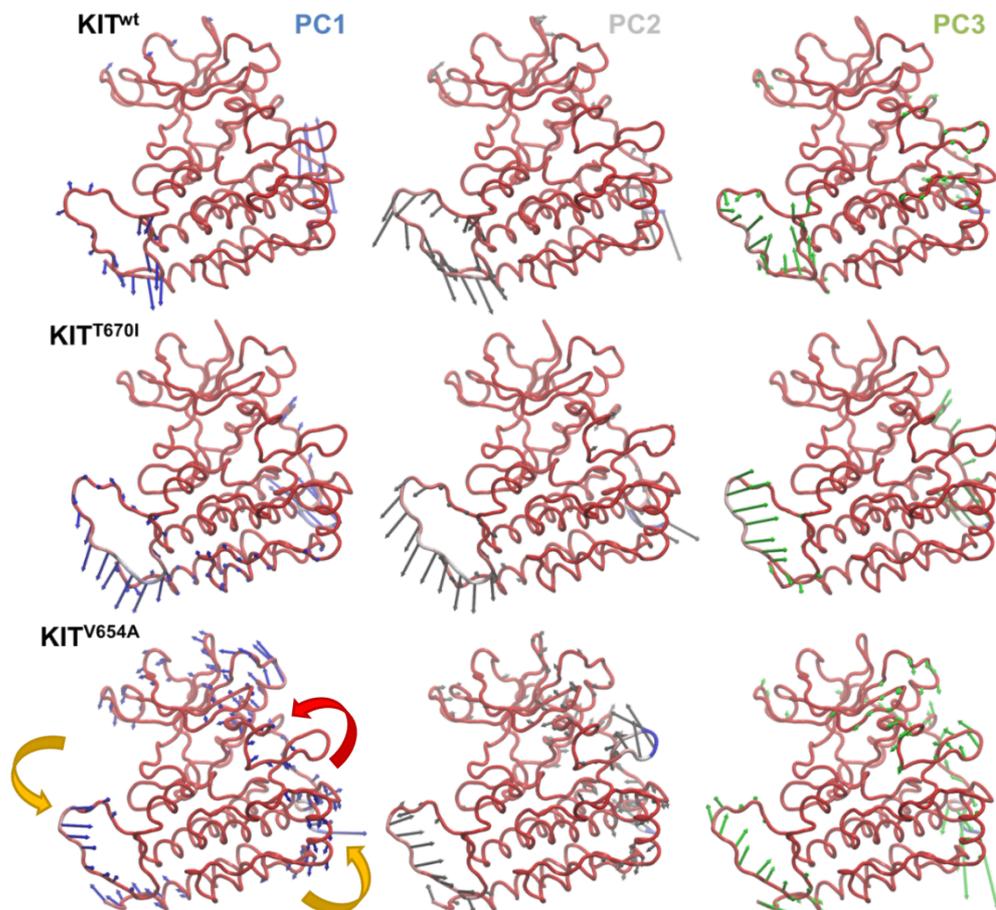


Abbildung 15: Die Richtungen der Trajektorien der Apo-KIT-Varianten abgeleitet aus den ersten drei PCA-Berechnungen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die PCA-Messungen eins, zwei und drei sind entsprechend in den Farben blau, grau und grün gehalten. Die Richtungsänderungsmodi sind für Änderungen $> 1 \text{ \AA}$ gezeigt. Die Proteinstrukturen sind entsprechend ihrer Mobilität koloriert (rot: rigide; blau: flexibel). Die Daten wurden von M. Sc. Christiane Ehrh erhoben und visualisiert. Deutlich zu erkennen ist die Flexibilität Lösungsmittel-exponierter Bereiche in allen drei Varianten (gelbe Pfeile). Lediglich für KIT^{V654A} zeigt sich eine erhöhte Flexibilität im gesamten *back pocket* Bereich sowie dessen umgebenden Bereichen (roter Pfeil).

3.3.1 Strukturbasiertes Inhibitor-Design zu Adressierung von KIT

Vor dem Hintergrund der effektiven inhibitorischen Aktivität von Ponatinib gegenüber den meisten klinisch relevanten KIT-Mutanten und seiner in dieser Kombination einzigartigen Fähigkeit, die KIT^{D816H}-Mutante zu inhibieren, wurden die für die Behandlung von GIST zugelassenen KIT-Inhibitoren mit Ponatinib hinsichtlich ihrer Bindungsmodi aus Ko-kristallstrukturen und literaturbekannten Affinitäten in GIST-Zellen¹⁸⁵ verglichen (Abbildung 16A). So sollten Informationen in Bezug auf die SARs gesammelt werden, die zur Generierung von neuartigen Verbindungen mit Aktivität gegenüber KIT-Exon 17-, 13- und 14-Mutationen für GIST genutzt werden können. Insbesondere sollte eine erhöhte Aktivität auf die klinisch relevante Sekundärmutation KIT^{V654A} erreicht werden, da diese für die Resistenz gegenüber Ponatinib verantwortlich ist. Ziel war es, alle relevanten Interaktionen der Liganden zu identifizieren und für das Design von neuen Inhibitoren zu nutzen.

Die zugelassenen Inhibitoren binden die inaktive DFG-out Konformation von KIT (Abbildung 16A). Sie bilden eine Wasserstoffbrückenbindung zum Amid-Stickstoff des Cys673 Rückgrats in der Scharnierregion (A-Ring) aus (PDB 1t46 (Imatinib), PDB 4u0i (Ponatinib), PDB 3g0e (Sunitinib), Modellierung (Regorafenib)). Regorafenib, Imatinib und Ponatinib besitzen ein Fluorophenyl- bzw. Methylphenyl-Motiv, welches in der Türsteherregion lokalisiert ist (C-Ring). Diese drei Inhibitoren adressieren zusätzlich die *back pocket* von KIT und bilden Wasserstoffbrückenbindungen zur AS-Seitenkette von Glu640 der α -Helix C und dem Rückgrat von Asp810 des DFG-Motivs aus. Ponatinib und Regorafenib weisen zusätzlich einen Trifluoromethyl-Substituenten in der 3-Position des E-Ring auf. Lediglich Imatinib und Ponatinib besitzen in 4-Position des E-Rings einen Methylpiperazin-Substituenten, welcher Wasserstoffbrücken zu Ile789 und His790 ausbildet (Abbildung 16A und B).

Basierend auf den MD-Simulationen und der Ko-Kristallstruktur von KIT^{wt} in Komplex mit Ponatinib (PDB 4u0i), sowie der visuellen Analyse der Strukturen von aktivem KIT^{wt} in Komplex mit Adenosin 5'-diphosphat (PDB 1pkg), dem inaktiven, autoinhibierten KIT^{wt} (PDB 1t45) und den Komplexkristallstrukturen von Imatinib und Sunitinib (PDB 1t46, 3g0e) wurde entschieden, das auf allen KIT-Varianten potente Grundgerüst-Ponatinibs als Ausgangspunkt für den hier angestrebten Optimierungsprozess zu verwenden und die Substituenten R¹-R⁴ zu variieren (Abbildung 16C).

Die Strukturelemente Ponatinibs, welche die Türsteherregion sowie die *back pocket* adressieren, wurden als Grundgerüst für die Entwicklung neuer Verbindungen beibehalten.

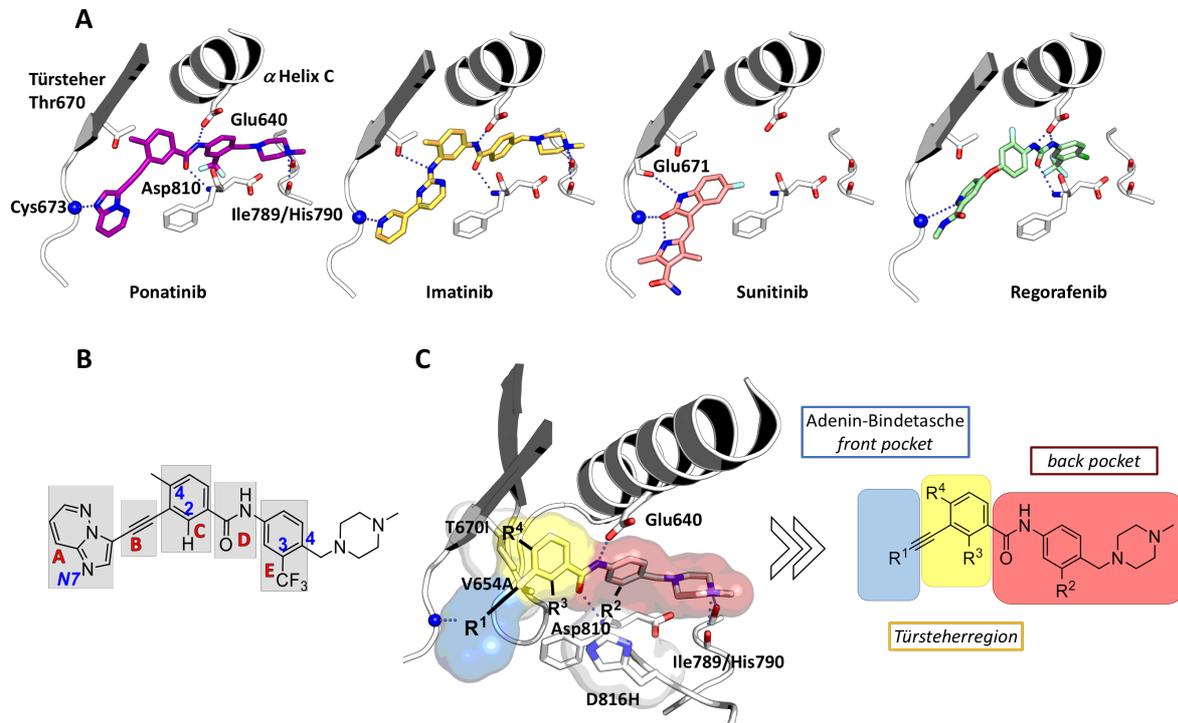
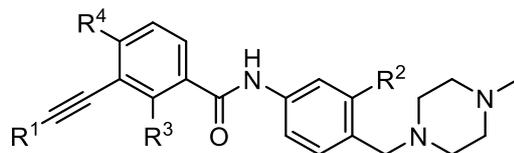


Abbildung 16: **A)** Bindungsmodus der für KIT-abhängigen GIST zugelassenen Inhibitoren in KIT^{wt} (weiß) (PDB 1t46, 3g0e und 4u0i) sowie die Modellierung des vermuteten Bindungsmodus von Regorafenib. Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Punkte dargestellt. **B) C)** Modellierung des Grundgerüsts der zu synthetisierenden Verbindungen in die Röntgenkristallstruktur von KIT^{wt} (PDB 4u0i). Die Lokalisationen der Strukturelemente des Grundgerüsts in der Bindetasche sind farblich gekennzeichnet: Adenin-Bindetasche/*front pocket* (blau), Türsteherregion (gelb) und die *back pocket* (rot). Unter Annahme eines nach Derivatisierung (R¹-R⁴) ähnlichen Bindungsmodus analog der Parentalverbindung Ponatinib sind die antizipierten Wasserstoffbrücken als blaue Punkte dargestellt. Die schematische Darstellung des Grundgerüsts und des Substitutionsmusters sind rechts dargestellt.

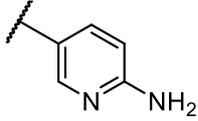
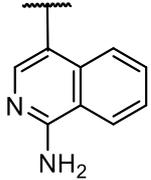
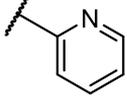
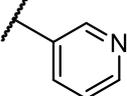
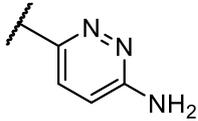
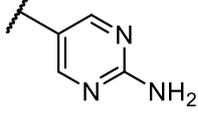
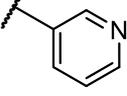
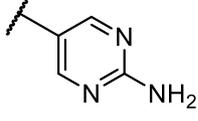
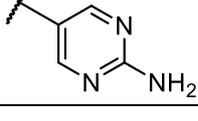
Der Schwerpunkt der Optimierung wurde auf das Scharnierregion-bindende Motiv R¹ gelegt (A-Ring). Dieses Strukturmotiv sollte vor allem in Hinblick auf die KIT^{V654A}-Mutation optimiert werden. In vorausgegangenen Studien von Garner *et al.* wurde ein Verlust bzw. eine Abschwächung der van-der-Waals-Interaktionen zwischen Ponatinib und KIT in Folge der V654A-Mutation postuliert.¹⁵⁷ Kombiniert mit den in Kapitel 3.3 angeführten Ergebnissen der MD-Simulation erschien eine Erweiterung der Wechselwirkungen des Inhibitors zur Scharnierregion zur Kompensation der reduzierten van-der-Waals-Interaktionen und zur Stabilisation der inaktiven Kinasekonformation als vielversprechende Strategie.

Der Alkin-Linker (B), welcher das Scharnierregion-bindende Element mit dem C-Ring verbindet, sollte ebenfalls beibehalten werden, um die positiven Wechselwirkungen mit der Türstehermutation T670I zu erhalten. Der Alkin-Linker umgeht die Türstehermutation in KIT^{T670I} und bildet van-der-Waals-Interaktionen zu Ile670 aus (Abbildung 16C).

Die Modellierung der V654A-Mutation und eine anschließende MD-Simulation mit der entsprechenden Mutante zeigten eine veränderte Oberfläche in diesem Teil der Kinase, resultierend aus der Größe der mutierten AS. Die geringfügige Oberflächenveränderung könnte die Möglichkeit eröffnen, die V654A-Mutation selektiv innerhalb der KIT-Varianten zu adressieren. Deswegen sollten Verbindungen mit einem größeren hydrophoben Substituenten R³ am C-Ring entwickelt werden. Gleichzeitig wurde die Größe des Restes R⁴ reduziert. Der Vergleich der MD-Simulation der Sekundärmutationen KIT^{T670I} und KIT^{V654A} zu KIT^{wt} deutet darauf hin, dass die Methyl-Gruppe in der 4-Position des C-Rings in den Mutanten weniger toleriert wird, in KIT^{V654A} weniger als in KIT^{T670I} (Abbildung 13A). Der Trifluoromethyl-Substituent (R²) am E-Ring wurde graduell über Fluor als Substituent hin zu dem Substitutionsmuster von Imatinib (Wasserstoff) zurückmodifiziert, um zu untersuchen, ob das favorisierte Selektivitätsprofil von Imatinib dadurch wiederhergestellt werden kann. Neben dem Scharnierregion-bindenden Element repräsentiert der Substituent R² einen der strukturellen Hauptunterschiede Ponatinibs zu Imatinib. Im Vergleich der beiden Inhibitoren weist Imatinib jedoch ein überlegenes Selektivitäts- und Toxizitätsprofil auf. Dieser Ansatz sollte einen Einblick in die Relevanz dieser Substituenten in Bezug auf die Bindungsaffinität und Selektivität zu den jeweiligen KIT-Varianten geben. Basierend auf diesen Beobachtungen und Annahmen wurden neuartige niedermolekulare organische Moleküle unter Zuhilfenahme von computergestützten Methoden (MD-Simulation und Docking) in einem iterativen Designzyklus entwickelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Überblick über die geplanten strukturbasierten Typ II-Inhibitoren für die SAR-Studien an KIT^{wt} sowie den relevanten KIT-Mutanten.**6a, 7a-l, 8a-d, 9-b und 10**

Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
6a	H	CF ₃	H	CH ₃
7a		CF ₃	H	CH ₃
7b		CF ₃	H	CH ₃
7c		CF ₃	H	CH ₃
7d		CF ₃	H	CH ₃
7e		CF ₃	H	CH ₃
7f		CF ₃	H	CH ₃
7g		CF ₃	H	CH ₃
7h		CF ₃	H	CH ₃
7i		CF ₃	H	CH ₃
7j		CF ₃	H	CH ₃

7k		CF ₃	H	CH ₃
7l		CF ₃	H	CH ₃
8a*		H	H	CH ₃
8b*		H	H	CH ₃
8c*		H	H	CH ₃
8d*		H	H	CH ₃
9a*		F	H	CH ₃
9b*		F	H	CH ₃
10		CF ₃	CH ₃	H

*Die Verbindungen **8a-d** und **9a, b** sind im Rahmen der Masterarbeit von Jasmin Krüll¹⁹⁰ synthetisiert worden.

Der Fokus bei der Optimierung des Scharnierregion-bindenden Elements der Substanzen lag überwiegend auf der Kompensation des Verlusts der van-der-Waals-Interaktionen als Konsequenz der Sekundärmutation KIT^{V654A}. Als Startpunkt wurde ein aromatisches Sechsringsystem gewählt, welches mit einer Variation an Substitutionsmustern dekoriert werden kann. Auf diese Weise sollte der Einfluss auf die Aktivität durch die Implementierung unterschiedliche Scharnierregion-bindender Motive im Vergleich zum ursprünglichen Imidazolo-pyridazin Element von Ponatinib auf die Zielkinase untersucht werden. Dieses Imidazolo-pyridazin-Element formt eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückgrat des Cys673 der Scharnierregion über N7 (Abbildung 16B).

MD-Simulationen und Docking-Studien deuteten darauf hin, dass die Sekundärmutation KIT^{V654A} nicht nur das hydrophobe Interaktionsnetzwerk zum Inhibitor stört, sondern auch die Konformation der gesamten KD beeinflusst. Aus diesem Grund sollte das Substitutionsmuster des Sechsrings progressiv erweitert werden, um so die möglichen Interaktionen mit der Scharnierregion zu maximieren. Pyridin- und Pyrimidin-basierte Ringsysteme erschienen für diese Vorhaben als vorteilhaft, da sie bereits die minimale Anzahl an Wasserstoffbrücken-Akzeptoren in Form des Ringstickstoffs besitzen und gleichzeitig die Möglichkeit der Derivatisierung mit diversen Substituenten bieten (siehe Tabelle 3). Beginnend mit der geringsten Anzahl möglicher Interaktionen mit der Adenin-Bindetasche in Form von 2- bzw 3-Pyridinderivaten sollten diese durch sukzessive Einführung weiterer Substituenten erweitert und anschließend analysiert werden.

Die postulierte Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen der designten Moleküle analog zur Parentalverbindung Ponatinib wurde durch molekulare Dockingversuche untersucht. Dafür wurde ein *ensemble docking* in Bezug auf die Ponatinib-Bindetasche für die drei zuvor untersuchten KIT-Varianten (KIT^{T670I}, KIT^{V654A} und KIT^{wt}) durchgeführt. Für das Docking wurden die repräsentativen Strukturen aus einem RMSD-basierten Clustering der Bindetasche der jeweiligen Variante genutzt. Zur Evaluierung und Kontrolle der Docking-Parameter wurde ein *redocking* von Ponatinib durchgeführt. Da die entwickelten Verbindungen (Tabelle 3) eine gewisse Ähnlichkeit zu Ponatinib aufweisen, wurde eine hohe Ähnlichkeit im Bindungsmodus sowie eine gewisse inhibitorische Aktivität der Verbindungen für KIT prognostiziert.

Tatsächlich weisen die Modellierungs-Studien darauf hin, dass **5** und **7-10** einen vergleichbaren Bindungsmodus wie Ponatinib für die KIT-Varianten besitzen. Die Substanzen besetzen die drei Subtaschen des aktiven Zentrums von KIT: die ATP-Bindetasche, die Türsteherregion und die *back pocket* (Abbildung 16C). Der Scharnierregion-bindende Teil der Verbindungen bildet Wasserstoffbrücken zu dem Peptidrückgrat der Scharnierregion aus. Die nur in der inaktiven Konformation zugängliche *back pocket* wird über das Phenylbenzamid-Element adressiert. Das sekundäre Amin des Amid-Linkers (D) geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylat-Gruppe der Seitenkette von Glu640 der α -Helix C und der Carbonylsauerstoff des Amids mit dem Rückgratstickstoff des Asp810 des DFG-Motivs ein.

Der methylierte und unter physiologischen Bedingungen protonierte Stickstoff des löslichkeitsvermittelnden Methylpiperazin-Elements interagiert via Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonyl-Gruppen des Rückgrats von Ile789 und His790 (Abbildung 16B). Dieser Prozess sollte eine iterative Prüfung der strukturbasierten Hypothesen über eine biochemische und zelluläre Charakterisierung ermöglichen. Die daraus abgeleitete SAR sollte für die Entwicklung von kleinen Molekülen zur selektiven und potenten Adressierung der klinisch relevanten KIT-Mutanten genutzt werden.

3.3.2 Optimierung des Selektivitätsprofils der Inhibitoren zu VEGFR2

Eine schwerwiegendere dosisabhängige Nebenwirkung in der Therapie mit Ponatinib ist die arterielle Thrombenbildung, die in 11.8 % der Patienten mit BCR-Abl positiven Leukämie beobachtet werden kann.^{158, 164} Es ist noch nicht erwiesen, dass die Inhibition der an der Angiogenese beteiligten Kinasen wie VEGFR1-3 und TIE2 durch den Multikinaseinhibitor Ponatinib in Zusammenhang mit der arteriellen Thrombenbildung steht, allerdings wird es in der Literatur als potentielle Möglichkeit diskutiert.^{157, 165} Die Optimierung der Inhibitorstruktur in Bezug auf die Selektivität zu den oben genannten Kinasen sollte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit angestrebt werden, um eine Möglichkeit zur Aufklärung der Auswirkung der Inhibition dieser zu untersuchen. Als Vertreter der an der Regulation Vaskulogenese und Angiogenese beteiligten Proteinkinasen wurde VEGFR2, eine Proteinkinase der VEGF-Rezeptor Familie in Betracht gezogen. Die Typ V-transmembran-RTK VEGFR2 wurde ausgewählt, da diese Rezeptorform alle VEGF-Isoformen bindet und dadurch nahezu alle bekannten damit verbundenen Zellantworten reguliert. Seine dominante Rolle in der Signaltransduktion macht VEGFR2 zur klinisch relevantesten VEGF-Rezeptorform.¹⁹¹ Die pathologische VEGFR2-Aktivierung ist an der Tumorangio-genese in vielen Krebsarten beteiligt.¹⁹²⁻¹⁹⁶ VEGFR2 (KDR/Flk-1) ist kritisch für die Entwicklung vaskulärer Endothelzellen und reguliert nachgeschaltete Signalkaskaden, die im Endothel die Prozesse der Zell-Proliferation, -migration, -permeabilität und des -überlebens und damit die Vaskulogenese sowie die Angiogenese steuern.^{191, 197}

Die extrazelluläre Region von VEGFR2 besteht aus sieben Ig-ähnlichen Domänen und einer transmembranen Domäne. Die intrazelluläre Region setzt sich aus der JM-Domäne und der durch eine Kinaseinsertionssequenz gespaltenen KD zusammen.

VEGFR2 wird durch den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) aktiviert.^{191, 197} Aus phylogenetischer Sicht gehört VEGFR2 zu der 7-Ig/5-Ig Proteintyrosinkinase-Superfamilie und ist eng mit PDGFR und KIT verwandt.¹⁹⁷ Dies zeigt sich auch im Vergleich der hochkonservierten ATP-/Liganden-Bindetaschen von KIT und VEGFR2 (Abbildung 17A-E).

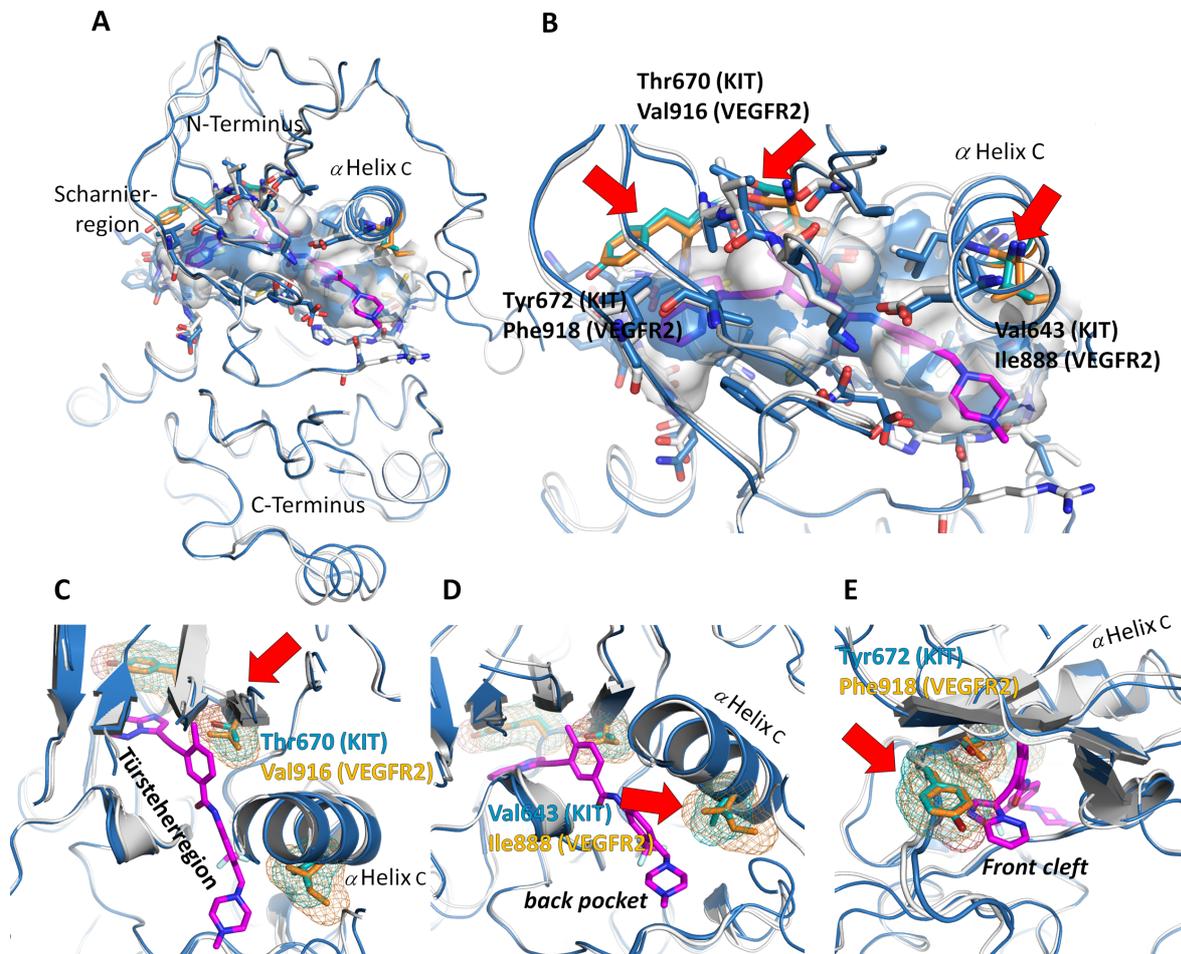


Abbildung 17: Vergleich des aktiven Zentrums von KIT^{wt} (weiß, PDB 4u0i) und VEGFR2 (blau, PDB 4asd). **A)** Darstellung der AS die unmittelbar mit dem Liganden Ponatinib (magenta) in Kontakt treten und die Liganden-Bindetasche (Oberflächendarstellung) formen **B)** Detaillierte Darstellung der Bindetasche von KIT^{wt} (weiß) und VEGFR2 (blau). Die sich unterscheidenden AS-Seitenketten der aktiven Zentren beider Kinasen sind für KIT^{wt} türkis und für VEGFR2 orange eingefärbt und entsprechenden Pfeilen gekennzeichnet. Detaillierte Ansicht der der sich unterscheidenden AS im aktiven Zentrum von KIT^{wt} (türkis) und VEGFR2 (orange) die potentiell in Wechselwirkungen mit Ponatinib (magenta) treten können: **C)** Ansicht der Türsteher-AS und der Türsteherregion. **D)** Ansicht der in der *back pocket* befindlichen unterschiedlichen AS. **E)** Ansicht der in der *front pocket* befindlichen unterschiedlichen AS.

Der Vergleich zeigt, dass sämtliche AS-Reste, die die Liganden-Bindetasche formen, gleich sind, mit Ausnahme der Türsteherreste (Thr670 (KIT); Val916 (VEGFR2)) (Abbildung 17C) und den Resten Tyr672 (KIT^{wt})/Phe918 (VEGFR2) und Val643 (KIT^{wt})/Ile888 (VEGFR2). Letztere bilden keine direkten Wechselwirkungen zu Ponatinib aus (Abbildung 17D-E).

Ausschließlich die Türsteherreste unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Polarität. Die Strukturhomologie in Bezug auf die Liganden-Bindetaschen von VEGFR2 und KIT erhöht sich durch die Mutation der Türsteheramino­säure in KIT. Die Mutation des polaren Thr760 in den unpolaren, hydrophoben AS-Rest Ile in KIT korrespondiert mit dem unpolaren, hydrophoben AS-Rest Val916 in VEGFR2 (Abbildung 18).

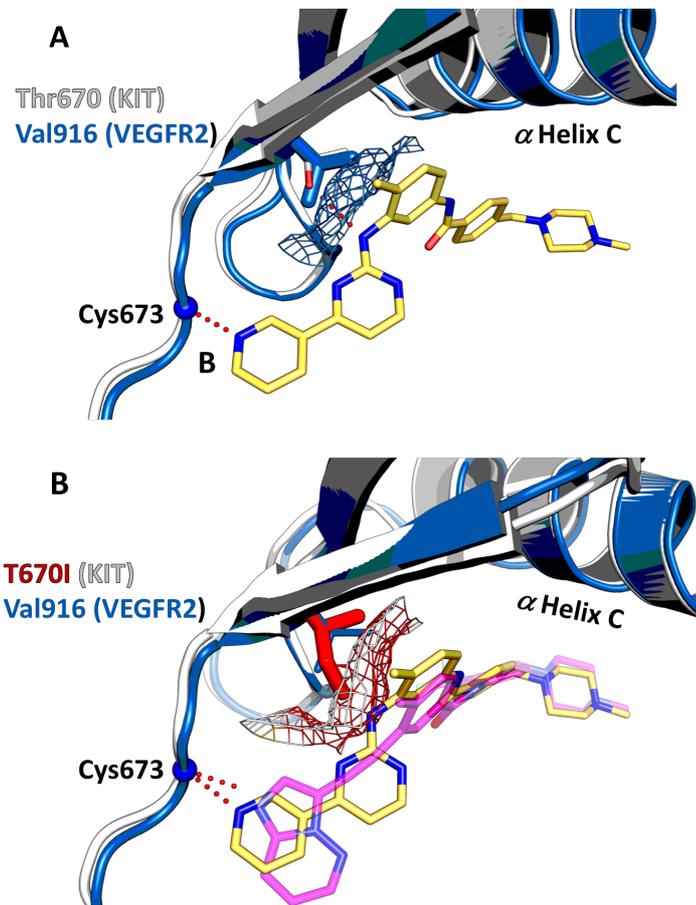


Abbildung 18: A) Überlagerung von KIT^{wt} (weiß, PDB 4u0i) und VEGFR2 (blau, PDB 4asd). Wasserstoffbrückenbindungen zu Imatinib (gelb) sind in roten Punkten dargestellt. Als blaues Netz dargestellt ist die Bindetaschenoberfläche der Türsteheramino­säure von VEGFR2, welche nicht als Protonenakzeptor fungieren kann und aufgrund ihrer Polarität in repulsive Wechselwirkungen mit dem sekundären Amin des Liganden Imatinib tritt. B) Überlagerung der modellierten KIT^{T670I}-Mutation (weiß, PDB 4u0i) und VEGFR2 (blau, PDB 4asd). Die mutierte Türsteheramino­säure von KIT ist in rot hervorgehoben. Der Vergleich von Ponatinib (magenta) und Imatinib (gelb) zeigt die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem mutierten Türsteherrest Ile670.

Die Sekundärmutation KIT^{T670I} bewirkt, neben der sterischen Repulsion durch die relative Größe des mutierten Türsteheramino­säurerestes, den Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenketten-Hydroxylgruppe des Wildtyp Türsteherrests Thr670 und dem Aminopyrimidin-Motiv in Imatinib (Abbildung 18A). Die Umgehung dieser Mutation durch Inhibitoren wie Regorafenib und Sunitinib, die für VEGFR2 designt wurden, beeinträchtigt die Selektivität, die Imatinib gegenüber VEGFR2 aufweist.

Der Inhibitor Ponatinib, der ursprünglich zur Umgehung der Türstehermutation T315I in Abl entwickelt wurde, wechselwirkt positiv mit der analogen KIT^{T670I}-Mutation und dem hydrophoben unpolaren Türsteherrest Val916 von VEGFR2, was eine selektive Adressierung von KIT im Vergleich zu Imatinib herausfordernd gestaltet (Abbildung 18B). Dies wird auch im Docking der Verbindungen **6a**, **7a-7l**, **8a-d**, **9a-b**, **10** deutlich. Hier zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied in den Posen noch in den ausgebildeten Interaktionen zu KIT^{wt}, KIT^{D559V/T670I}, KIT^{D559V/V654A} und VEGFR2.

Die in Kapitel 3.3 durchgeführten MD-Simulationen des wt und der beiden Sekundärmutationsvarianten T670I und V654A von KIT zeigten für die Variante V654A eine geringfügige Oberflächenänderung von KIT im Bereich der Mutation.

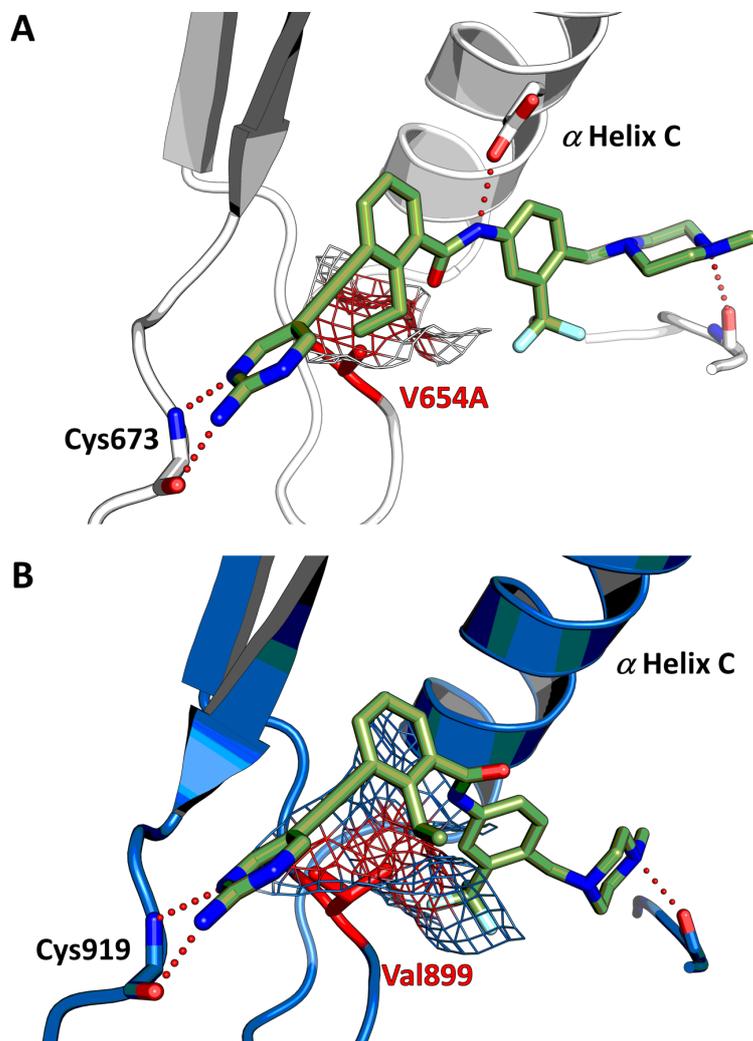


Abbildung 19: A) Docking einer Verbindung dekoriert mit einem Ethyl-Rest in Position R³ in die MD-simulierte KIT^{V654A}-Variante. Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote Punkte dargestellt. B) Docking derselben Verbindung in VEGFR2. Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote Punkte dargestellt.

Die Mutation von Val zu Ala könnte nicht nur die Möglichkeit eröffnen, Selektivität zu den restlichen KIT-Varianten zu erzeugen, sondern auch Selektivität gegenüber VEGFR2 zu generieren (Abbildung 19A). VEGFR2 besitzt an dieser Stelle ein konserviertes Val (Abbildung 19B).¹⁰⁹ Die Derivatisierung des Restes R³ in der 2-Position des C-Rings (Abbildung 16) zeigte im Docking für Verbindung **10** keinen Unterschied im Bindungsmodus. Allerdings konnte im Docking für größere Substituenten (> Methyl) ein abweichender Bindungsmodus beobachtet werden (Abbildung 19B). Dieser Bindungsmodus könnte auf repulsive Wechselwirkungen zwischen dem Val899 und diesen Substituenten (hier: Ethylrest) in 2-Position des C-Rings hindeuten. Mittels molekularer Modellierung wurden mögliche Variationen von R³, unabhängig von der synthetischen Zugänglichkeit, modelliert und in Dockingversuchen evaluiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Mögliche sterisch anspruchsvolle Substituenten R³ und R⁴, eingeführt durch die entsprechenden Carbonsäuren **11a-h**, für die Entwicklung von Inhibitoren zur Adressierung von KIT^{D559V/V654A}.

Nr.	Carbonsäure	Nr.	Carbonsäure
11a		11e	
11b		11f	
11c		11g	
11d		11h	

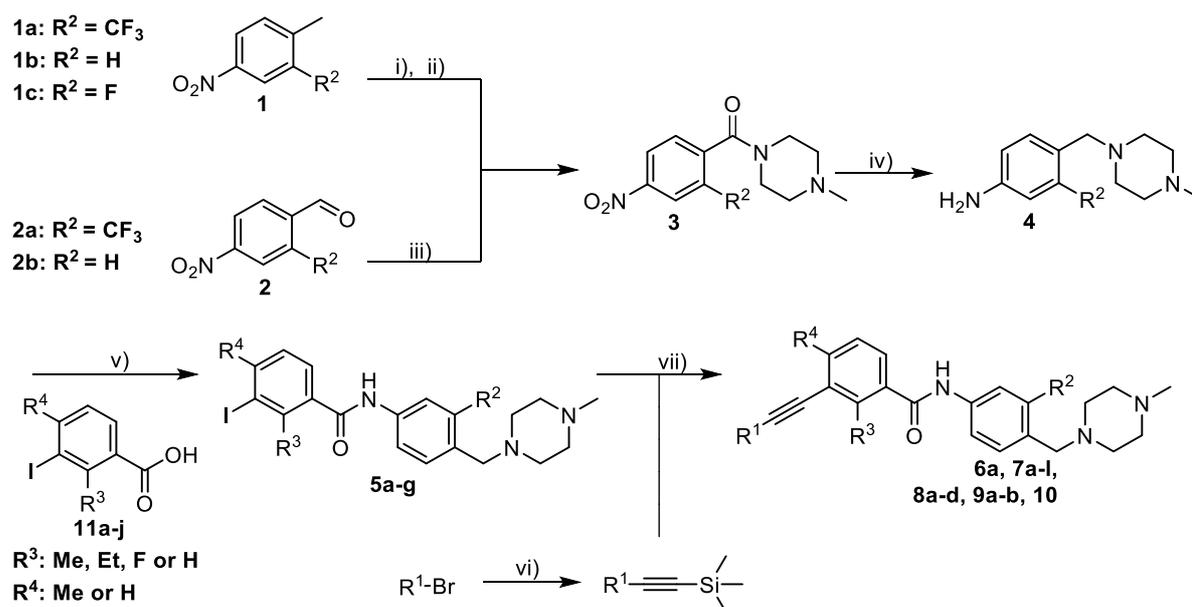
In diesen Variationen wird auf das sogenannte „Flag“ Methyl¹⁹⁸⁻¹⁹⁹ in Position R⁴ weitestgehend verzichtet. Die meisten vorgeschlagenen Substitutionsmuster von **11a-11h** in R³ sind synthetisch nicht zu realisieren, wenn R⁴ ebenfalls substituiert ist (mit Ausnahme von **11g**). Da allerdings die MD-Simulationen der Sekundärmutationen darauf hinwiesen, dass ein Substituent in R⁴ eher unvorteilhaft ist (Abbildung 13) und der die inaktive Konformation stabilisierende Effekt der Methylgruppe in R⁴ in dem Ponatinib-basiertem Gerüst der geplanten Verbindungen durch die CF₃-Gruppe in der *back pocket* weitestgehend kompensiert werden sollte, wurde die Variation ohne „Flag“ Methyl in Position R⁴ dennoch für die Synthese von möglichen Zielverbindungen (Tabelle 4) mit den Carbonsäuren **11a-11h** in Betracht gezogen.

Basierend auf diesen Ergebnissen und vorgeschlagenen Zielmolekülen sollten Syntheserouten mit dem Ziel entwickelt werden, eine fokussierte strukturbasierte Substanzbibliothek zu erzeugen und für die Inhibitoren ein allgemein verbessertes Selektivitätsprofil, besonders bezüglich VEGFR2, und eine erhöhte Affinität für die KIT^{V654A}-Variante zu erreichen.

3.3.3 Synthese der fokussierten strukturbasierten Substanz-Bibliothek

Die Synthese der in Kapitel 3.3.1 vorgestellten fokussierten, auf Ponatinib basierenden Substanzbibliothek erfolgte unter Zuhilfenahme literaturbekannter Synthesevorschriften,^{162, 198, 200-204} welche im Hinblick auf die jeweiligen Zielsubstanzen und Syntheseschritte optimiert wurden (Schema 1).

Schema 1: Syntheseroute der Derivate basierend auf der Parentalverbindung Ponatinib.^a

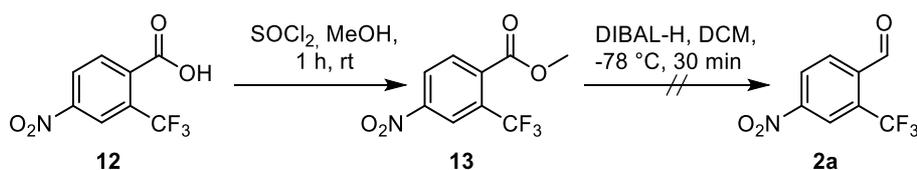


^a Reagenzien und Bedingungen: (i) *N*-Bromsuccinimid, AIBN, DCE, 80 °C, 12 h (60-66 %); (ii) 1-Methylpiperazin, K_2CO_3 , DCM, rt, 3 h (80-91 %); (iii) 1-Methylpiperazin, $NaBH(OAc)_3$, AcOH, THF, 0 °C-rt, 16 h (60-70 %); (iv) Pd/C, H_2 , EtOH, 12 h (98 %); (v) HATU, DIPEA, DCM, DMAP, Benzoesäure-Derivat **11a-i** rt, 16 h (49-88 %); (vi) $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, CuI, (*i*-Pr)₂NH, R^1 -Br (**22a-l**), ACN, 80 °C, 16 h; (vii) $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, CuI, (*i*-Pr)₂NH, TBAF, ACN, 80 °C, 16 h (1-65 %).

Initial wurden für Verbindung **3a** und **3b** die kommerziell erhältlichen Benzoesäurederivate 4-Nitrobenzaldehyd (**2b**) und 4-Nitro-2-(trifluoromethyl)benzaldehyd (**2a**) genutzt, die im Zuge einer milden reduktiven Aminierung²⁰⁵ mit $NaBH(OAc)_3$ zu den entsprechenden Nitrobenzylpiperazinen (**3a** und **3b**) umgesetzt werden konnten. Für die nachfolgenden Syntheseschritte sollten die Reaktionsbedingungen für eine Synthese im Multigrammmaßstab skaliert werden. Die Aldehyde konnten dafür nicht mehr als Startmaterialien bereitgestellt werden, da sich zum einen immer wieder Lieferschwierigkeiten schon bei geringen Mengen ergaben und zum anderen die kommerzielle Beschaffung in den angestrebten Mengen sehr kostenintensiv war. Zudem war der fluorierte Aldehyd nicht kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund wurden parallel mehrere alternative Ansätze verfolgt.

Die klassische Reduktion von Carbonsäure (hier: 4-Nitro-2-(trifluoromethyl)benzoesäure (**12**)) über die intermediäre Generierung eines Esters (hier: Methyl-4-nitro-2-(trifluoromethyl)benzoat (**13**)) zum Aldehyd mit DIBAL-H bei tiefen Temperaturen (-78 °C)²⁰⁶ führte zur Zersetzung des Startmaterials **13**, wobei in Spuren die Reduktion zur Methylgruppe sowie die Reduktion zum Alkohol im NMR nachgewiesen werden konnte (Schema 2).

Schema 2: Reaktionsbedingungen zur Darstellung von 4-Nitro-2-(trifluoromethyl)benzaldehyd.



Die Generierung des Alkohols **14** und anschließende Oxidation zum Aldehyd **2a** in einem zweistufigen Syntheseprozess führte nicht zur Generierung der gewünschten Zielsubstanz **2a**. In diesem Fall konnte ebenfalls die Zersetzung des Startmaterials **14** beobachtet werden (Schema 3, Tabelle 5).

Schema 3: Reaktionsschema zur Darstellung von 4-Nitro-2-(trifluoromethyl)benzaldehyd aus dem entsprechenden Alkohol **14**. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

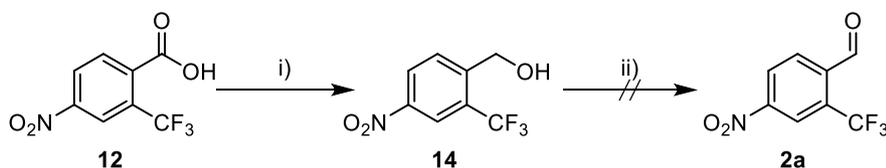
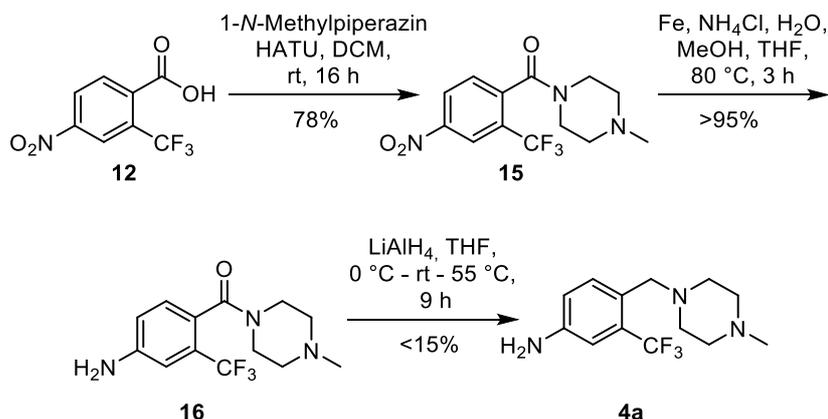


Tabelle 5: Reaktionsbedingungen zur Darstellung von 4-Nitro-2-(trifluoromethyl)benzaldehyd aus dem entsprechenden Alkohol.

Nr.	Bedingungen	Ausbeute
1	i) (Py)Zn(BH ₄) ₂ , THF, reflux, 3 h ²⁰¹ ii) PCP, DCM, 0 °C-rt, 1 h ²⁰²	-
2	i) NaBH ₄ , THF, 0-40 °C, 12 h ²⁰⁷ ii) PCC, THF, rt, 3 h ²⁰⁸	-
3	i) NaBH ₄ , THF, 0-40 °C, 12 h ii) TEMPO, I ₂ , THF, rt ²⁰⁹	-
4	i) NaBH ₄ , THF, 0-40 °C, 12 h ii) IBX, DCM, rt ²¹⁰	-

Die Umsetzung der Carbonsäuren **12** mit 1-*N*-Methylpiperazin lieferte zwar das gewünschte Amid, die anschließende Reduktion des Amids mit LiAlH₄ führte in einem Reaktionsmaßstab größer als 30 mg zu Ausbeuten unter 15 %, was für die weitere Umsetzung nicht ideal war (Schema 4).

Schema 4: Reaktionsbedingungen zur Darstellung von 4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)anilin (**4a**).



Als Konsequenz wurde ein alternatives Startmaterial für die Synthese der Nitroarylpiperazine **3a-c** herangezogen.²⁰¹ Als Edukte dienten die kommerziell erhältlichen Toluol-Derivate **1a-c** (Schema 1), die zunächst selektiv bromiert und ohne weitere Aufreinigung in einer S_N2-Substitution mit 1-*N*-Methylpiperazin zu den gewünschten Nitroarylpiperazinen umgesetzt wurden. Die Bromierungen verliefen mit einer Ausbeute von 60-66 %.

Bei den restlichen 34-40 % handelte es sich um nicht umgesetzte Edukte **1a-c**, welche auch bei weiterer Zugabe des Bromierungsreagenzes nicht weiter umgesetzt wurden. Nach erfolgter Substitutionsreaktion konnten die Toluol-Derivate **1a-c** säulenchromatographisch von den Nitroarylpiperazin **3a-c** als einzige „Verunreinigung“ abgetrennt und einer erneuten Bromierungsreaktion zugeführt werden.

Die Aniline **4a-c** wurden über eine Palladium-katalysierte Hydrierung aus den Nitroarylpiperazinen **3a-c** generiert (Schema 1). Die Synthese der Vorläuferverbindungen **5a-g** erfolgte über eine klassische Amid-Kupplung der Aniline **4a-c** mit den entsprechenden Benzoessäure-Derivaten (Tabelle 6, Schema 1). Dazu wurden klassische Synthesevorschriften durchmustert, um eine maximale Ausbeute zu erzielen (Tabelle 7).

Tabelle 6: Identität der Amide **5a-g**.

5a-g

Nr.	R	R ²	Nr.	R	R ²
5a		CF ₃	5e		CF ₃
5b		H	5f		CF ₃
5c		F	5g		CF ₃
5d		CF ₃			

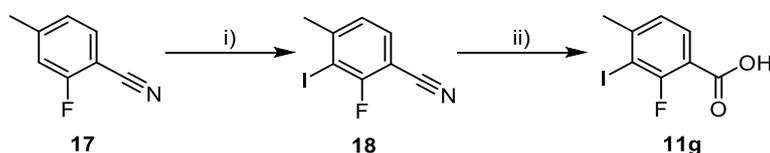
Tabelle 7: Durchmusterung von Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Amide **5a-g**. Für die Etablierung der Reaktionsbedingungen wurde 3-Iodo-4-methylbenzoesäure herangezogen.

Nr.	Bedingungen	Ausbeute
1	3-Iodo-4-methylbenzoesäurechlorid, Toluene, rt, 16 h	58 %
2	HATU, DIPEA, DMF, rt, 16 h	65 %
3	HATU, DIPEA, DCM, rt, 16 h	70 %
4	HOBt, EDC, DIPEA, DMAP, DMF, rt, 16 h	68 %

Synthesevorschrift Nummer 3 (Tabelle 7) lieferte vergleichbare Ergebnisse zu 2 und 4, zeigte aber den wesentlichen Vorteil, dass im Vergleich zu 4 ein Kupplungsreagenz weniger benötigt wurde. Zudem kann für Reaktionsbedingung 3 die Verwendung von hochsiedenden Lösungsmitteln umgangen werden, wodurch sich die Reaktionsaufarbeitung wesentlich erleichtert.

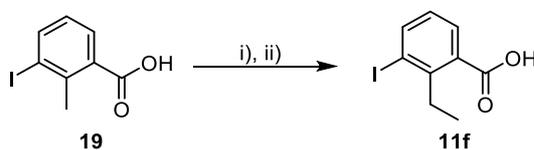
Von den in Kapitel 3.3.2 vorgestellten Bezoensäurederivaten **11a-h** konnten **11f-h**, zusätzlich zu den Varianten 3-Iodo-4-methylbenzoesäure (**11i**), 2,4-dimethylbenzoesäure (**11j**) durch Amidkupplung zu den entsprechenden Intermediten **5a-g** umgesetzt werden. Die Bezoensäurederivate **11f-j** waren bis auf 2-Fluoro-3-iodo-4-methylbenzoesäure (**11g**) und 2-Ethyl-3-iodobenzoiesäure (**11f**) kommerziell erhältlich. Ausgehend von dem Nitril **17** wurde **11g** im Zuge einer regioselektiven Iodierung und anschließender saurer Hydrolyse der Nitrilgruppe mit Schwefelsäure gewonnen (Schema 5).²¹¹ Durch die Methylierung von 3-Iodo-2-methylbenzoesäure **19** konnte 2-Ethyl-3-iodobenzoiesäure **11f** dargestellt werden (Schema 6).²¹²

Schema 5: Darstellung von 2-Fluoro-3-iodo-4-methylbenzoesäure (**13**).^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin, *n*-Butyllithium, THF, -70 - -50 °C, 2 h (60 %); (ii) **18**, Dioxan/H₂SO₄ (1:1), 115 °C; 48 h (90 %).

Schema 6: Darstellung von 2-Ethyl-3-iodobenzoiesäure (**15**).^a



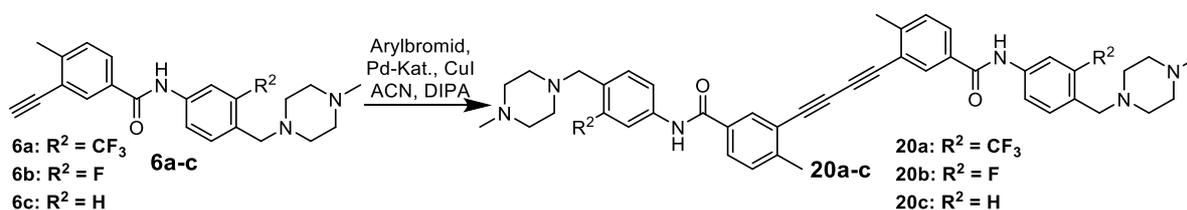
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) *n*-Butyllithium, Diisopropylamin (DIPA), THF, -50 °C, 1 h; (ii) Methyljodid, THF, -50 - -20 °C, 1 h (86 %).

Der letzte Schritt der Syntheseroute ist die Einführung des Scharnierregion-bindenden Elements über eine Sonogashira-Reaktion.²¹³ Die Palladium-Kupfer-katalysierte C-C Bindungsbildung zwischen einem sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom eines Aryl- oder Vinylhalogenids mit einem terminalen sp -hybridisierten Alkin wird als Sonogashira-Reaktion oder -Kupplung bezeichnet. Die Entdecker der Reaktionsbedingungen Sonogashira, Tohda, und Hagihara kombinierten 1975 die Palladium-katalysierten Kupplungsreaktionsbedingungen von Cassar²¹⁴, Dieck und Heck²¹⁵ mit katalytischen Mengen an CuI.²¹³

Die so optimierten Reaktionsbedingungen reduzierten die relativ harschen Reaktionstemperaturen der Cassar, Dieck und Heck-Reaktion von über 100 °C auf Raumtemperatur. Auf diese Weise konnten die Ausbeuten erhöht und die Anwendungsmöglichkeiten erheblich erweitert werden. Die Kupfer-kokatalysierte Sonogashira erfordert allerdings eine Reaktionsführung unter striktem Ausschluss von Luftsauerstoff durch Entgasung der flüssigen Reaktionskomponenten, sowie anschließendem Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre, um der Kupfer-katalysierten Alkinhomokupplung, der sogenannten Glaser-Reaktion, vorzubeugen.²¹⁶

Die elegantere und für die Parallelsynthese geeignetere Reaktionsführung wäre die Umsetzung der Vorläuferverbindungen **5a-f** zu den entsprechenden Alkinen in einer ersten Sonogashira-Reaktion und die anschließende Kupplung der Scharnierregion-bindenden Arylbromide in einer zweiten Sonogashira-Reaktion. Diese Syntheseroute erwies sich allerdings als nicht praktikabel, da als Hauptprodukt der Umsetzung der Vorläuferverbindungen **5b, c** zu den korrespondierenden entschützten Alkinen (**6a-c**) in der zweiten Sonogashira-Reaktion das Dimer **21a-c** detektiert wird (Schema 7). Der detektierte Reaktionsumsatz zeigte, dass die Dimerbildung der Vorläuferverbindungen in Zusammenhang mit dem Substituenten R^2 zu sein schien. Huang *et al.*¹⁶² beobachteten bereits, dass ein mit einer CF_3 -Gruppe dekoriertes Ponatinib-Grundgerüst das Dimer als Hauptprodukt liefert (Schema 7). Für Fluor in dieser Position trifft dies ebenfalls zu. Für Wasserstoff in dieser Position konnte allerdings eine weniger gravierende Dimerbildung beobachtet werden, sodass hier mit dem Alkin **6c** gearbeitet werden konnte.

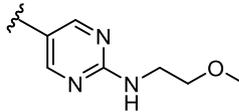
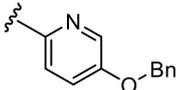
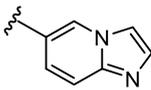
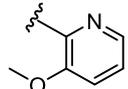
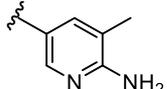
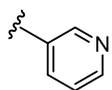
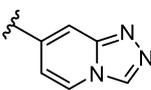
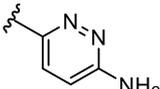
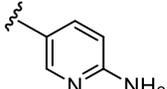
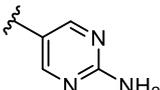
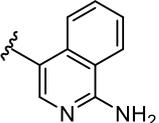
Schema 7: Darstellung des Hauptprodukts (Dimer) der Sonogashira-Reaktion mit den Alkinen **6a-c** als Edukt.



Mit dem Ziel, die Synthese in einem Parallelreaktor durchzuführen, wurde allerdings einer einheitlichen Syntheseroute der Vorzug gegeben. Aus diesem Grund wurden zunächst die Arylbromide mit Trimethylsilylacetylen (TMSA) umgesetzt.

Die entsprechenden Silyl-geschützten Alkine der Sechsringsysteme (**21a-l**), die mit der Scharnierregion interagieren sollen, sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Diese waren entweder kommerziell erhältlich oder wurden aus den entsprechenden Arylbromiden generiert.

Tabelle 8: Identität der Alkine **21a-l**.

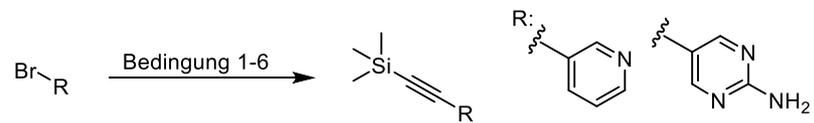
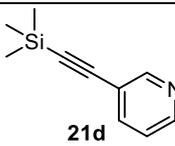
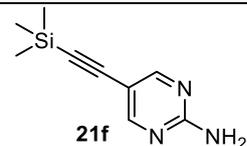
$\text{R-Br } \mathbf{22a-l} + \text{Si(CH}_3\text{)}_2\text{C}\equiv\text{C} \xrightarrow{\text{Pd-Kat., CuI}} \text{R-C}\equiv\text{C-Si(CH}_3\text{)}_2 \mathbf{21a-l} \xrightarrow{\text{TBAF}} \text{R-C}\equiv\text{C} \mathbf{23a-l}$			
Nr.	R	Nr.	R
21a		21g	
21b		21h	
21c		21i	
21d		21j	
21e		21k	
21f		21l	

Die getesteten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Für die Testreaktionen wurden die Arylbromide 3-Bromopyridin (**22d**) und 5-Bromopyrimidin-2-amin (**22f**) als repräsentative Scharnierregion-bindende Elemente genutzt. Die Reaktionsbedingungen wurden bei den Temperaturen rt, 50 °C und 80 °C durchgeführt. Bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C zeigte sich ein vollständiger Umsatz des Produkts, während bei rt kein und bei 50 °C nur ein geringer Umsatz beobachtet werden konnte.

Für Reaktionsbedingung 4 (Tabelle 9) konnte über das UV-Chromatogramm des LCMS-Spektrums ein kompletter Umsatz der Edukte beobachtet werden, weshalb diese Bedingung für die Parallelsynthese aller Arylbromide genutzt wurde.

Die Verwendung des gängigen, in der Sonogashira-Reaktion verwendeten Lösungsmittels Acetonitril (ACN) oder auch die Base Triethylamin (Et_3N) als alleiniges Lösungsmittel, zeigten den erwünschten Reaktionsumsatz. Die Verwendung von $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ als Pd-Katalysator zeigte die Generierung einer Vielzahl von Nebenprodukten sowie nur eine spurenhafte Produktformation. Dies könnte auf eine für die verwendeten Edukte zu hohe Reaktivität der $\text{Pd}(0)$ -Spezies hindeuten.

Tabelle 9: Durchmusterung von Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Alkine **21a-21i**. Es wurden 10 mol% Pd-Katalysator und 5 mol% CuI für sämtliche Reaktionen genutzt. „✓“ = Produktbildung, „-“ = kein Produkt detektiert.

			
Nr.	Bedingungen	Produktformation	
		 21d	 21f
1	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, TMSA, THF, Piperidin, H_2O , 80 °C	-	-
2	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, TMSA, ACN, DIPA, 80 °C	✓	✓
3	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, TMSA, EtAc, Wasser, Et_3N , 80 °C	-	-
4	$\text{Pd}(\text{PPh}_2)\text{Cl}_2$, CuI, TMSA, ACN, DIPA, 80 °C	✓	✓
5	$\text{Pd}(\text{PPh}_2)\text{Cl}_2$, CuI, TMSA, THF, Et_3N , 80 °C	-	-
6	$\text{Pd}(\text{PPh}_2)\text{Cl}_2$, CuI, TMSA, Et_3N , 80 °C	✓	✓

Die Aufreinigung der erhaltenen Silyl-geschützten Alkinbausteine gestaltete sich schwierig, da zum einen zahlreiche nicht UV-aktive Verunreinigungen, nur in konzentrierter Form visuell detektiert werden konnten und zum anderen die Alkine einen niedrigen Siedepunkt besaßen.

Die Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck war nur teilweise möglich, da ein Großteil der Alkinbausteine unter diesen Bedingungen leicht flüchtig war. Zudem zeigte sich, dass die Silylschutzgruppe für die synthetisierten Alkinbausteine unter säulenchromatographischen Bedingungen (C₄; DCM/MeOH) nicht stabil ist. Deshalb wurde die basische Entschützung direkt im Anschluss ohne Aufreinigung der Silyl-geschützten Alkine durchgeführt und mittels GCMS auf ihre Vollständigkeit überprüft. Die Reaktionsmischung wurde über Celite[®] filtriert, das Lösungsmittel soweit wie möglich entfernt und die zweite Sonogashira-Reaktion ohne weitere Aufreinigung durchgeführt. Für die zweite Sonogashira-Kupplung wurden mindestens fünf Äquivalente der Alkine (**23a-l**) (Tabelle 8) eingesetzt, bezogen auf den aus dem LCMS-Chromatogramm ersichtlichen Grad der Umsetzung. Die Testreaktion wurde zunächst unter den Bedingungen aus der ersten Sonogashira durchgeführt. Die Testreaktionen zeigten, dass die getesteten Alkine nach ca. drei Stunden Reaktionszeit vollständig umgesetzt wurden, während die Vorläuferverbindungen **5a-f** noch vorhanden waren. Nach 16 Stunden Reaktionszeit waren beide Edukte umgesetzt, allerdings konnte die Bildung des Produkts nicht nachgewiesen werden. Während der Reaktionsdurchführung wurde die Bildung eines viskosen, schwarzen Niederschlags beobachtet. Da die Produkte der Glaser-Reaktion nicht nachgewiesen werden konnten, wird von einer Polymerisation der Alkine unter den Bedingungen der Sonogashira-Reaktion ausgegangen. Diese könnte zusätzlich durch die Koordination des Palladium-Katalysators an die funktionellen Gruppen der Alkinbausteine begünstigt worden sein. Da die Vorläuferverbindungen **5a-f** im Verlauf der Reaktion auch nicht mehr nachgewiesen werden konnten, wurde eine Zersetzung oder ebenfalls eine Beteiligung an einer Polymerisationsreaktion vermutet. Aus diesem Grund wurden verschiedene Reaktionsbedingungen, vor allem unter Variation des Katalysators und der Reaktionstemperatur, getestet (Tabelle 10). Eine Polymerisation der Alkinbausteine sollte durch eine schrittweise Zugabe des verdünnten Alkins über ca. drei Stunden sowie durch niedrigere Reaktionstemperaturen (rt und 50 °C, 60 °C) minimiert werden. Lediglich bei einer Temperatur von 80 °C konnte ein geringfügiger Umsatz detektiert werden. Alle Reaktionsbedingungen wurden ebenfalls als standardmäßige Eintopf-Reaktion durchgeführt. Unter dieser Bedingung konnte keine Produktbildung beobachtet werden.

Tabelle 10: Durchmusterte Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **7a-l**, **8a-d**, **9a, b** und **10**. Es wurden 10 mol% Pd-Katalysator und 5 mol% CuI für sämtliche Reaktionen genutzt.

Nr.	Bedingungen	Base	Katalysator	Produktbildung
1	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	Et ₃ N	Pd(PPh ₃) ₄	-
2	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPA	Pd(PPh ₃) ₄	-
3	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPEA	Pd(PPh ₃) ₄	-
4	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	Et ₃ N	Pd(dppf)Cl ₂	-
5	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPA	Pd(dppf)Cl ₂	-
6	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPEA	Pd(dppf)Cl ₂	-
7	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	Et ₃ N	Pd(OAc) ₂	-
8	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPA	Pd(OAc) ₂	-
9	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPEA	Pd(OAc) ₂	-
10	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	Et ₃ N	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	✓
11	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPA	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	✓
12	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPEA	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	✓
13	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	Et ₃ N	Pd(CH ₃ CN) ₂ Cl ₂	-
14	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPA	Pd(CH ₃ CN) ₂ Cl ₂	-
15	CuI, Alkin, ACN, 16 h, 80 °C	DIPEA	Pd(CH ₃ CN) ₂ Cl ₂	-

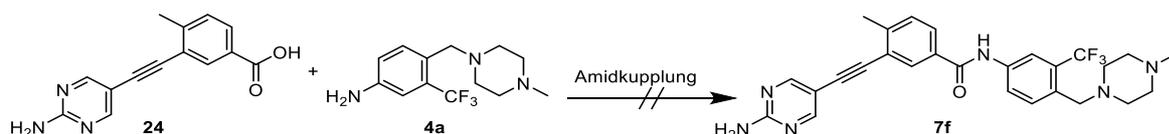
Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid zeigte für das Testsystem mit 3-Ethynylpyridin (**23d**) Produktformation, für 5-Ethynyl-pyrimidin-2-amine (**23f**) konnten nur Spuren nachgewiesen werden. Deshalb wurden die Reaktionsbedingungen 10, 11 und 12 ebenfalls mit aufwendig gereinigtem Alkin **23d** und **23f** durchgeführt. Auch hier konnte keine Verbesserung des Umsatzes für die beiden Beispielalkine detektiert werden.

Die Wahl der Base schien auch in diesen Testreaktionen für die Produktbildung nicht ausschlaggebend zu sein. Die Wahl des Katalysators hingegen schien für die Produktbildung von Bedeutung zu sein. In Tabelle 10 sind die verwendeten Katalysatoren absteigend nach ihrer Reaktivität geordnet. Bis(triphenylphosphin)palladium(II) dichlorid erwies sich hier als Katalysator mit dem bevorzugten Reaktivitätsprofil, da bei reaktiveren Katalysatoren die Produktformation ausblieb, die Edukte aber vollständig konsumiert wurden, während bei weniger reaktiven Katalysatoren die Produktformation ebenfalls ausblieb, die Intermediate **5a-f** aber nachweisbar waren. Nach einem mehrstufigen Aufreinigungsprozess konnte das Produkt per LCMS nachgewiesen werden. Die Ausbeute war allerdings nicht ausreichend um eine instrumental-analytische Charakterisierung durchzuführen. Reaktionsbedingung 11 sollte deshalb weiter optimiert werden. Unter anderem wurde auf Kupfer als Ko-Katalysator verzichtet und eine sogenannte kupferfreie Sonogashira-Reaktion mit 20, 30 und 50 mol% Pd-Katalysator durchgeführt.²¹⁷⁻²¹⁸ Dies führte allerdings nicht zu einer Produktbildung. Durch die Zugabe von 2 eq des Arduengo-Carbens zum verwendeten Pd-Katalysator sollte *in situ* ein stabilerer und reaktiverer NHC-Palladiumkomplex²¹⁹ generiert und getestet werden. Auch mit diesem Pd-Komplex konnten die Edukte nicht zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden. Der Einsatz von zuvor durch Rekristallisation (zur Entfernung möglicher Zersetzungsprodukte) aufgereinigtem CuI verbesserte das Ergebnis der Reaktion nicht. Die Synthese von frischem Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid führte ebenfalls nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Ausbeuten. Auch die Variation des Lösungsmittels (Tetrahydrofuran (THF), Ethylacetat (EtAc)), sowie die Verwendung der Basen DIPA, DIPEA oder Et₃N als Lösemittel erbrachte keine Ausbeutenverbesserung.

Neben der vorgestellten Syntheseroute wurde ein alternativer Synthese-Ansatz verfolgt. Dabei sollten die in Schema 8 dargestellten Fragmente **24** durch eine Amidkupplung zur gewünschten Verbindung führen. Die Synthese der Verbindung **24** gelang nur nach Schützung der Carboxylfunktion der Carbonsäure **11i** als Methylester²²⁰ und anschließender Sonogashira-Reaktion mit **21f**. Die Reinigung gestaltete sich auch hier schwierig.

24 konnte nach einem mehrstufigen Reinigungsprozess in ausreichenden Mengen für die Testreaktionen erhalten werden. Nach Entschützung der Carbonsäure wurden Reaktionsbedingungen für die Amidkupplung zwischen **24** und **4a** getestet (Tabelle 7). Keine der Bedingungen (Tabelle 7; Bedingungen 1-4; Bedingung 1 entsprechend durchgeführt mit 3-((2-Aminopyrimidin-5-yl)ethynyl)-4-methylbenzoesäure-chlorid) führte zum gewünschten Produkt, lediglich die Edukte konnten nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Reaktivität durch die Kupplung zum Scharnierregion-bindenden Element soweit herabgesetzt, dass eine Amidkupplung nicht mehr realisierbar ist. Die Kupplung zweier Moleküle der Verbindung **24** konnte nicht beobachtet werden und wurde aufgrund der geringen Reaktivität des anilinschen Amins auch nicht erwartet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Fokus weiter auf die Optimierung der Sonogashira-Reaktion als finale Reaktion zum Erhalt der gewünschten Produkte gelegt.

Schema 8: Reaktionsschema zur Darstellung der gewünschten Zielsubstanz **7f** aus der Reaktion der Bausteine **4a** und **24**.



Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Sonogashira-Reaktion ist der Transmetallierungsschritt, an welchem sowohl der Kupfer- als auch der Palladium-Zyklus beteiligt sind. Dieser Schritt bringt das Alkin mit dem entsprechenden Aryliodid in der zweiten Sonogashira-Reaktion zusammen (Schema 1).²¹⁶ Da nicht eindeutig festgestellt werden kann, welcher Zyklus für die hier vorgestellten Reaktionen nicht vorteilhaft verläuft, sollten die Reaktionsbedingungen so durchgeführt werden, dass sie den Transmetallierungsschritt begünstigen. Zhou *et al.*²²¹ nutzten Silyl-geschützte Alkine als Edukte der Sonogashira-Reaktion, die *in situ* mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entschützt werden. Diese Strategie wurde mit den besten Reaktionsbedingungen (Tabelle 10, Bedingung 11) kombiniert und abgewandelt. Die oxidative Addition der Aryliodide **5a-f** sollte durch Erhitzen der Probe auf 80 °C für eine halbe Stunde eingeleitet werden, um die Umsetzung mit den *in situ* entschützten Alkinen zu fördern und der Polymerisation dieser entgegenzuwirken. Die Reaktionsmischung wurde auf 40 °C heruntergekühlt und anschließend unter schrittweiser Zugabe von TBAF wieder auf 80 °C erhitzt, hinzugegeben, um die Silylschutzgruppe abzuspalten.

Diese Reaktionsführung führte zu den gewünschten Produkten (Tabelle 3) und konnte für die Synthese im Parallelreaktor genutzt werden (Schema 1). Auch hier konnte weiterhin die Bildung eines viskosen, schwarzen Niederschlags beobachtet werden. Ein weiteres Indiz für ein sehr komplexes Zusammenspiel der beiden Edukte bei der zweiten Sonogashira-Reaktion wurde durch die Analyse der Ausbeuten erhalten. Die Ausbeuten nahmen sowohl mit zunehmender Dekoration der Scharnierregion-bindenden Ringsysteme als auch mit zunehmender Elektronegativität des Restes R^3 in den Vorläuferverbindungen **5a-f** ab (siehe experimenteller Teil Kapitel 6.2). Die Vorläuferverbindungen **5d** und **5f** zeigten in der zweiten Sonogashira-Reaktion keine Umsetzung. Vermutlich spielen die sterischen und elektronischen Gegebenheiten der Edukte **5d** und **5f** bei der Kupplungsreaktion eine Rolle.²²²⁻²²³

Nach entsprechender Reinigung konnten die gewünschten Produkte in moderaten Ausbeuten von 1-65 % erlangt werden. Die Aufreinigung der Produkte erwies sich auch hier als äußerst schwierig. Neben den diversen nicht UV-aktiven und nicht ionisierbaren Verunreinigungen mussten die schwer abzutrennenden Reaktanden Triphenylphosphanoxid und TBAF entfernt werden, die eine sehr ähnliche Retentionszeit wie die Produkte aufwiesen. Die Bildung von Triphenylphosphanoxid sollte durch die Verwendung des möglichst wasserfreien Lösungsmittels ACN und der getrockneten Base DIPA auf ein Minimum beschränkt werden. Die moderaten Ausbeuten sind auch das Produkt des aufwendigen Reinigungsverfahrens. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite[®] filtriert und mit MeOH und Et₃N nachgewaschen. Um einen Großteil der unpolaren Verunreinigungen zu entfernen und ein Verstopfen der C₁₈-Säulen der Hochleistungsflüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)) vorzubeugen, wurde zunächst eine C₄-Säulenchromatographische Aufreinigung durchgeführt.

Im Anschluss wurden bis zu zwei präparative HPLC Durchläufe durchgeführt, um TBAF und Triphenylphosphanoxid zu entfernen. Die reinsten Fraktionen wurden kombiniert und noch bis zu zwei präparativen Dünnschichtchromatographien unterworfen, um eine Reinheit >95 % der Produkte zu erreichen. Auf diese Weise konnten die in 3.3 vorgestellten Verbindungen mit der hier vorgestellten Syntheseroute synthetisiert werden. Die erhaltenen Produkte **7a-l**, **8a-d**, **9a, b** und **10** (Tabelle 3) standen anschließend für die Charakterisierung (siehe experimenteller Teil 6.2) und biochemische sowie zelluläre Evaluierung zur Verfügung.

3.3.4 Biochemische Charakterisierung der KIT-Inhibitoren

3.3.4.1 Theoretischer Hintergrund

Die in Kapitel 3.3.1 vorgestellten Verbindungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen Cisbio KinEASE™ HTRF-Assay (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) auf ihre inhibitorische Aktivität hin untersucht.²²⁴⁻²²⁵ Die Basis dieses Testsystems ist die Detektion des durch die Zielkinase katalysierten γ -Phosphattransfers auf ein artifizielles biotinyliertes Tyr- bzw. Ser/Thr-enhaltendes Substratpeptid mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Die Zielkinase wird über einen bestimmten Zeitraum mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Inhibitoren inkubiert, bevor die Katalysereaktion durch das Hinzufügen einer für die Kinase optimierten Menge an ATP und Substrat initiiert wird (siehe experimenteller Teil 6.3).

Nach Ablauf der für die Kinase ermittelten Reaktionszeit im zuvor durchgeführten Assayoptimierungsprozess (siehe experimenteller Teil Kapitel 6.3), wird die Reaktion durch Zugabe der sogenannten Stopp-Lösung beendet. Die Stopp-Lösung enthält unter anderem:

- EDTA, welches durch Komplexierung der Mg^{2+} -Ionen die Katalysereaktion beendet.
- Den FRET-Akzeptor in Form des Streptavidin-gebundenen XL665-Fluorophors.
- Den FRET-Donor in Form des terminal an einen pTyr- bzw. pSer/pThr-spezifischen Antikörper gebundenen Eu^{3+} -Kryptats.

Die relative Menge des durch Zielkinase auf das Peptidsubstrat transferierten γ -Phosphats wird durch die Bindung des Fluorophors XL665 an den Biotinlinker des Substratpeptids und des FRET-Partners Eu^{3+} -Kryptat an das phosphorylierte Substratpeptid detektiert (Abbildung 20). Bei einer Exzitationswellenlänge von 317 nm kann der Energietransfer zwischen den beiden FRET-Partnern induziert werden, sodass die relative Kinaseaktivität bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen durch die Messung der zeitaufgelösten Emission bei den Wellenlängen 665 nm bzw. 620 nm ermittelt werden kann. Durch die Auftragung des Verhältnisses $Em_{665\text{ nm}}/Em_{620\text{ nm}}$ gegen die logarithmische Auftragung der verschiedenen Inhibitorkonzentrationen können die IC_{50} -Werte der untersuchten Inhibitoren bestimmt werden.

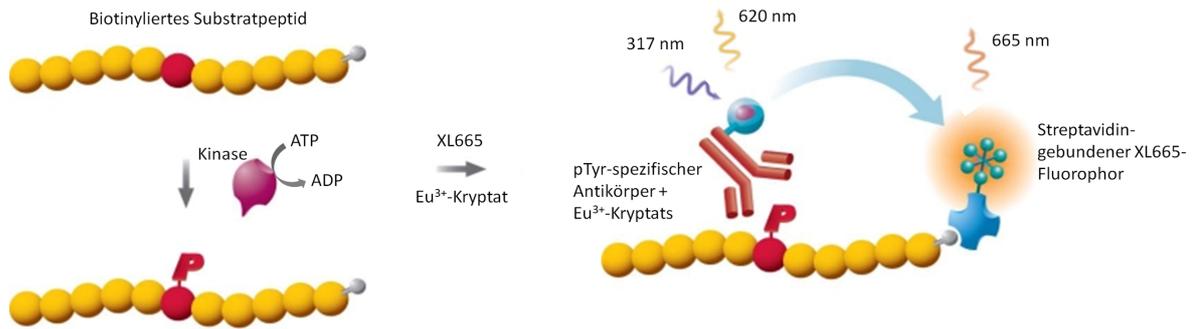


Abbildung 20: Prinzip des HTRF-Assaysystems KinEASE™ von Cisbio zur IC₅₀-Ermittlung. Adaptiert von <https://www.cisbio.com/drug-discovery/htrfr-kineasetm> (26.12.2017).²²⁵

3.3.4.2 KIT-Varianten - Biochemische Evaluierung

Die fokussierte Substanzbibliothek wurde in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den klinisch relevanten KIT Varianten KIT^{wt} , KIT^{D816H} , $KIT^{V559D/V654A}$ und $KIT^{V559D/T670I}$ in dem oben genannten aktivitätsbasiertem biochemischen Assay charakterisiert (Tabelle 11). Als Referenzinhibitoren wurden die für GIST zugelassenen Inhibitoren Imatinib, Sunitinib und Regorafenib, sowie Ponatinib getestet. Zusätzlich zu den Zielsubstanzen **7a-l**, **8a-d**, **9a, b** und **10** (Tabelle 3) wurden die Intermediate **5a**, **5d**, **5f** und **5g** und der Alkin-substituierte Vorläufer **6a** auf ihre Aktivität gegenüber den Varianten untersucht. Die Intermediate **5a**, **5d**, **5f** und **5g** wiesen jeweils IC_{50} -Werte von 6.8, 555, 1039, und 184 nM gegenüber KIT^{wt} auf. Die ursprüngliche Vorläuferverbindung von Ponatinib (**5a**) zeigte dabei die höchste inhibitorische Aktivität gegenüber dem wt ($IC_{50} = 6.8$ nM) während der Alkin-funktionalisierte Vorläufer **6a** eine verringerte Potenz aufwies ($IC_{50} = 230$ nM). Entsprechend der Modellierungsstudien sollten 2- und 3-Pyridyl-substituierte Scharnierregion-bindende Strukturelemente eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Scharnierregion eingehen können, da die Positionierung des Protonen-Akzeptors (Ringstickstoff) im jeweiligen Pyridin der des Imidazolo-pyridazin Strukturelements Ponatinibs ähnelt. Der Vergleich von Verbindung **7a** und **7d** zeigt, dass das 3-Pyridyl-substituierte Scharnierregion-bindende Strukturelement von **7d** deutlich potenter in allen KIT-Mutanten ist. Für den KIT^{wt} sind die IC_{50} -Werte für beide Verbindungen **7a** und **7d** im nanomolaren Bereich (3.5 und 2.1 nM), wohingegen für die KIT-Mutanten ein dramatischer Unterschied zwischen **7a** und **7d** deutlich wird ($KIT^{V559D/T670I}$ **7a/7d** = 116/24 nM, $KIT^{V559D/V654A}$ **7a/7d** = keine Inhibition/1101 nM, KIT^{D816H} **7a/7d** = keine Inhibition/138 nM). Die Dekoration des 2-Pyridyl-Strukturmotivs mit elektronenreichen Substituenten in 5- (**7b**) und 3-Position (**7c**) sollte potentiell neue Wechselwirkungen generieren. Da sich die 2-Pyridyl-Gruppe als das weniger potente Pyridin-basierte Strukturmotiv bezüglich der KIT-Varianten herausgestellt hatte, wurde eine signifikante Verbesserung der Potenz für den Fall von zusätzlichen favorisierten Interaktionen der Substituenten postuliert. **7b** wies gegenüber allen KIT-Mutanten eine verringerte Potenz auf, besonders gegenüber $KIT^{V559D/T670I}$, im Vergleich zum nicht-substituierten 2-Pyridyl **7a** (keine Inhibition vs. 116 nM). Die in der 3-Position mit einer Methoxygruppe substituierte Verbindung **7c** behielt insgesamt ein vergleichbares Potenzprofil im Vergleich zu **7a** bei.

Tabelle 11: IC₅₀-Bestimmung der synthetisierten Derivate **5a**, **d**, **f**, **g**, **6a**, **7a-l**, **8a-d**, **9a**, **b** und **10** auf den Zielkinasen KIT^{WT}, KIT^{V559D/T670I}, KIT^{V559D/V654A}, KIT^{D816H} und VEGFR2.^aNicht-inhibierend bei einer InhibitorKonzentration von 20 μM.*

Verbindung	IC ₅₀ [nM]				
	KIT ^{WT}	KIT ^{V559D/T670I}	KIT ^{V559D/V654A}	KIT ^{D816H}	VEGFR2
5a	6.8 ± 21	a	a	a	865 ± 65.4
5d	183.7 ± 186.5	a	a	a	a
5f	1039.3 ± 513.9	a	a	a	559 ± 9.5
5g	555.7 ± 41.6	a	a	a	1237 ± 135.6
6a	230.7 ± 1.2	a	a	a	a
7a	3.5 ± 0.6	116 ± 20.1	a	a	19.7 ± 1.5
7b	120.9 ± 154.7	a	a	a	49.1 ± 6.9
7c	6.7 ± 1.9	158.7 ± 43	a	a	13.8 ± 0.1
7d	2.1 ± 0.6	24 ± 3.1	1101.6 ± 47.8	137.6 ± 2.3	2.5 ± 0.3
7e	5.8 ± 0.2	150.2 ± 35.3	a	2267.8 ± 105.3	16.7 ± 1
7f	1.9 ± 0.6	21.4 ± 1.2	246.6 ± 71.2	42.2 ± 13.0	1.7 ± 0.3
7g	3.3 ± 0.9	106.8 ± 7.2	2614.3 ± 745.4	252.5 ± 13.2	5.7 ± 0.7
7h	1.6 ± 0.9	72.0 ± 5.2	a	a	13 ± 1.2
7i	2.1 ± 0.5	29.8 ± 1.4	777.2 ± 88.6	99.3 ± 43.3	3.6 ± 0.6
7j	2.5 ± 0.9	2147.2 ± 213.1	a	a	97.8 ± 29.6
7k	2.0 ± 0.6	28.8 ± 1.3	908.3 ± 165.0	140 ± 13.4	4.4 ± 0.9
7l	4 ± 0	18.2 ± 6.8	313.5 ± 132.2	104.3 ± 8.7	11.7 ± 1.5
8a**	239.6 ± 307.6	a	a	a	a
8b**	3.3 ± 1.8	a	a	a	78.0 ± 20.8
8c**	100.3 ± 84.2	a	a	a	a
8d**	2.6 ± 1.0	a	a	a	22.2 ± 1.9
9a**	2.3 ± 0.5	a	a	a	10.5 ± 1.3
9b**	6.5 ± 1.1	a	a	1706.6 ± 803.4	15.5 ± 2.3
10	6.2 ± 2.3	21 ± 3.6	1084.7 ± 304.0	325.8 ± 111.1	1.2 ± 0.1
Imatinib	16.4 ± 3.1	a	a	a	a
Ponatinib	1.7 ± 0.7	17.4 ± 9.8	136.0 ± 39.9	20 ± 2.2	4.3 ± 0.1
Sunitinib	1.1 ± 0.8	99.6 ± 27.8	124.9 ± 24.6	616.8 ± 14.9	53.5 ± 0.9
Regorafenib	6.1 ± 1.5	2153.3 ± 744.4	a	239.1 ± 168.9	2.9 ± 0.8

* Die ermittelten IC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die IC₅₀-Werte wurden mit Unterstützung von M. Sc. Marina Keul bestimmt.** Die Verbindungen **8a-d** und **9a**, **b** sind im Rahmen der Masterarbeit von Jasmin Krüll¹⁹⁰ synthetisiert worden.

Da die Erweiterung des heterozyklischen Sechsringsystems nicht die erwünschte Erhöhung der inhibitorischen Aktivität zur Folge hatte wurde eine andere Designstrategie evaluiert. Die durchgeführten Docking-Studien wiesen darauf hin, dass die Platzierung einer Aminogruppe in *para*-Position zum Alkin-Linker zur Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung mit der Scharnierregion führen sollte (Abbildung 21A). Für die Überprüfung dieser Hypothese und auch, um simultan die heterozyklische Diversität zu evaluieren, wurden jeweils 2-Aminopyrimidin- und 3-Aminopyridazin-enthaltende Derivate (**7e** und **7f**) synthetisiert. Diese Derivate wurden gewählt, um zum einen zu determinieren, ob die Addition eines Aminsubstituenten in *para*-Position zum Alkin-Linker eine Erhöhung der inhibitorischen Potenz bewirkt, und zum anderen, ob ein Stickstoffatom in *ortho*-Position zum Alkin-Linker eine Verringerung der inhibitorischen Potenz zur Folge hat, obwohl das Stickstoffatom in *meta*-Position präsent ist. Wie Tabelle 11 zu entnehmen ist, zeigte die Pyrimidin-basierte Substanz **7f** sowohl in allen untersuchten KIT-Mutanten, als auch im wt eine signifikante Verbesserung der inhibitorischen Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich (2–247 nM). Das 3-Aminopyridazin-Analogon **7e** zeigte ebenfalls eine Inhibition von KIT^{wt} in einem ähnlichen Bereich mit einem IC₅₀-Wert von 5.8 nM. Allerdings verlor **7e** gegenüber allen untersuchten KIT-Mutanten an inhibitorischer Potenz. Aus den aufgeführten Beobachtungen lässt sich für die untersuchten KIT-Mutanten eine SAR ableiten, aus der ein signifikanter Einfluss des Substitutionsmusters des Scharnierregion-bindenden Elements auf den inhibitorischen Effekt dieser Serie Ponatinib-basierter Verbindungen hervorgeht. Zusammengefasst führte die Verkleinerung des Scharnierregion-bindenden Elements in Kombination mit der Addition eines Amin-Substituenten, welcher gemäß den Ergebnissen der *in silico*-Studien eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zur Scharnierregion von KIT ausbilden kann, zur Entwicklung des Inhibitors **7f** mit einer vergleichbaren Potenz zu Ponatinib bezüglich der getesteten KIT-Varianten. Basierend auf **7f** wurden zur Erweiterung der SAR-Studien einige strukturelle Analoga ausgewählt und synthetisiert. Die Addition einer 2-Methoxyethyl-Seitenkette an die Aminfunktionalität des Amino-pyrimidins (**7g**) resultierte in dem Verlust von inhibitorischer Aktivität gegen alle KIT-Mutanten, insbesondere für KIT^{V559D/V654A} im Vergleich zu **7f**. 2-Aminopyridin-5-yl- (**7k**) und 2-Amino-3-methylpyridin-5-yl-Derivat (**7i**) zeigten als Scharnierregion-Bindungsmotive eine signifikant reduzierte Aktivität für die Mutanten KIT^{V559D/T670I} und KIT^{D816H}. Das gleiche Verhalten bezüglich der inhibitorischen Potenz konnte für Verbindung **7l** beobachtet werden.

Die Substitution eines Stickstoffs im Pyrimidingerüst von **7f** durch eine Methylengruppe (**7k**) sowie die Erweiterung dieser mit einer Methylgruppe (**7i**), wie auch die Einführung eines benzylichen Ringsystems auf dieser Seite des Sechsringsystems (**7l**), scheinen nicht zu den favorisierten Interaktionen zu führen. Der Vergleich der Verbindung **7f** mit der strukturell sehr ähnlichen Verbindung **7k** zeigt, dass das Pyrimidin- gegenüber dem Pyridin-Grundgerüst bevorzugt wird. Möglicherweise bildet der zusätzliche Ringstickstoff des Pyrimidins weitere favorisierte Interaktionen zu KIT aus. Denkbar ist auch, dass aufgrund der C2-Symmetrie des 2-Aminopyrimidin-Molekülgerüsts eine Rotation für die Ausrichtung des Scharnierregion-bindenden Motivs zur Ausbildung der Wasserstoffbrücke zur Scharnierregion energetisch begünstigt wird. Der daraus möglicherweise resultierende Energiegewinn könnte zu einer schnelleren Bindungsbildung führen. Ein weiteres Strukturmotiv, in dem sich das Molekülgerüst des Ponatinib vom Imatinib unterscheidet, ist, neben dem Scharnierregion-bindenden Element, der mit der *back pocket* interagierende Trifluoromethylsubstituent (Abbildung 21B). Dieser strukturelle Unterschied sollte ebenfalls in der SAR-Studie berücksichtigt und untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die potentesten Scharnierregion-bindenden Heterozyklen der Verbindungen **7a-l** für die Synthese der Trifluoromethyl-freien Analoga **8a-d** genutzt.

Die Verbindungen **8a-d** zeigen keinerlei Inhibition der untersuchten KIT-Mutanten. Für die Verbindungen **9a, b** wurde ein Fluorsubstituent anstelle der Trifluoromethylgruppe eingeführt. Allerdings zeigte sich auch hier ein Verlust der inhibitorischen Potenz in allen untersuchten KIT-Mutanten, wie zuvor für die Verbindungen **8a-d**. Die Beobachtungen bezüglich der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen **8a-d** und **9a, b** kennzeichnen den Trifluoromethylsubstituenten deutlich als entscheidenden Faktor für die Potenz dieser Inhibitorserie. Der Austausch des Trifluoromethylsubstituenten mit einem Wasserstoff- bzw. Fluor-Atom induziert einen signifikanten Verlust der inhibitorischen Potenz gegenüber allen untersuchten KIT-Mutanten. Gemäß der Docking-Studien scheint die Trifluoromethylgruppe eine hydrophobe Subtasche der *back pocket* zu adressieren (Abbildung 21B).^{188, 226} Diese Subtasche ist in vielen Kinasen aufgrund ihrer Rolle in der Ausbildung des regulatorischen Rückgrats konserviert.¹⁸⁹ Deswegen führt die Adressierung dieser Tasche oft zu einer erhöhten Potenz von Inhibitoren, die dieses strukturelle Merkmal adressieren, gleichzeitig jedoch zu einer verringerten Selektivität innerhalb der Familie der Proteinkinasen, was potentielle Nebenwirkungen begünstigt.²²⁶⁻²²⁸

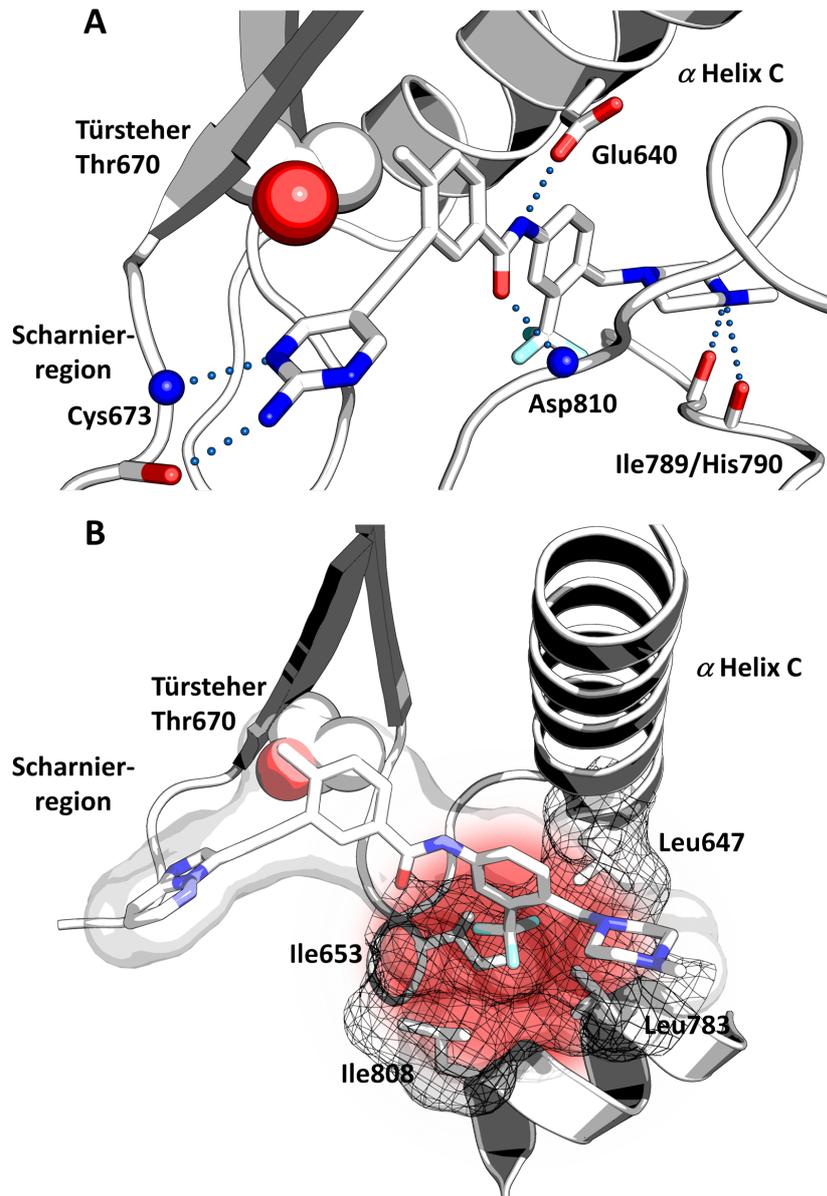


Abbildung 21: A) Docking-Pose von **7f** in KIT^{wt}. Die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Kinase sind als blaue Punkte dargestellt. B) Detaillierte Darstellung der *back pocket*. Die hydrophobe *back pocket*-Subtasche in KIT, aufgespannt durch Ile 653, Ile 808, Leu 647 und Leu783, ist durch die Darstellung der Seitenketten als *sticks* mit den dazugehörigen Elektronengitternetzlinien und Oberflächen hervorgehoben.

Die Repositionierung der Methylgruppe des Phenylcarboxamid-Elements (C-Ring) in **7f** von der ursprünglichen 4-Position am Phenyl auf die 2-Position (**10**), um die Sekundärmutation KIT^{V559D/V654A} potentiell selektiv zu adressieren und gleichzeitig ein besseres Selektivitätsprofil gegenüber anderen Kinasen mit konserviertem Valin zu evaluieren, führte zu einer signifikanten Reduzierung der Inhibitoraktivität auf die KIT^{V559D/T670L}- und KIT^{V559D/V654A}-Mutanten. Ein vergleichendes Selektivitätsprofil der beiden Inhibitoren **7f** und **10** in Bezug auf andere Proteinkinasen wurde mit Hilfe des SelectScreen Kinase Profiling Services von Life Technologies erstellt und wird in Kapitel 3.3.7 im Detail diskutiert.

3.3.4.3 VEGFR2 - Biochemische Evaluierung

Die fokussierte Substanzbibliothek (Tabelle 3) wurde ebenfalls in Bezug auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber VEGFR2 im aktivitätsbasierten HTRF-Assay charakterisiert (Tabelle 11). Es wird vermutet, dass die Inhibition von VEGFR2 und weiteren Kinasen der VEGF-Familie für die Thrombenbildung in mit Ponatinib behandelten Patienten mitverantwortlich sein könnte. Einen Schwerpunkt dieser Evaluierung stellte deshalb die Bestimmung der Aktivität und Selektivität der für KIT entwickelten Verbindungen gegenüber VEGFR2 dar. Die potentielle Verbesserung der Selektivität der Inhibitoren gegenüber VEGFR2 und die korrespondierenden SARs basierend auf den eingeführten strukturellen Änderungen des Inhibitorgerüsts sollten durch die biochemische Charakterisierung herausgearbeitet werden. Die Selektivität wurde durch Division der IC_{50} -Werte von VEGFR2 und KIT^{wt} bestimmt.

Aufgrund der hohen Homologie der Bindetaschen von KIT und VEGFR2, die nach erfolgter Türstehermutation (T670I) in KIT noch mehr Ähnlichkeit aufweisen, stellt die selektive Adressierung von KIT mit geeigneten Inhibitoren eine große Herausforderung dar (siehe Kapitel 3.3.2). Die Ponatinib-basierten Moleküle **7a-l** zeigen keine signifikante Selektivität gegenüber VEGFR2. Diese Derivate weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu der Parentalverbindung Ponatinib auf, was ein analoges Selektivitätsprofil gegenüber VEGFR2 erklären könnte. Die IC_{50} -Werte befanden sich für VEGFR2 im ähnlichen nanomolaren Bereich wie für KIT^{wt} (1-ca. 100 nM/ Selektivität $\frac{VEGFR2}{KIT^{wt}} = 0.5-3$ mit Ausnahme von **7i** = 39 vgl. Ponatinib $\frac{VEGFR2}{KIT^{wt}} = 2.6$). Verbindungen **8b**, **8d** und **7i** zeigten eine geringe Selektivität gegenüber VEGFR2 im Vergleich zu Ponatinib ($\frac{VEGFR2}{KIT^{wt}} = 23$ (**8b**), 11 (**8d**) und 39 (**7i**) vgl. 2.6 (Ponatinib)), allerdings auch keinerlei Inhibition der klinisch relevanten KIT-Mutanten. Die bestimmten IC_{50} -Werte von **8a** und **8c** (KIT^{wt} : 240 bzw. 100 nM vs. VEGFR2: keine Inhibition) weisen darauf hin, dass VEGFR2 einen Ringstickstoffatom in *ortho*-Position zum Alkin-linker (2-Pyridinyl-Derivate) im Vergleich zu KIT^{wt} nicht toleriert, wenn gleichzeitig der CF_3 -Substituent in der 3Position im E-Ring zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen in der *back pocket* fehlt. Der Aktivitätseinbruch dieser Verbindungen für VEGFR2 zeigt sich aber auch in den KIT-Mutanten. Zusammenfassend lässt sich mit einem Imatinib-ähnlichen *back pocket*-bindenden Element in Kombination mit schwachen Scharnierregion-bindenden Motiven Selektivität zwischen VEGFR2 und KIT^{wt} erzeugen.

Die relevanten, krebserzeugenden KIT-Mutanten lassen sich mit diesen Substanzen aber ebenfalls nicht adressieren. Die Verbindungen **9a, b** beinhalten das Scharnierregion-bindende-Motiv von **8b, d**, weisen aber einen Fluorsubstituent im *back pocket*-bindenden Teil der Molekülstruktur auf. **9a, b** zeigen kaum Selektivität für KIT^{wt} gegenüber VEGFR2 (2.3 und 6.5 nM (KIT) vs. 10.5 und 15.5 nM (VEGFR2)) und sind weiterhin bei einer maximalen Inhibitorkonzentration von 20 μ M nicht aktiv auf den hier untersuchten KIT-Mutanten. Die Methylgruppe in 2-Position am Phenylcarboxamid-Element (E-Ring) in **10**, welche eine potentiell selektive Adressierung von KIT^{V559D/V654A} gegenüber VEGFR2 und den anderen KIT-Varianten erreichen sollte, zeigte keinen Einfluss auf VEGFR2. Substanz **10** inhibiert VEGFR2 wie auch **7f** im nanomolaren Bereich (**7f**: 1.7 nM; **10**: 1.2 nM).

Vergleicht man die Intermediate **5a, 5d, 5f** und **5g**, denen das Scharnierregion-bindende Strukturmotiv fehlt, lässt sich für **5a** und **5d** eine Selektivität zu KIT^{wt} beobachten, wobei diese für **5a** in Gegenwart eines Scharnierregion-bindenden Strukturmotivs verloren geht. **5f** wurde speziell zur Adressierung von KIT^{V559D/V654A} synthetisiert und sollte basierend auf den vorherigen Modellierungsstudien weniger favorisierte Interaktionen mit VEGFR2 eingehen (Abbildung 19). Der Vergleich der IC₅₀-Werte weist auf ein gegenteiliges Verhalten hin: VEGFR2 wird mit 559 nM besser inhibiert als KIT^{wt} mit ca. 1 μ M. Von großem Interesse wäre die Untersuchung dieser Verbindung mit dem Scharnierregion-bindenden Strukturelement von **7f**, um zu ermitteln, ob diese Beobachtung erhalten bleibt und zusätzlich die KIT-Mutanten inhibiert werden. **5d** inhibiert KIT^{wt} bei ca. 190 nM, während auf VEGFR2 keine inhibitorische Aktivität gemessen werden kann. Die Aminosäuren, die mit dem in 2-Position des C-Rings befindlichen Fluorsubstituent wechselwirken, sind in beiden Kinasen identisch. Unter der Annahme, dass die Intermediate **5a, 5d, 5f** und **5g** ähnlich wie die Parentalverbindung Ponatinib mit der Bindetasche interagieren, lässt sich kein Rückschluss auf die hier ermittelten IC₅₀-Werte sowie die beobachtete Selektivität zu der jeweiligen Kinase ziehen. Das Fehlen des Scharnierregion-bindenden Elements und damit die kleinere Molekülgröße könnte in einem gänzlich anderen Bindungsmodus für die Intermediate **5a, 5d, 5f** und **5g** resultieren. Um eine fundierte Aussage über die hier beobachteten Selektivitäten der Intermediate zu treffen, müsste der Bindungsmodus evaluiert werden. Insgesamt konnte mit den in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen noch keine Selektivität zu den KIT-Mutanten gegenüber VEGFR2 erzeugt werden.

Dennoch zeigen die Intermediate **5d** und **5f** Potential für eine Weiterentwicklung zur möglicherweise selektiven Adressierung von KIT oder könnten zumindest Anhaltspunkte für diese geben, sobald der Bindungsmodus in beiden Kinasen ermittelt oder weitere Derivate zur Ableitung der SAR entwickelt worden sind. Sämtliche synthetisierten Verbindungen wurden weiterhin auf ihre zelluläre Aktivität in humanen, metastasierenden GIST-Zelllinien, welche die entsprechenden Mutationen tragen, untersucht (Kapitel 3.3.5).

3.3.5 Aktivität der Inhibitoren in GIST-Zellkulturen^{III}

3.3.5.1 Etablierung zellulärer Testsysteme zur Charakterisierung von TKIs für KIT

Für die Bestimmung der GI_{50} -Werte der in dieser Arbeit synthetisierten Moleküle für die Determinierung ihrer zellulären Aktivität auf humanen, KIT-abhängigen GIST-Zelllinien (Kapitel 3.3.5.2 und 4.2.3), musste zunächst ein zelluläres Testsystem etabliert werden. Die Generierung der GI_{50} -Werte erfolgte über den von Promega²²⁹ vertriebenen CellTiter-Glo[®] Zellviabilitätsassay.

3.3.5.1.1 Vorstellung der verwendeten Zelllinien

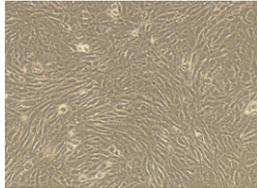
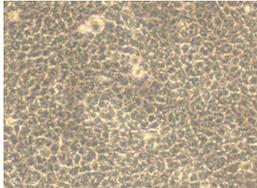
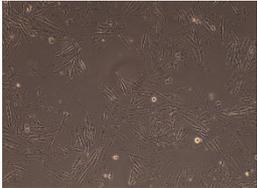
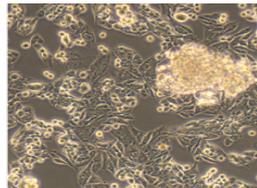
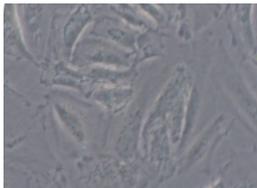
Der Zellviabilitätsassay wurde für insgesamt fünf Zelllinien optimiert, darunter vier KIT-abhängige sowie eine KIT-unabhängige GIST-Zelllinie als Negativkontrolle. Die GIST-T1 stammt aus humanen, unbehandelten, metastasierenden GIST und beinhaltet eine 57 Basenpaare (bp) Deletion in Exon 11. Diese aktivierende Primärmutation führt zur Expression von konstitutiv aktivem KIT und wurde von Takahiro Taguchi an der Kochi University in Japan etabliert. Die GIST-T1-D816E- (Aktivierungsschleifenmutation) und GIST-T1-T670I-Zelllinie (Türstehermutation) wurden durch kontinuierliche Behandlung der Parentalzelllinie GIST-T1 mit Imatinib bis zum Auftreten der resistenten Sublinien generiert. GIST-T1-D816E wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Sebastian Bauer am Universitätsklinikum in Essen, GIST-T1-T670I von Prof. Dr. Brian Rubin an der Cleveland Klinik in Cleveland, Ohio, kultiviert.

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

Die GIST430-V654A wurden aus vorbehandelten GIST-Spezies etabliert und trägt, zusätzlich zu einer aktivierenden Exon 11-Mutation, noch die V654A-Mutation. Bei der GIST-48B Zelllinie handelt es sich um eine KIT-unabhängige Zelllinie, die als negative Kontrolle diente. GIST430-V654A- und GIST-48B-Zellen wurden im Brigham and Women's Hospital in Boston, USA, in der Arbeitsgruppe von Professor Jonathan A. Fletcher kultiviert.

Alle in dieser Arbeit untersuchten KIT-Mutationen sowie ihre Zellmorphologie und die genauen genetischen Läsionen sind in Tabelle 12 beschrieben. Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Sebastian Bauer (Innere Klinik (Tumorforschung), Essen) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 12: Auflistung und Darstellung der verwendeten GIST-Zelllinien mit den jeweiligen Mutationen.

			
Zelllinie	GIST430-V654A	GIST-48B	GIST-T1
Morphologie	Spindelförmig; adhären, Monolayer mit Zellkontakthemmung	Rund-rechteckig; adhären, Monolayer mit Zellkontakthemmung	Spindelförmig; adhären, Monolayer mit Zellkontakthemmung
Mutationen	Exon 11: 57 bp del V560-Y578 und Exon 13: V654A	Exon 11 57 bp del V560-Y578 und Exon 17: D820A	Exon 11: 57 bp del V560-Y578
			
Zelllinie	GIST-T1-D816E	GIST-T1-T670I	
Morphologie	Spindelförmig; semi-adhären, Monolayer, abgelöste Zellen spärlich	Spindelförmig; adhären, Monolayer mit Zellkontakthemmung	
Mutationen	Exon 11: 57 bp del V560-Y578 und Exon 17: D816E	Exon 11: 57 bp del V560-Y578 und Exon 14: T670I	

3.3.5.1.2 Theoretischer Hintergrund

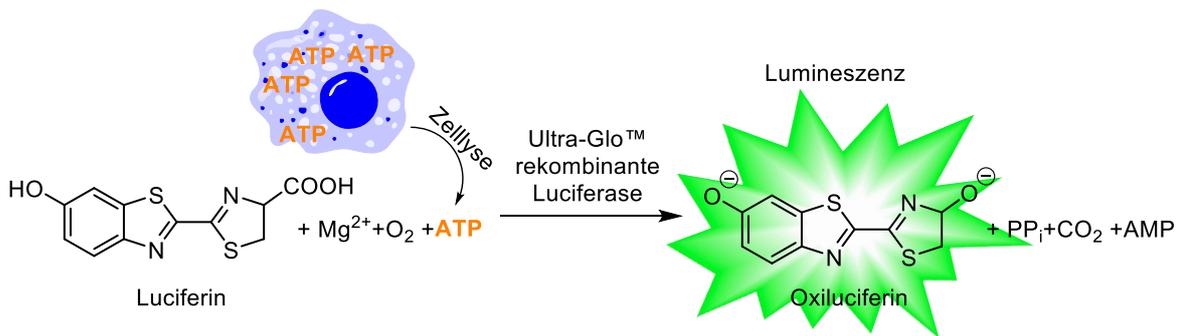


Abbildung 22: Grundprinzip des verwendeten Promega CellTiter-Glo® Lumineszenz-basierten Zellviabilitätsassays.²²⁹ Im Detail ist die Luciferase-Reaktion dargestellt.

Bei dem verwendeten Assaysystem handelt es sich um den von Promega entwickelten CellTiter-Glo® Lumineszenz-basierten Zellviabilitätsassay.²²⁹ Dieses Testsystem beruht auf der Determinierung der Anzahl an lebensfähigen Zellen, basierend auf der Quantifizierung des anwesenden ATPs nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (Abbildung 22).²²⁹ Die Konzentration an freigesetztem ATP wiederum ist direkt proportional zur Anzahl der verbleibenden vitalen Zellen in der Kultur nach Inkubation mit den zu testenden Inhibitoren. Durch Zugabe des CellTiter-Glo®-Reagenzes wird die Zellyse induziert und dadurch das zelluläre ATP freigesetzt. Die im CellTiter-Glo®-Reagenz befindliche Luciferase katalysiert mit Hilfe des freigesetzten ATPs die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin, dessen detektiertes Lumineszenzsignal somit proportional zum anwesenden ATP ist.²²⁹

Dieser Zusammenhang ermöglicht die Bestimmung der GI_{50} -Werte auf Basis der detektierten Oxyluciferin-Lumineszenz und anschließender logarithmischer Auftragung gegen die verwendeten Inhibitorkonzentrationen.

3.3.5.1.3 Zellzahloptimierung

Die Bestimmung der GI_{50} -Werte mittels CellTiter-Glo® Zellviabilitätsassays der zu untersuchenden Verbindungen bedarf der Optimierung der Zellzahl für jede einzelne Zelllinie. Der Prozess der Zellzahloptimierung gibt zum einen Aufschluss über die Wachstumseigenschaften der Zellen, zum anderen muss zur Gewährleistung eines stabilen und vergleichbaren Lumineszenzsignals der lineare Wachstumsbereich ermittelt werden.

Die Optimierung der Zellzahl erfolgt über die Titration der Zellen im gewählten Assayformat und anschließender Detektion des entsprechenden Lumineszenzsignals mittels des CellTiter-Glo[®]-Reagenzes (Abbildung 23). Auf diese Weise wird im linearen Bereich des CellTiter-Glo[®]-Reagenzes gearbeitet, sodass ein stabiles, in einem vergleichbaren Bereich liegendes Lumineszenzsignal für alle Zellen ermittelt werden kann und die mit der entsprechenden Zellzahl generierten GI₅₀-Werte verglichen werden können. Für die hier untersuchten GIST-Zelllinien wurden Zellzahlen ausgewählt, die nach 72 h Kultivierungszeit ein vergleichbares Lumineszenzsignal im linearen Bereich des Zellwachstums zeigten.

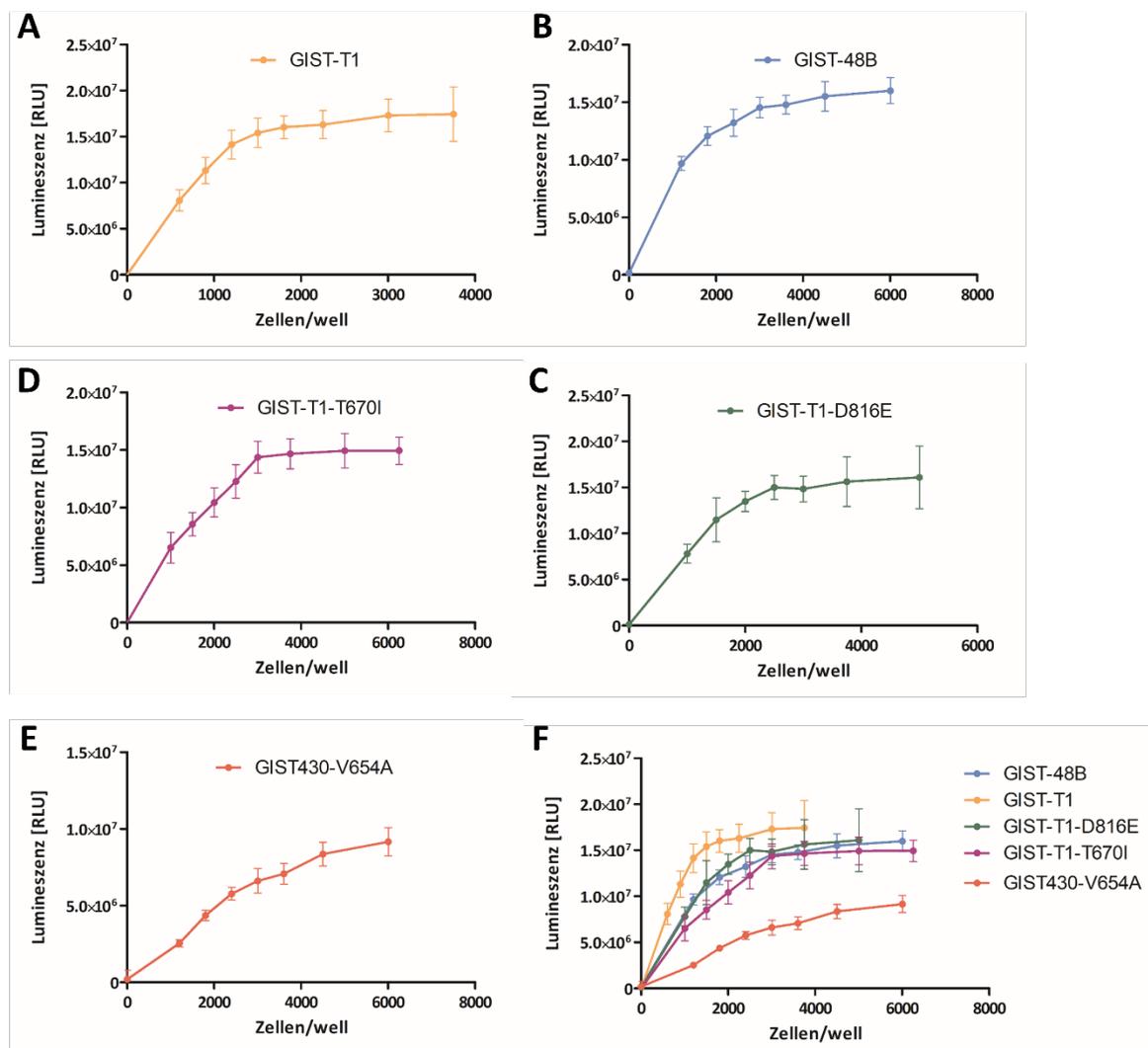


Abbildung 23: A-E) Auftragung der Lumineszenz gegen die Zellzahl pro well für die jeweilige Ziellinie. F) Vergleich der Auftragungen der Lumineszenz gegen die Zellzahl pro well zwischen allen Zelllinien. Bis auf GIST430-V654A (rot) zeigten alle Zelllinien einen linearen Wachstumsbereich und eine stationäre Phase.

Die Auswertung der Zelltitration für alle GIST-Zelllinien zeigte, bis auf Zelllinie GIST430-V654A (Abbildung 23E), einen linearen Wachstumsbereich mit einer vergleichbaren Lumineszenz. Der Vergleich der Auftragung der Lumineszenz gegen die Zellzahl pro *well* aller Zelllinien (Abbildung 23F) veranschaulicht ein erheblich langsames Wachstum der GIST430-V654A-Zelllinie. Das Erreichen einer stationären Phase ist für diese Zelllinie nicht zu beobachten. Für die verbleibenden Zelllinien konnte der entsprechende lineare Wachstumsbereich identifiziert und zur Zellzahlbestimmung herangezogen werden. Für die GIST430-V654A-Zelllinie wurde zunächst eine Durchmusterung der experimentellen Parameter durchgeführt.

Die GIST-T1-Zelllinie wächst vergleichsweise schneller als die mit abgeleiteten Sekundärmutationen. Der Vergleich der linearen Wachstumsbereiche und der zugehörigen Lumineszenzen führte für GIST-T1 zu der Wahl einer Zellzahl von 900 Zellen/*well* mit einer Lumineszenz von $1,2 \cdot 10^7$. Für GIST-T1-T670I wurde entsprechend eine Zellzahl von 750 Zellen/*well* mit einer detektierten Lumineszenz von $5,4 \cdot 10^6$ gewählt. Die optimale Zellzahl für GIST-T1-D816E wurde auf 800 Zellen/*well* mit der zugehörigen Lumineszenz von $5,7 \cdot 10^6$ determiniert. Als optimale Zellzahl für die KIT-negative Zelllinie GIST-48B wurden 400 Zellen/*well* mit einer Lumineszenz von $4,2 \cdot 10^6$ selektiert.

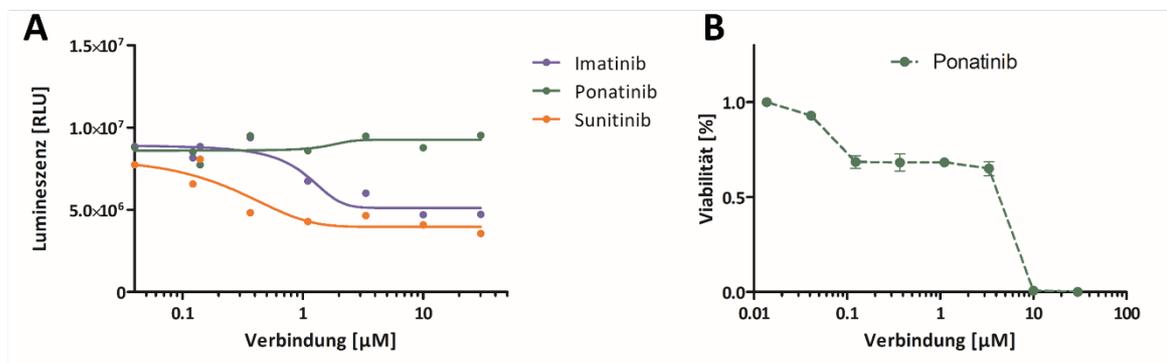


Abbildung 24: A) Exemplarische Bestimmung der GI_{50} -Werte für Ponatinib, Imatinib und Sunitinib für GIST430-V654A bei einer Zellzahl von 2500 Zellen/*well*. Die generierten GI_{50} -Werte entsprechen nicht den literaturbekannten Werten. B) Exemplarisch normierte Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung des GI_{50} -Werts von Ponatinib in GIST430-V654A. Der erwartete sigmoidale Kurvenverlauf ist nicht gegeben.

Für die GIST430-V654A-Zelllinie wurden testweise die GI_{50} -Werte im Bereich von 800-2400 Zellen/*well* ermittelt. Als Referenzverbindungen wurden Ponatinib, Sunitinib und Imatinib verwendet. Allerdings konnten auch innerhalb dieses Zellzahlbereichs keine mit der Literatur¹⁸⁵ vergleichbaren Werte erzeugt werden (Abbildung 24A).

Ponatinib, der in der Literatur als aktivster GIST430-V654A Inhibitor bekannt ist, zeigte keine Inhibition der GIST430-V654A-Zelllinie. Auch für Imatinib und Sunitinib konnten keine der Literatur entsprechenden Werte generiert werden. Zudem zeigten die Dosis-Wirkungskurven nicht den erwarteten sigmoidalen Verlauf, stattdessen konnten mehrere Wendestellen identifiziert werden (Abbildung 24A und B). Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 96 h zeigte keinen Effekt bezüglich des Wachstumsverhaltens und der generierten GI_{50} -Werte. Ein negativer Einfluss des in den Stammlösungen der Inhibitor-Verdünnungsreihe enthaltenen DMSO konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Im Zuge der Durchmusterung experimenteller Parameter stellte sich heraus, dass die GIST430-V654A-Zelllinie vermeintlich von zuvor benötigten Wachstumsfaktoren entwöhnt worden war. Das langsame Wachstumsverhalten der GIST430-V654A-Zelllinie entspricht nicht einer Wachstumsfaktorenentwöhnung. Aus diesem Grund wurde eine jüngere Zellpassage herangezogen und mit den Wachstumsfaktoren enthaltenden Serum Extendern BPE (*Bovine Pituitary Extract*) und MITO+ (beides Corning®) versetzt. Das Wachstum der GIST430-V654A-Zellen erreichte mit der Änderung dieser Parameter einen mit den anderen GIST-Zelllinien vergleichbares Wachstumsverhalten mit einem gut definierten linearen Wachstumsbereich und einer sichtbaren stationären Phase. Der lineare Wachstumsbereich endete bei ca. 2200 Zellen/*well*. Um eine optimale Vergleichbarkeit der GI_{50} -Werte unter den untersuchten Zelllinien zu gewährleisten, wurde für GIST430-V654A eine Zellzahl von 2000 Zellen/*well* gewählt. Für diese Zellzahl wurde eine mit den anderen Zellen vergleichbare Lumineszenz von $1.0 \cdot 10^7$ detektiert. Auf diese Weise konnten die Zellzahlen für alle GIST-Zelllinien im Hinblick auf einen linearen Wachstumsbereich und ein vergleichbares Lumineszenzsignal ($5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$) eingestellt werden, um eine Vergleichbarkeit der generierten GI_{50} -Werte zu gewährleisten. Die Problematik der oben angesprochenen atypisch verlaufenden Dosis-Wirkungskurven konnte durch die Anpassung der Verdünnungsreihe der Inhibitoren (1.4 nM bis 20 μ M anstelle von 14 nM bis 30 μ M) gelöst werden. Die auf diese Weise determinierten Zellzahlen wurden zur Validierung des Testsystems durch die Determinierung der GI_{50} -Werte der literaturbekannten Referenzinhibitoren Imatinib, Sunitinib, Regorafenib und Ponatinib herangezogen (Abbildung 25A-G).

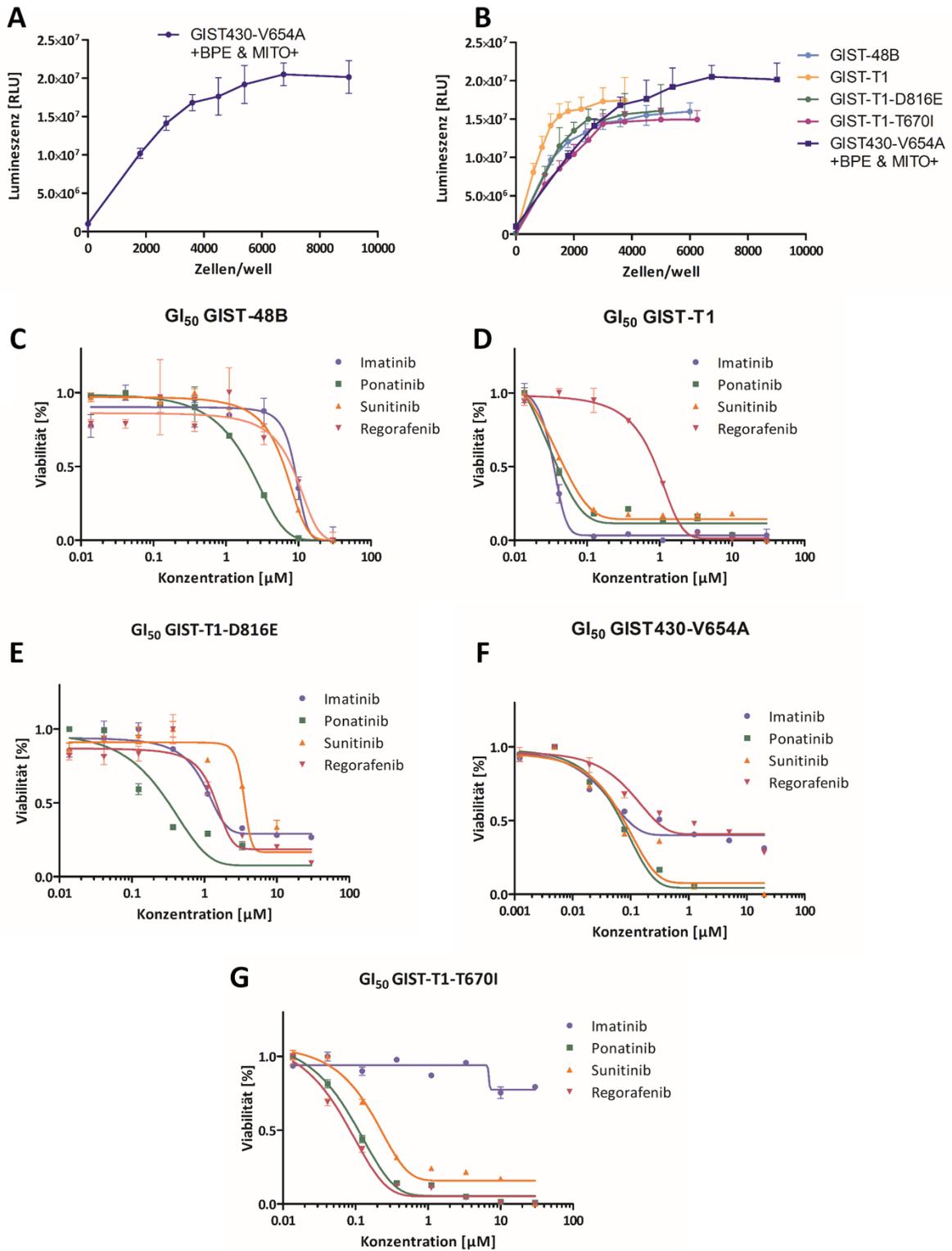


Abbildung 25: A) Zellzahlbestimmung von GIST430-V654A nach Optimierung der Zellkultivierung. B) Vergleich der Zellzahloptimierungskurven aller Zelllinien. C-G) Dosis-Wirkungskurven zur Bestimmung der GI₅₀-Werten nach Optimierung der Bedingungen für die GIST430-V654A-Zelllinie und Anpassung der Verdünnungsreihe der Inhibitoren.

In Tabelle 13 sind die ermittelten GI_{50} -Werte für die untersuchten Referenzverbindungen im Vergleich zu den dazugehörigen literaturbekannten Werten¹⁸⁵ zusammengefasst.

Tabelle 13: GI_{50} -Bestimmung der ausgewählten Referenzinhibitoren auf den Zielzelllinien.*

Verbindung	GI_{50} [nM]									
	GIST-48B		GIST-T1		GIST-T1 -T670I		GIST-T1 -D816E		GIST430 -V654A	
		Lit. ¹⁸⁵		Lit. ¹⁸⁵		Lit. ¹⁸⁵		Lit. ¹⁸⁵		Lit. ¹⁸⁵
Imatinib	>10000	>5000	40	30	>10000	>5000	3000	604	1100	1204
Ponatinib	2000	800	17	5	40	8	106	23	149	159
Sunitinib	>10000	>5000	40	15	90	48	5880	3111	98	90
Regorafenib	>10000	>5000	130	110	380	249	1350	395	3000	1001

*Die ermittelten GI_{50} -Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die GI_{50} -Werte der Zielzelllinien wurden mit Unterstützung von M. Sc. Marina Keul bestimmt.

Die ermittelten GI_{50} -Werte korrelieren sehr gut mit den Literaturwerten (Tabelle 13). Ponatinib zeigt den höchsten antiprolerativen Effekt auf allen KIT-abhängigen Ziellinien (GI_{50} = 17-149 nM) mit einem charakteristischen Aktivitätsverlust auf der Ziellinie GIST430-V654A (GI_{50} = 149 nM). Die gemessenen GI_{50} -Werte der Inhibitoren Sunitinib und Regorafenib gegenüber den GIST-Ziellinien liegen ebenfalls im Bereich der Literaturwerte.¹⁸⁵ Imatinib zeigt wie erwartet lediglich einen Effekt auf der Primärmutationstragenden GIST-T1 Ziellinie (GI_{50} = 40 nM).

Zusammenfassend konnten die hier untersuchten Ziellinien für den verwendeten Zellviabilitätsassay erfolgreich optimiert werden, sodass valide, mit der Literatur vergleichbare GI_{50} -Werte bestimmt werden konnten. Das hier etablierte zelluläre Testsystem wurde für die Ermittlung aller zellulären Daten der synthetisierten Moleküle genutzt. Die Bedingungen aus der Zellzahloptimierung wurden zudem für die Western-Blots genutzt, sodass die dosisabhängige Inaktivierung von pKIT und der nachgeschalteten Substratproteine in Bezug zu den ermittelten GI_{50} -Werten gesetzt werden kann.

3.3.5.2 Evaluierung in humanen GIST-Zelllinien^{IV}

Die untersuchten Verbindungen **5a**, **5d**, **5f**, **5g**, **6a**, **7a-l**, **8b**, **d**, **9a**, **b**, und **10** reduzierten die Zahl an GIST-T1 Lebendzellen mit GI_{50} -Werten im Bereich von 20-120 nM (Tabelle 14). Eine Ausnahme bilden die 2-Pyridinyl-Derivate **8a** und **8c**. Diese tragen einen Ringstickstoff in *ortho*-Position zum Alkin-Linker und zeigen im Vergleich zu 3-Pyridinyl-Derivaten **8b** und **8d** einen verringerten antiproliferativen Effekt auf GIST-T1 (vgl. **8a** und **8c**: 7097 und 4190 nM und **8b** und **8d**: 150 und 33 nM). Die Substanzen **8c** und **8d** mit einer zusätzlichen Amino-Gruppe in *para*-Position zum Alkin-Linker weisen eine höhere Reduktion der Zellviabilität auf als **8a** und **8b**, was die Hypothese einer zusätzlichen positiven Interaktion zur Kinase durch diese Amino-Gruppe stützt. Einen signifikanten Unterschied zwischen diesen Verbindungen bezüglich ihrer antiproliferativen Aktivität wurde bei der Untersuchung der Sekundärmutationen beobachtet. Alle Verbindungen mit einem anderen Substituenten als einer Trifluoromethyl-Gruppe im *back pocket*-bindenden Strukturelement (**8a-d**, **9a-b**) verzeichneten einen signifikanten Potenzverlust in den Sekundärmutationen tragenden GIST Zelllinien. Diese Beobachtung ist konform mit den Ergebnissen der biochemischen Evaluierung und hebt die Bedeutung des Trifluoromethylsubstituenten sowie die Position des Ringstickstoffs für die Inhibition der KIT-Varianten sowohl im biochemischen als auch im zellulären Experiment hervor.

Als KIT negative Kontrolle wurde die Zelllinie GIST-48B herangezogen. Diese Zelllinie exprimiert KIT in nicht signifikanten Mengen und besitzt somit auch keine onkogene Abhängigkeit von KIT. Eine antiproliferative Wirkung auf dieser Zelllinie rührt daher aus der Inhibition anderer mit dem Zellüberleben assoziierten Proteine her. Für die KIT-negative Zelllinie-48B resultierte aus der Behandlung der Zellen mit **8a-b** und **9a-b** keine signifikante Abnahme der Proliferation, was auf eine KIT-spezifische Wirkungsweise hindeutet. Allerdings wurde für diese Substanzen auch kein signifikanter inhibitorischer Effekt auf die hier untersuchten KIT-Mutanten GIST-T1-T670I, GIST-T1-D816E und GIST430-V654A beobachtet. Im Gegensatz zu den erhobenen IC_{50} -Werten (Tabelle 11) lassen sich im zellulären System die Nuancen der inhibitorischen Effektivität der Scharnierregion-bindenden Struktur motive beobachten (bspw. vgl. **8a** vs. **8d** $IC_{50} = a$ (keine Inhibition) für $KIT^{V559D/T670I}$, $KIT^{V559D/V654A}$, KIT^{D816H} , **8a** vs. **8d** $GI_{50} = 12473$ nM vs. 1224 nM ($KIT^{V559D/T670I}$), keine Inhibition vs. 2063 nM ($KIT^{V559D/V654A}$), a vs. 1269 nM (KIT^{D816H}).

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

Die Trifluoromethyl-Gruppe im *back pocket* Element tragenden Derivate **7a-l** zeigten für GIST-T1 einen starken antiproliferativen Effekt (23-191 nM). Die Verbindungen **7a-l** wiesen vermutlich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Ponatinib eine hohe Effektivität auf die Imatinib-resistente Zelllinie GIST-T1-T670I auf. Das übernommene Strukturelement des Alkin-Linkers sollte favorisierte van-der-Waals Interaktionen zur der Türstehermutation T670I ausbilden. Die Behandlung der GIST-T1-D816E- und GIST430-V654A-Zellen mit den Verbindungen zeigte bezüglich der ermittelten GI₅₀-Werte die gleichen Tendenzen wie bereits in den isolierten Proteinen im biochemischen Assay beobachtet wurde. Im Einklang mit den biochemischen Daten zeigten die Verbindung **7f** und die strukturell eng verwandten Analoga **7i**, **7k** und **7b** die potenteste Reduktion der Zellviabilität in GIST-T1-D816E (GIST-T1-D816E: **7f**, IC₅₀ 42 nM, GI₅₀ 141 nM; **7i**, IC₅₀ 99 nM, GI₅₀ 474 nM; **7i**, IC₅₀ 140 nM, GI₅₀ 221 nM; **7d**, IC₅₀ 138 nM, GI₅₀ 332 nM). Interessanterweise zeigte der Großteil der Trifluoromethyl-substituierten Verbindungen im zellulären Kontext ein verbessertes antiproliferatives Profil für GIST430-V654A-Zellen im Vergleich zum biochemischen Experiment. Speziell **7f** wies den höchsten inhibitorischen Effekt auf allen KIT-Varianten auf, sowohl auf Basis der biochemischen, als auch im Rahmen der zellulären Evaluierung. Das Scharnierregion-bindende 2-Amino-pyrimidinstrukturmotiv in Verbindung **7f** zeigte eine verbesserte Aktivität gegenüber GIST430-V654A-Zellen im Vergleich zu dem Imidazolo-pyridazin-basierten Scharnierregion-bindenden Element in Ponatinib (GI₅₀: 51 (**7f**) vs. 149 nM (Ponatinib)). Die Beobachtung der verbesserten Potenz von **7f** in der zellulären Evaluierung unterstützte die Hypothese der Ausbildung einer weiteren Interaktion zur Kinase (Wasserstoffbrückenbindung) und stand im Einklang mit den durchgeführten *in silico*-Studien (Abbildung 21A). Die *in silico* Studien für die KIT^{V654A}-Sekundärmutation wiesen auf eine erhöhte Flexibilität der Bindetasche sowie auf eine bevorzugte aktive Konformation der KIT^{V654A} mutierten Kinase im Apo-Zustand hin, eine langsamere Bindung von Typ II-Inhibitoren könnte als Konsequenz dieser Beobachtung vermutet werden, da mit einer erhöhten Energiebarriere für die Komplexbildung gerechnet werden kann. Aus diesem Grund könnte die generell längere Inkubationszeit (72 h) im zellulären Kontext in der beobachteten erhöhten Potenz der Inhibitoren resultieren. In den im Vergleich zum biochemischen System sehr viel komplexeren zellulären Kontext müssen allerdings unter anderem auch andere Parameter, wie *off-target* Effekte oder eine verbesserte Zellpermeabilität, etc. in Betracht gezogen werden.

Tabelle 14. GI₅₀-Bestimmung der synthetisierten Derivate **5a, d, f, g, 6a, 7a-l, 8a-d, 9a, b** und **10** auf den Zelllinien GIST-48B, GIST-T1, GIST-T1-T670I, GIST-T1-D816E und GIST430-V654A.^aNicht-inhibierend bei einer 20µM Inhibitor-Konzentration.*

Verbindung	GI ₅₀ [nM]				
	GIST-48B	GIST-T1	GIST-T1-T670I	GIST-T1-D816E	GIST430-V654A
5a	4877 ± 358	896 ± 175	3342 ± 282	9891 ± 1741	3905 ± 1799
5d	a	10019 ± 1870	15291 ± 2665	a	a
5f	9942 ± 1049	11006 ± 825	7609 ± 286	a	15858 ± 498
5g	3627 ± 1346	5729 ± 705	9512 ± 403	a	a
6a	a	7840 ± 891	10136 ± 2058	a	a
7a	3627 ± 532	55 ± 9	97 ± 19	1673 ± 328	697 ± 76
7b	1860 ± 250	121 ± 320	4375 ± 1985	a	2005 ± 890
7c	3793 ± 525	82 ± 115	165 ± 33	991 ± 95	564 ± 32
7d	2705 ± 296	51 ± 13	76 ± 18	332 ± 77	333 ± 1
7e	6247 ± 242	54 ± 11	89 ± 17	580 ± 141	459 ± 47
7f	2024 ± 545	23 ± 6	44 ± 8	141 ± 12	51 ± 5
7g	5132 ± 511	119 ± 21	198 ± 25	704 ± 110	481 ± 6
7h	3037 ± 620	59 ± 12	184 ± 26	2289 ± 382	723 ± 45
7i	2087 ± 147	59 ± 11	117 ± 29	474 ± 37	307 ± 2
7j	4146 ± 1116	282 ± 78	2971 ± 1150	a	4145 ± 94
7k	2237 ± 156	42 ± 8	67 ± 12	221 ± 42	404 ± 335
7l	2065 ± 288	191 ± 64	301 ± 68	645 ± 744	926 ± 385
8a ^{**}	a	7097 ± 522	12473 ± 3527	a	a
8b ^{**}	a	150 ± 37	6352 ± 1825	9610 ± 1089	4032 ± 97
8c ^{**}	a	4189 ± 727	a	a	a
8d ^{**}	6877 ± 1409	33 ± 6	1224 ± 758	1269 ± 53	2063 ± 1294
9a ^{**}	11966 ± 2280	57 ± 15	3294 ± 314	5358 ± 1309	1639 ± 176
9b ^{**}	8285 ± 2983	31 ± 16	1362 ± 576	904 ± 490	920 ± 105
10	15832 ± 390	35 ± 3	51 ± 1	381 ± 33	308 ± 26
Imatinib	a	40 ± 8	a	a	1100 ± 632
Ponatinib	2000 ± 450	17 ± 8	40 ± 19	106 ± 60	149 ± 36
Sunitinib	a	40 ± 4	90 ± 36	5880 ± 1991	98 ± 37
Regorafenib	a	130 ± 77	380 ± 48	1350 ± 845	3000 ± 814

*Die ermittelten GI₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die GI₅₀-Werte wurden mit Unterstützung von M. Sc. Marina Keul bestimmt.^{**}Die Verbindungen **8a-d** und **9a, b** sind im Rahmen der Masterarbeit von Jasmin Krüll¹⁹⁰ synthetisiert worden.

Alle getesteten Trifluoromethyl substituierten Verbindungen (**7a-l**) wiesen eine mit Ponatinib vergleichbare Inhibition der KIT-negativen Zelllinie (GIST-48B) mit GI_{50} -Werten im Bereich von 1.8-6.2 μ M auf. Diese Beobachtung weist auf einen KIT-spezifischen Wirkmechanismus mit mäßiger Inhibition anderer zum Zellüberleben relevanter Proteine hin. Ein sehr interessantes Inhibitionsprofil wurde für Verbindung **10** beobachtet. Obwohl für die verwandten Intermediate **5d** und **5f** weder eine Inhibition von GIST-T1 noch der KIT-Mutanten ersichtlich war, demonstrierte **10** mit dem invertierten Substitutionsmuster für die Substituenten R^3 und R^4 eine nur marginale antiproliferative Wirkung auf die KIT-negativen Zellen (16 μ M), während Aktivität gegenüber den KIT-Zelllinien GIST430-V654A (308 nM) und GIST-T1-D816E (381 nM) erhalten blieb. Dies weist auf eine verbesserte *off-target*-Selektivität im Vergleich zu Ponatinib und **7f** hin.

Für eine weiterführende *in vitro* Charakterisierung des inhibitorischen Effekts auf die Zielkinase KIT und deren Auswirkung auf nachgeschaltete Substratproteine wurden für die drei potentesten und aufgrund ihres Substitutionsmusters diversesten Verbindungen **7e**, **7f**, und **10** eine Western Blot Analyse in den Zelllinien GIST-T1-D816E und GIST430-V654A durchgeführt (Abbildung 26A,C). Bei der Betrachtung der KIT-Phosphorylierung an Y703 (Autophosphorylierungsstelle) und der mit KIT zusammenhängenden nachfolgenden Phosphorylierung einer Auswahl von KIT Substraten, unter anderem Akt (pS473) und MAPK (pT202/pY204), stellte sich Verbindung **7f** als die potenteste heraus. In einer Konzentration von 100 nM zeigte **7f** eine signifikante Inhibition der Signalkaskade in GIST430-V654A- und GIST-T1-D816E-Zellen. Diese Beobachtung korrelierte mit den biochemischen und zellulären Daten für **7f**. Die Behandlung der Zellen mit den ausgewählten Verbindungen **7e**, **7f** und **10** führte zu einer Herabsetzung der Detektion zellulären pKIT, pAkt, und pMAPK in GIST-T1 und GIST-T1-D816E-Zellen in konzentrationsabhängiger Weise. Die Western Blot Analyse verdeutlichte, konform zu den ermittelten IC_{50} bzw. GI_{50} -Werten, den Unterschied zwischen Verbindung **7e** und **7f** bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität in Abhängigkeit des Substitutionsmusters des Scharnierregion-bindenden Strukturmotivs. Die Positionierung des Ringstickstoffs im Heterozyklus des Scharnierregion-bindenden Strukturmotivs in *meta*-Position zum Alkin-Linker scheint gegenüber derer in *ortho*-Position bevorzugt zu sein.

Insgesamt korreliert die Western Blot Analyse bezüglich der inhibitorischen Wirkung der untersuchten Verbindungen mit den im biochemischen und zellulären Experiment ermittelten IC_{50} - bzw. GI_{50} -Werten (Abbildung 26).^V

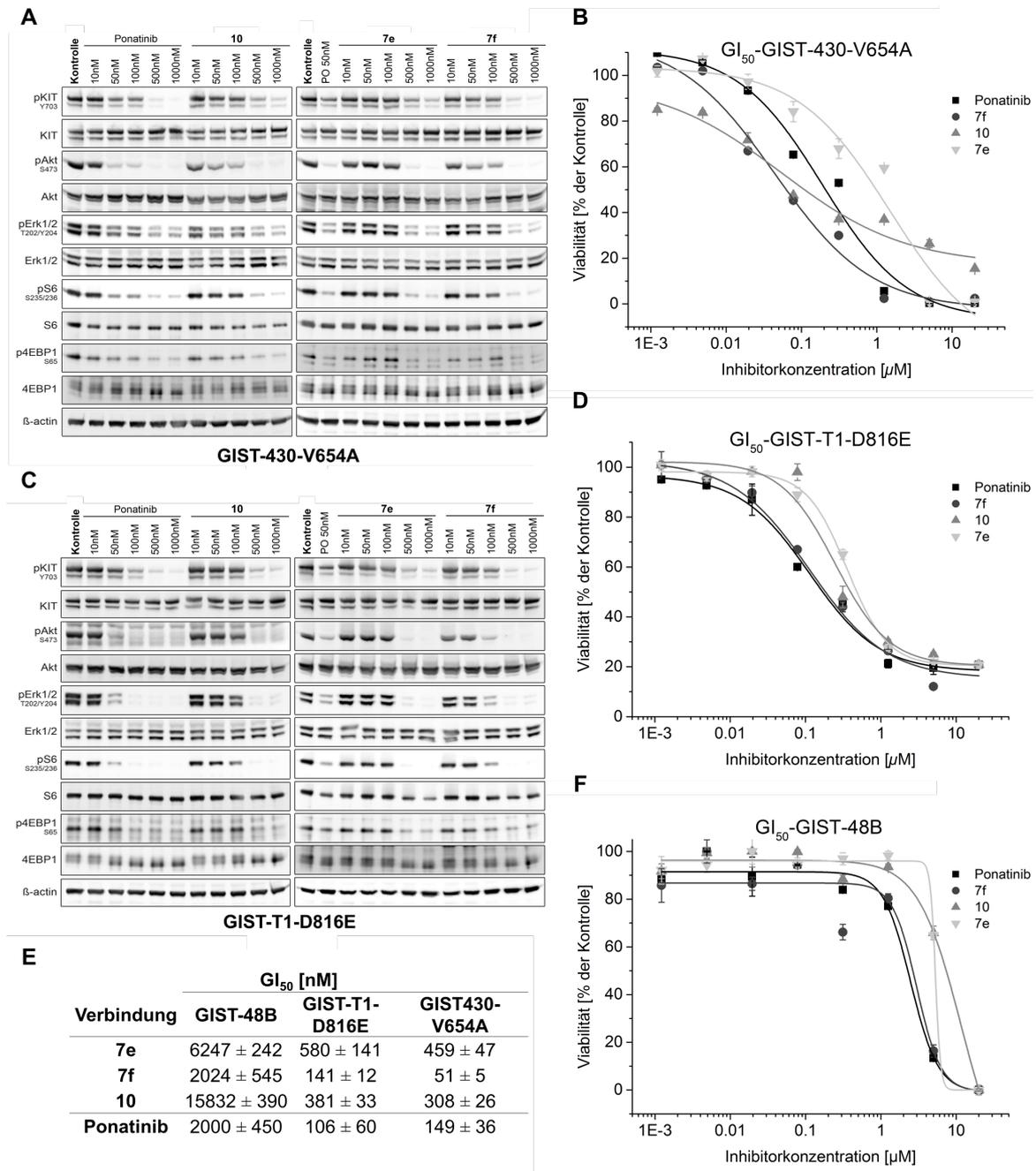


Abbildung 26: A, C) Western-Blot-Analyse nach Inkubation (3 h) mit unterschiedlichen Konzentrationen von 7e, 7f, 10 und Ponatinib in GIST-T1-D816E und GIST430-V654A. B, D, F) Entsprechende Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindungen 7e, 7f, 10 und Ponatinib für die GIST-Zelllinien GIST-430-V654A, GIST-48B und GIST-T1-D816E: B) Konstitutiv aktiver KIT mit der Sekundärmutation GIST430-V654A, D) Konstitutiv aktiver KIT mit der Sekundärmutation GIST-T1-D816E, und F) KIT-negative Zelllinie GIST-48B nach 72 h Inkubationszeit mit 7e, 7f, 10 und Ponatinib. E) GI_{50} -Werte in GIST-48B, GIST-T1-D816E, und GIST430-V654A von 7e, 7f, 10 und Ponatinib. Die Western-Blots wurden im Rahmen der Kooperation mit der AG Bauer von Julia Ketzer angefertigt.

^V In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Sebastian Bauer am Universitätsklinikum in Essen.

3.3.6 Pharmakokinetische Charakterisierung

Die biologisch aktivste Substanz **7f** und die in Bezug auf ihr Selektivitätsprofil und Aktivitätsprofil hervorstechende Substanz **10** wurden für ihre weitere Profilierung pharmakokinetisch charakterisiert. Die ausgewählten Verbindungen wurden hinsichtlich Mikrosomen- und Plasmastabilität, zellulärer Absorption (Caco-2-Zellassay) sowie Plasmaproteinbindung untersucht und mit denen der zugelassenen Inhibitoren Imatinib, Regorafenib und Ponatinib verglichen (Tabelle 15 und Abbildung 27). Die daraus abgeleiteten Daten sollten Aufschluss über die Auswirkung des Scharnierregion-bindenden Strukturelements auf die pharmakokinetischen Eigenschaften geben und eine Bewertung hinsichtlich der Eignung der Substanzen für *in vivo* Studien ermöglichen.

Tabelle 15: Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter der Verbindungen **7f**, **10**, Ponatinib, Imatinib und Regorafenib.

Pharmakokinetische Parameter (Mensch / Maus)	7f	10	Ponatinib	Imatinib	Regorafenib
Plasmastabilität* [% verbleibend]	91/50	59/84	82/74	94/93	63/50
Plasmaproteinbindung** [% gebunden]	99.6	98.4	99.8	-	-
Mikrosomenstabilität (Phase I)* CL_{int} [$\mu\text{L min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	4/104	26/36	2/34	22/36	10/18
Caco-2: $P_{app} A \rightarrow B$** [$10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$]	4.45	7.55	1.65	-	-
Caco-2: $P_{app} B \rightarrow A$** [$10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$]	4.17	5.47	0.60	-	-
Caco-2: Verhältnis** (B→A) : (A→B)	0.94	0.72	0.32	-	-

*Die Parameter wurden von Ms. S. Julia Hardick erhoben.

**Die Parameter wurden von der Lead Discovery Center GmbH, Dortmund erhoben.

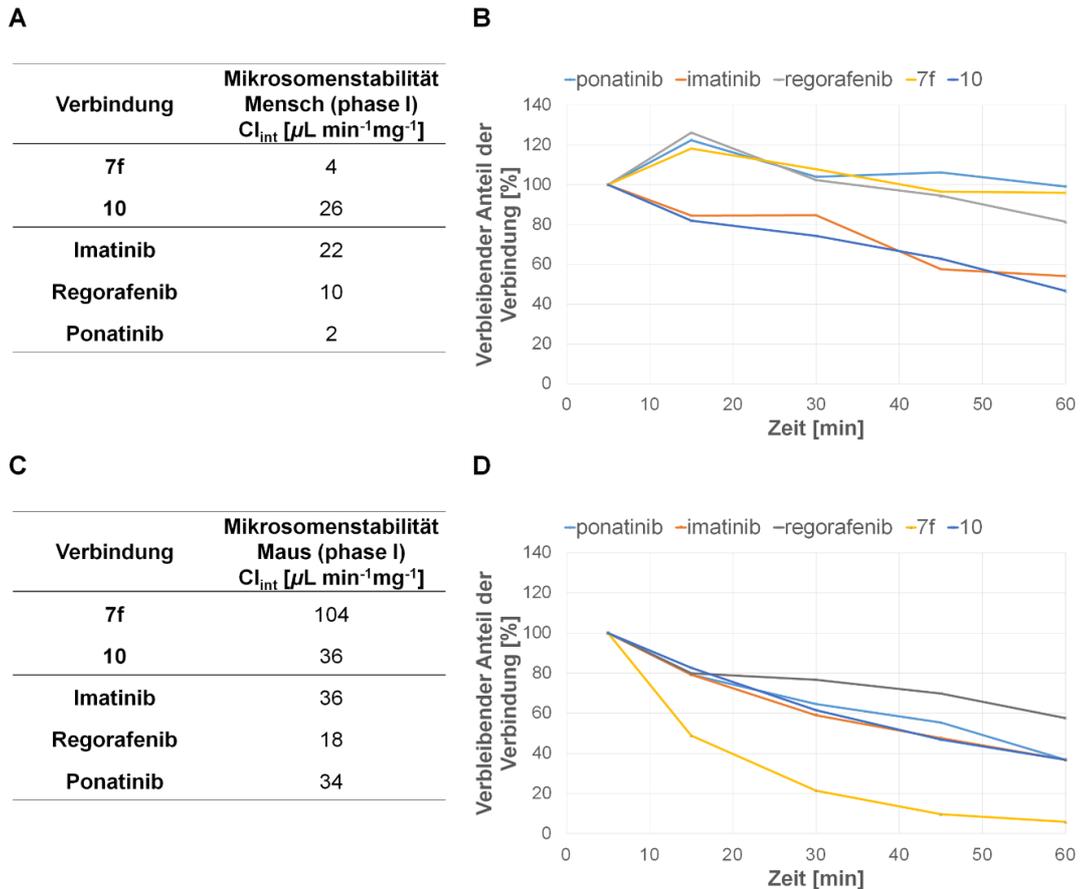


Abbildung 27: *In vitro* intrinsische Clearance Cl_{int} in A) Mensch und C) Mausebermikrosomen, berechnet basierend auf der Halbwertszeit $t_{1/2}$ der jeweiligen Verbindung. B, C) Auftragung des Verbleibenden Anteils der jeweiligen Verbindung gegen die Zeit zeigt die relative Degradation von **7f** und **10** im Vergleich zu Ponatinib, Imatinib und Regorafenib in B) Mensch- und D) Mausebermikrosomen. Die Parameter wurden von Ms. S. Julia Hardick erhoben.

Die murine mikrosomale Stabilität der zugelassenen Referenzverbindungen zeigte eine intrinsische Elimination (*intrinsic clearance*, Cl_{int}) von 18-36 $\mu\text{L min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. Verbindung **10** lag mit einem Wert von 36 $\mu\text{L min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ im Bereich der Referenzverbindungen. Im Gegensatz dazu wies Verbindung **7f** mit 104 $\mu\text{L min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ eine dreimal höhere intrinsische Elimination auf. Ein signifikanter Unterschied wurde für **7f** in humanen Mikrosomen beobachtet. Der Cl_{int} -Wert für **7f** liegt mit 4 $\mu\text{L min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ niedriger als der von **10** (26 $\mu\text{L min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) und ist im Bereich von Ponatinib (2 $\mu\text{L min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Die Plasmastabilitäten der Verbindungen **7f** und **10** wurden ebenfalls untersucht. **7f** demonstrierte eine humane Plasmastabilität von 91 % während die Plasmastabilität von **10** 59 % betrug. Ein inverses Verhalten wurde für die murine Plasmastabilität ermittelt (50 % für **7f** und 84 % für **10**). Beide Verbindungen wiesen Plasmastabilitätswerte im Bereich der FDA zugelassenen GIST-Inhibitoren (Tabelle 15) auf.

Die Plasmaproteinbindung betrug für **7f** 99.6 % und für **10** 98.4 % und befinden sich damit im Bereich der Parentalverbindung Ponatinib (99.8 % Plasmaproteinbindung). Die Charakterisierung der intestinalen Absorption durch die Determinierung des Influx und Efflux der Verbindungen durch eine Schicht von Caco-2-Zellen zeigte für **7f** und **10** eine bessere Permeabilität im Vergleich zur Parentalverbindung Ponatinib (Tabelle 15). Mit einem Influx/Efflux-Verhältnis von unter 1 ist der Efflux der Verbindungen nicht signifikant und im Bereich von dem von Ponatinib. Diese niedrigen Efflux-Raten wiesen auf eine gute Bioverfügbarkeit hin, was mit der beobachteten zellulären Wirksamkeit im zellulären Testsystem korrelierte.

3.3.7 Profilierung von **7f** und **10**

Im zellulären Assay ließ sich für **10** ein anderes Selektivitätsprofil als für die restlichen Trifluoromethyl-substituierten Verbindungen **7a-l** vermuten (Tabelle 14). Aus diesem Grund wurde eine Profilierung mit der *SelectScreen® Kinase Profiling* Plattform von Thermo Fisher in Auftrag gegeben, um eine Aussage über die Selektivität von **7f** im Vergleich zu Derivat **10** zu treffen.

Bei dem verwendeten Assay handelt es sich um einen aktivitätsbasierten Z'-LYTE Kinase-Assay. Dieser Assay beruht wie der HTRF-Assay auf der Messung des FRET zwischen einem Donor- (z. B. Kumarin) und einem Akzeptor-Fluorophor (z. B. Fluorescein).²³⁰ Das Assayformat nutzt dabei die unterschiedliche Sensitivität von phosphorylierten und unphosphorylierten Peptiden gegenüber proteolytischem Abbau aus. Das den FRET-Partner tragende artifizielle FRET-Peptid wurde im Zuge der Kinasereaktion je nach Kinase an einem spezifischen Tyr-, Ser- oder Thr-Rest phosphoryliert.²³⁰ Die Phosphorylierung des FRET-Peptids unterdrückt den Abbau durch das nach der Kinasereaktion zugegebene Entwicklungsreagenz.²³⁰ Der durch das Entwicklungsreagenz induzierte Abbau unterbricht den FRET zwischen Donor und Akzeptor des unphosphorylierten FRET-Peptids, während das phosphorylierte FRET-Peptid weiterhin die Detektion des FRET-Signals erlaubt. Die Berechnung des Emissionsverhältnisses von Donor- zu Akzeptoremission nach Exzitation des Donorfluorophors wird zur Quantifizierung des Reaktionsfortschritts herangezogen. Das Emissionsverhältnis bleibt folglich bei einem phosphorylierten FRET-Peptid niedrig (keine Kinaseinhibition) und ist bei einem unphosphorylierten FRET-Peptid vergleichsweise hoch (Kinaseinhibition).²³⁰

Die Profilierung der Verbindungen **7f** und **10** wurde bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ gegen 90 ausgewählte Kinasen getestet. Bei der Auswahl der durchmusterten Kinasen wurden vor allem (R)TKs berücksichtigt (Abbildung 28 und Tabelle 16), da die untersuchten Verbindungen auf Ponatinib, einem speziell für die Bindung an der konservierten KD der TK entwickelten Inhibitor, basieren. Somit stellen höchstwahrscheinlich TK das primäre *target* dieser Verbindungen dar. Um möglichst alle Proteinkinase-Gruppen abzudecken, wurden auch Vertreter aus den anderen Proteinkinase-Gruppen (Casein Kinase 1 Familie (CK1), AGC-Gruppe, CMGC-Gruppe, Calmodulin/Calcium regulierte Kinasen (CAMK), STE-Gruppe und Tyrosine Kinase-Like-Gruppe) ausgewählt (Abbildung 28). Das abgebildete Dendrogramm zeigt die sieben Proteinkinasegruppen. Die Sequenzhomologie zwischen den katalytischen Domänen ist allen Gruppen gemein, während der Abstand zwischen den Zweigen zweier Kinasen proportional zu ihrer Sequenzdivergenz ist.²³¹ **7f** und **10** zeigten die höchste inhibitorische Wirkung in der Gruppe der TKs. Vergleicht man die Kinomdendrogramme von **7f** und **10** zeigte sich deutlich, dass **10** ein weitaus besseres Selektivitätsprofil aufwies. **10** zeigte in vielen der untersuchten Kinasen eine weitaus geringere Inhibition (Abbildung 28 und Tabelle 16). Allerdings ist **10** ebenfalls inhibitorisch sehr aktiv auf VEGFR und die KIT-verwandten Kinasen PDGFR, Abl und FGFR (Tabelle 16).

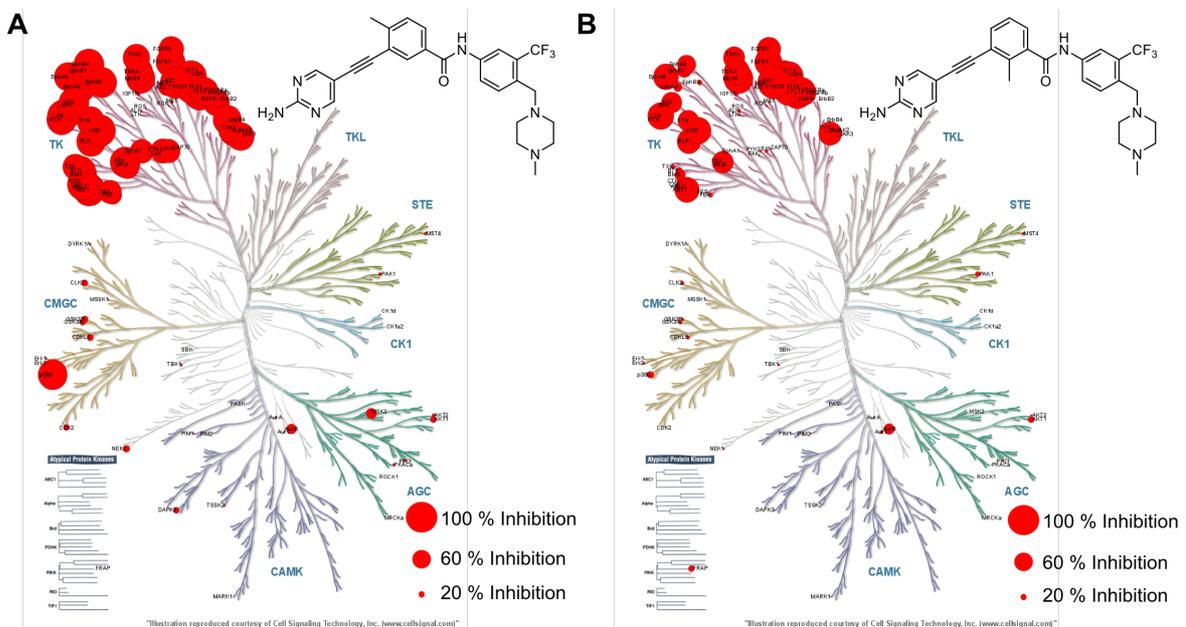


Abbildung 28: A) Kinomdendrogramm von **7f**. Die inhibitorische Wirkung von Verbindung **7f** in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ wurde auf 90 Kinasen untersucht. B) Kinomdendrogramm von **10**. Die inhibitorische Wirkung von Verbindung **10** in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ wurde auf 90 Kinasen evaluiert. Der Datensatz wurde mit dem SelectScreen® Profiling Service von Life Technologies generiert. Das Kinomdendrogramm wurde von KinMap (<http://www.kinhub.org/kinmap/>) adaptiert und die Illustration wurde mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com) erzeugt.²³¹

Tabelle 16: Ermittelte prozentuale Inhibition der Verbindungen **7f** und **10** im *SelectScreen@Kinase Profiling*.

Kinase	10 [% Inhibition]	7f [% Inhibition]	Kinase	10 [% Inhibition]	7f [% Inhibition]	Kinase	10 [% Inhibition]	7f [% Inhibition]
ABL1	81	104	FER	15	59	MUSK	96	95
ABL2	54	100	FES	-1	75	NEK1	5	22
AKT1	0	0	FGFR1	90	96	TRKA	84	89
AKT2	6	12	FGFR2	78	83	TRKC	71	88
ALK	11	7	FGR	87	102	PAK1	16	11
AurA	5	8	FLT1	85	69	PASK	-5	-8
AurB	34	32	FLT3	92	101	PDGFRa	91	93
AurC	11	4	FLT4	97	86	PDGFRb	69	76
AXL	9	51	FRAP	0	-7	PIM1	4	5
BLK	78	96	FRK	70	98	PIM2	5	3
BMX	35	94	FYN	68	91	PKACa	3	9
BTK	22	93	GSK3A	12	18	PKCt	7	10
MRCKa	-2	-4	GSK3B	10	22	FAK	6	8
CDK2	-1	0	HCK	54	97	PYK2	8	78
CDKL5	11	21	IGF1R	15	13	RET	103	102
CLK2	12	21	JAK1	76	78	ROCK1	1	-1
CSK	15	100	JAK2	25	52	ROS	1	5
CK1a2	3	3	JAK3	6	90	MSK2	2	34
CK1d	1	-2	KDR	96	102	SBK	2	1
DAPK3	2	0	LTK	8	2	SRC	43	95
DYRK1A	3	6	LYN	86	103	SRM	18	78
EGFR	4	86	Erk2	7	6	TSSK2	-2	7
EphA1	2	77	p38b	22	96	MSSK1	4	5
EphA4	28	100	Erk1	2	7	SYK	12	76
EphA5	83	92	MARK1	3	-1	TBK1	7	9
EphB1	45	97	CTK	7	60	TXK	14	83
EphB2	61	100	MER	9	21	TYK2	7	66
EphB3	16	97	MET	8	10	TYRO3	5	28
ErbB2	2	43	RON	8	6	YES	67	99
ErbB4	-4	94	MST4	10	11	ZAP70	4	5

3.4 *Scaffold Hopping* zur Generierung von Hybridinhibitoren für KIT^{VI}

3.4.1 *Scaffold Hopping*

Parallel zur Strategie des strukturbasierten Inhibitor-Designs wurde in Kooperation mit der Taros Chemicals GmbH die Strategie des *scaffold hopping* oder *lead hopping* exploriert. Der Begriff wurde 1999 durch Schneider *et al.* als Technik beschrieben, um isofunktionale Molekülstrukturen mit einem signifikant unterschiedlichen molekularen Rückgrat zu identifizieren.²³² Durch das sogenannte *scaffold* oder *lead hopping*²³³⁻²³⁴ sollen strukturell neue Verbindungen basierend auf bereits bekannten aktiven Verbindungen designt werden. Diese bekannten Ausgangsverbindungen müssen dabei bereits biologisch auf dem Zielprotein oder einem ähnlichen Protein aktiv sein und vorzugsweise einen bekannten Wirkungsmechanismus sowie ein bekanntes pharmakokinetisches Profil aufweisen. Das gewünschte Resultat soll ein neuer, aus der modifizierten Kernstruktur der Ursprungsverbindung abgeleiteter Chemotyp sein.²³⁵ Sun *et al.* klassifizierte die *scaffold hopping* Methoden in vier Hauptkategorien, die je nach Grad der Veränderung zum Parentalmolekül wie folgt unterteilt werden:²³⁶

- Der Heterozyklenaustausch basiert auf dem Austausch eines oder mehrerer Heteroatome im Kernstrukturring und wird als 1°hop bezeichnet und stellt eine weniger extensive Veränderung zum Parentalmolekül dar. Durch diesen Austausch sollen zusätzliche Wechselwirkungen zum Zielprotein generiert werden, wodurch eine verbesserte Bindungsaffinität zum selbigen erreicht werden soll.²³⁶
- Die Ringöffnung bzw. der Ringschluss werden als 2°hop klassifiziert. Der Großteil der wirkstoffartigen Moleküle besitzt mindestens ein Ringsystem. Die Ringöffnung bzw. der Ringschluss in solchen Molekülen ist eine Strategie Wirkstoffeigenschaften zu verbessern und neue Grundgerüste zu generieren. Durch eine Ringöffnung bzw. einen Ringschluss kann die Flexibilität eines Moleküls durch Kontrolle der Gesamtzahl der frei drehbaren Bindungen manipuliert werden.

^{VI} In Kooperation mit der Taros Chemicals GmbH, Dortmund.

Die molekulare Flexibilität trägt nicht nur zur entropischen Komponente der freien Bindungsenergie bei, sondern auch zur Membranpenetration und Absorption des Moleküls.²³⁶⁻²³⁷

- Die Entwicklung von Peptidomimetika aus biologisch aktiven endogenen Peptiden wird als 3°hop kategorisiert.²³⁶ Die Entwicklung von klinisch einsetzbaren Wirkstoffen auf Peptidbasis ist aufgrund limitierter metabolischer Stabilität sowie niedriger Bioverfügbarkeit nicht praktikabel.²³⁶ Das Design von kleinen Molekülen, die die strukturellen Eigenschaften gepaart mit der aktiven Konformation von Peptiden imitieren, könnte eine vielversprechende Strategie zur Adressierung herausfordernder Zielproteine sowie Protein-Protein-Interaktionsstellen sein.²³⁶ Das Ziel dieses peptidbasierten Wirkstoffdesigns ist den Peptidcharakter zu reduzieren, um Proteolyseresistenz zu erzeugen und gleichzeitig die chemischen Eigenschaften zu erhalten, die für die molekulare Erkennung verantwortlich sind.²³⁶
- Als 4°hop wird ein topologiebasiertes *hopping* bezeichnet. Es führt zu Verbindungen, die sich vom Chemotyp erheblich von der Parentalverbindung unterscheiden. Dieser Ansatz beruht auf dem Austausch von Strukturelementen aus einer Ansammlung von Verbindungen, welche oft durch eine Ähnlichkeitssuche identifiziert werden. Die Parentalverbindung wird dabei als Pharmakophormodell benutzt.

3.4.2 Entwicklung der Hybridinhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit fungierte der zum jetzigen Zeitpunkt auf allen KIT-Varianten potenteste zugelassene Inhibitor Ponatinib als Parentalverbindung. Ziel war es, durch gezieltes *scaffold hopping* den Patentraum für neuartige Verbindungen zu sondieren und eine Verbesserung hinsichtlich des Nebenwirkungs- und des pharmakokinetischen Profils von Ponatinib zu erreichen. Der Startpunkt dieses Ansatzes bildete die von Dr. Fabrizio Giordanetto durchgeführte Durchmusterung von 180 Patenten (2003-2013) für KIT-Inhibitoren und deren anschließende Auswertung hinsichtlich patentierbarer Hybridinhibitoren. Die Analyse der vorhandenen Patente zeigte, dass die patentierten Moleküle Anwendung als Inhibitoren in mehr als 230 weiteren Patenten finden. Insgesamt wurden mehr als 4000 einzelne Verbindungen mit einer Vielzahl an Chemotypen, die zum Großteil im klinischen Bereich unterrepräsentiert sind, identifiziert.

Die Auftragung der Atomanzahl gegen den dekadischen Logarithmus des *n*-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$) platzierte Ponatinib im mittleren Bereich aller patentierten Verbindungen mit einem $\log P$ -Wert von 4.4 und einer Atomanzahl von 66. Diese Auftragung wurde als Richtlinie für eine potentielle Verbesserung des physikochemischen Profils von Ponatinib herangezogen. Zudem wurde auf diese Weise ein Überblick über den chemischen Raum im Patentrahmen erhalten. Die Zusammenführung aller aus den Patenten ermittelten Daten wies darauf hin, dass kleinere und weniger lipophile Verbindungen als Ponatinib für die Adressierung von KIT präferiert werden. Ponatinib wurde daraufhin in drei strukturelle Bereiche unterteilt, die potentiell durch andere Strukturelemente aus den ausgewerteten Patenten ausgetauscht werden können (Abbildung 29A und B).

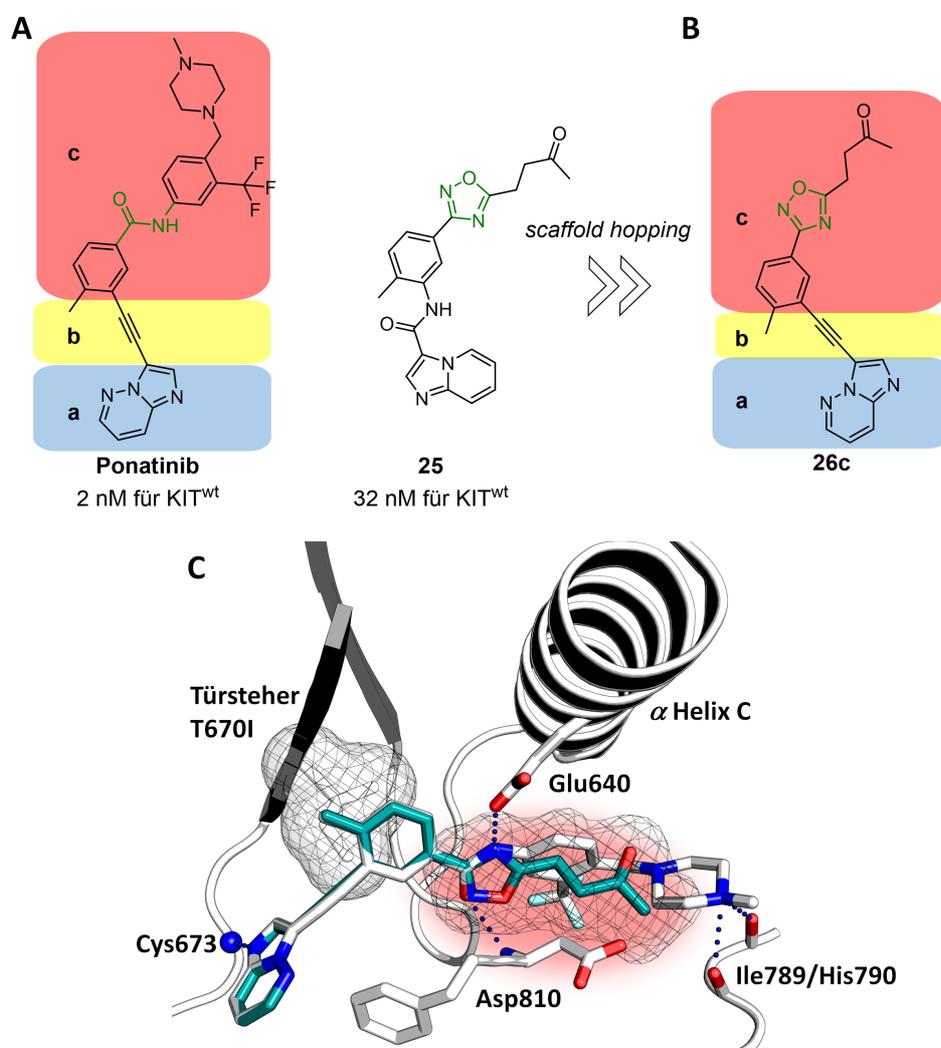


Abbildung 29: **A)** Unterteilung von Ponatinib in die drei Segmente a (Scharnierregion-bindendes Element), b (Linker) und c (*back pocket*-Element) und die aus den Patent der Firma IRM LLC (WO2013/033116A1)²³⁸ für das *scaffold hopping* ausgewählte Verbindung **25**. Das zur Amidbindung in Ponatinib (grün) bioisostere Oxadiazole-Strukturelement ist in grün hervorgehoben. **B)** Hybridmolekül aus den Fragmenten a und b von Ponatinib und den *back pocket*-bindenden Element von Verbindung **25**.²³⁸ **C)** Energieminimierte Modellierung und Überlagerung der durch *scaffold hopping* designnten Verbindung **26c** (türkis) und Ponatinib (weiß) in KIT. Das *back pocket*-Element ist rot unterlegt.

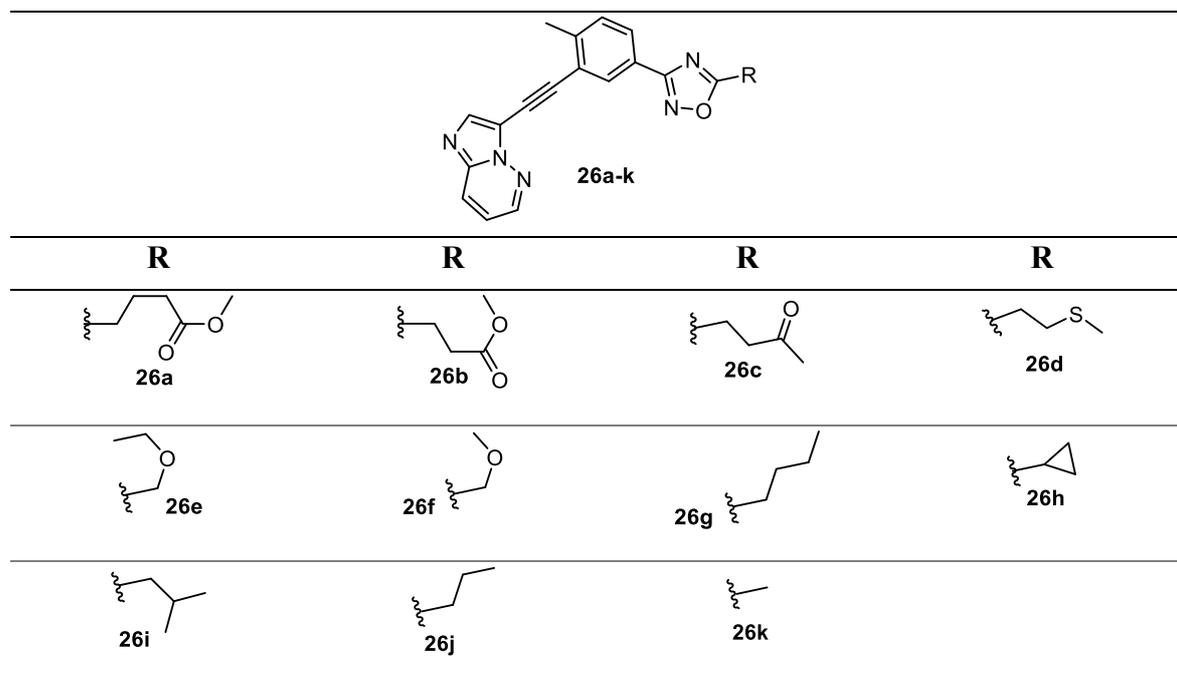
Daraufhin wurden aus den ausgewerteten Patenten mögliche Ponatinib-basierte Hybridinhibitoren zusammengestellt, die die einzelnen Strukturelemente a (Scharnierregion-bindendes Element), b (Linker) und c (*back pocket*-Element) aufweisen (Abbildung 29A). Der Fokus wurde bei diesen Molekülen auf die Änderung des *back pocket*-bindenden Motivs von Ponatinib gelegt (Abbildung 29).

Die strukturelle Änderung des Scharnierregion-bindenden Motivs wurde bereits im strukturbasierten Designansatz abgedeckt. Eine potentielle Substitution der Strukturelemente b und c zur Generierung neuartiger Hybridinhibitoren wurde aus diesem Grund in Betracht gezogen. Da der Alkin-Linker in Bezug auf Polarität und Raumforderung ein für die T670I-Mutation angepasstes Strukturmotiv darstellt, wurde auf einen entsprechenden Austausch verzichtet. Als Konsequenz wurde das *back pocket*-bindende Element c für die Substitution durch ausgewählte Struktur motive bestimmt. Von den möglichen *back pocket*-Elementen wurde jenes von Verbindung **25** ausgewählt, weil es chemisch und strukturell gut zugänglich für Derivatisierungen erschien. Auf Basis des Patents der Firma IRM LLC (WO2013/033116A1)²³⁸ für KIT- bzw. PDGFR-Inhibitoren wurde ein 4-(1,2,4-oxadiazol-5-yl)butan-2-one *back pocket*-bindendes Element ausgewählt, welches eine potentielle Verbesserung des physikochemischen Profils bewirken könnte und in der Ursprungsverbindung **25** bereits Aktivität auf KIT^{wt} zeigte (Abbildung 29A).

Ziel war es, eine fokussierte Substanzbibliothek um das *back pocket*-Element von **26c** herum aufzubauen, um eine SAR-Studie durchzuführen und potente patentierbare KIT Inhibitoren zu ermitteln. Das zentrale Strukturmotiv stellte das Oxadiazol-Strukturelement dar, welches bioisoster zur ursprünglichen Amidbindung²³⁹ in der Parentalverbindung Ponatinib ist (Abbildung 29C). Durch den Ringschluss in dieser Position wurde erwartet, dass durch diese Art der Manipulation der Flexibilität die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen Glu640 und Asp810 von KIT und den Hybridverbindungen erleichtert werden könnte, da die aktive Konformation durch den Ringschluss stabilisiert wird und der Entropieverlust bei Bindung an das Zielprotein reduziert werden könnte.²³⁶ Die als 2°hop klassifizierte Methode des *scaffold hopping* kann zur Erhöhung der Potenz von Verbindungen führen, wie in den Beispielen des Antihistamins Cyproheptadin²³⁶ und des Antagonisten des Prostaglandin-EP₁-Rezeptors²⁴⁰ gezeigt wurde. Der flexible Rest am Oxadiazol-Strukturelement wurde für die SAR-Studien in Bezug auf die Kohlenstoffkettenlänge und funktionelle Gruppen variiert.

Die zur Synthese ausgewählten Verbindungen sind in Tabelle 17 dargestellt. Für die Synthese der Substanzbibliothek sollte eine Route mit möglichst wenigen synthetischen Schritten und einer möglichst späten Derivatisierung des gewählten Grundgerüsts etabliert werden.

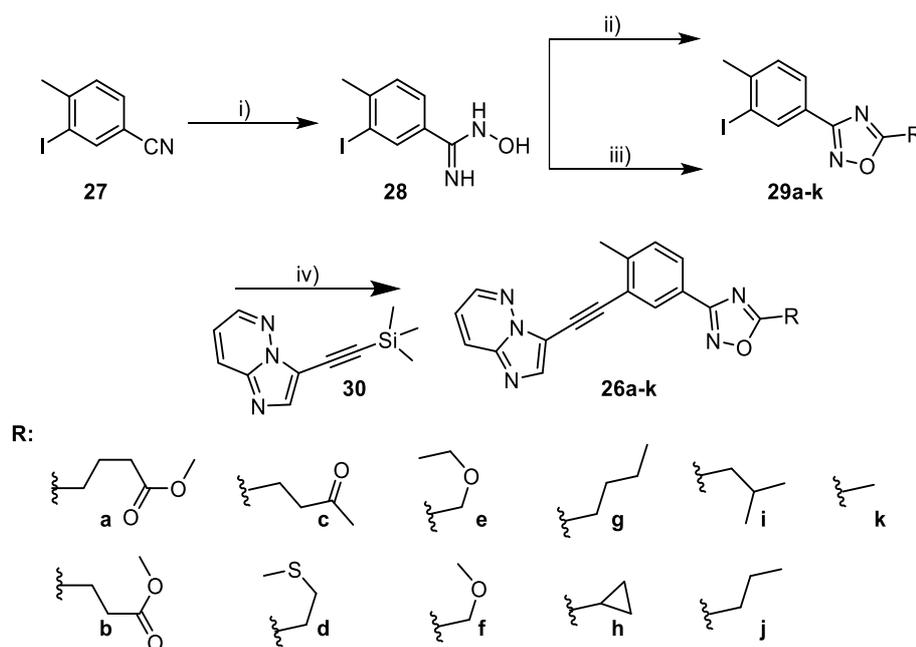
Tabelle 17: Auf dem Hybridinhibitor **26c** basierende Derivate zur Generierung einer Substanzbibliothek.



3.4.3 Synthese einer fokussierten Hybridsbibliothek

Die aus dem *scaffold hopping* erhaltene neue Grundstruktur erforderte die Entwicklung einer neuen Syntheseroute. Die Synthese der fokussierten Substanzbibliothek (Tabelle 17) erfolgte unter Zuhilfenahme literaturbekannter Synthesevorschriften,^{238, 241-242} die entsprechend für den Erhalt der Zielverbindungen kombiniert wurden (Schema 9). Auf diese Weise sollte möglichst in wenigen Syntheseschritten eine vielseitige Substanzserie generiert werden.

Schema 9: Darstellung der Verbindungen **24a-k**.^a

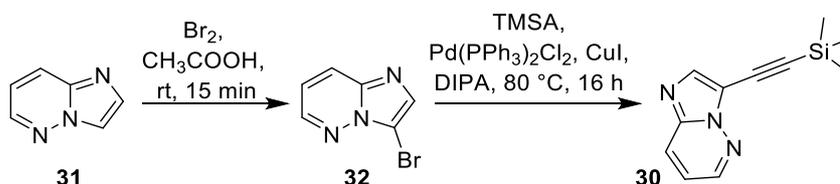


^aReagenzien und Bedingungen: (i) NH_2OH , EtOH, 70 °C, 16 h (quantitativ); (ii) Säurechlorid, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, Dioxan, 0 °C-78 °C, 12 h (74-89 %); (iii) Levulinsäure, CDI, DMF, 110 °C, 16 h (71 %); (iv) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI, (*i*-Pr) $_2\text{NH}$, TBAF, MeCN, 80 °C, 16 h (16-45 %).

Startpunkt der Synthese stellte das kommerziell erhältliche 3-iodo-4-methylbenzonitril (**27**) dar, welches zusammen mit einer 50 %-igen wässrigen Lösung Hydroxylamid in Ethanol bei einer Temperatur von 70 °C zu *N*-Hydroxy-3-iodo-4-methylbenzimidamid (**28**) umgesetzt wurde.²³⁶ Das erhaltene Amidoxim **28** ist ein Schlüsselintermediat in der Synthese einer Vielzahl von Heterozyklen, die in biologisch aktiven Verbindungen gefunden werden können.^{232, 240} Die Umsetzung von **28** mit den entsprechenden kommerziell erhältlichen Carbonsäuren oder Säurechloriden führt zu den gewünschten 1,2,4-Oxadiazolen **29a-k**. Die Umsetzung der Säurechloride mit **28** erfolgte über eine $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ katalysierte Zyklisierungsreaktion, die unter Erhitzen und der damit verbundene Elimination von Wasser zum gewünschten Oxadiazolderivat **29a-k** führte.²⁴² Wurden Carbonsäuren wie im Fall von **26c** eingesetzt, um das gewünschte Oxadiazolderivat **29c** herzustellen, so hat sich die Aktivierung der Carbonsäure mit Carbonyldiimidazol (CDI) und anschließendes Erhitzen mit **28** als probate Alternative erwiesen (Schema 9).²³⁸ Den letzten Syntheseschritt zur Generierung der Hybridinhibitoren stellte die Kupplung des Scharnierregion-bindende Elements a über den Linker b mittels einer Sonogashira-Reaktion dar. Die Synthese dieses Elements erfolgte über die Umsetzung des kommerziell erwerblichen Imidazo[1,2-*b*]pyridazin **31**.

Dieses wurde über eine selektive Bromierung in Essigsäure mit einem Überschuss elementaren Broms zu 3-Bromoimidazo[1,2-b]pyridazin (**32**) umgesetzt.²⁴¹ In einer ersten Sonogashira-Reaktion wurde aus **32** das gewünschte 3-((Trimethylsilyl)ethynyl)-imidazo[1,2-b]pyridazin (**30**) generiert (Schema 10).

Schema 10: Darstellung des 3-((Trimethylsilyl)ethynyl)imidazo[1,2-b]pyridazin **30**.



Die zweite Sonogashira-Reaktion zwischen den 1,2,4-Oxadiazolen **29a-k** und **30** wurde im Parallelreaktor unter den in Kapitel 3.3.3 etablierten optimierten Bedingungen der *in situ* Sonogashira-Reaktion mit TBAF als Entschützungsreagenz durchgeführt. Die gewünschten Hybridinhibitoren **26a-k** konnten mit dieser Syntheseroutine erhalten werden.

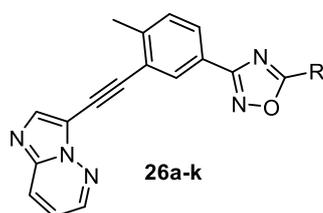
Die Hybridinhibitoren **26a-k** wiesen eine sehr limitierte Löslichkeit in dem für die Sonogashira-Reaktion verwendeten Lösemittel Acetonitril auf und konnten durch Filtration und anschließendes Waschen des Niederschlags als grau-weiße Feststoffe erhalten werden. Nach der instrumental-analytischen Charakterisierung (siehe experimenteller Teil) wurden die elf erhaltenen Hybridinhibitoren hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität gegenüber KIT^{wt} und den KIT-Varianten $\text{KIT}^{\text{D816H}}$, $\text{KIT}^{\text{V559D/V654A}}$, $\text{KIT}^{\text{V559D/T670I}}$ sowie VEGFR2 in einem biochemischen Assaysystem untersucht. Im Idealfall könnte aus der biochemischen Charakterisierung die Struktur-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden, die für die weitere Optimierung der Hybridinhibitoren herangezogen werden könnte.

3.4.4 Biochemische Evaluierung

Die in Kapitel 3.4.2 vorgestellten Verbindungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen Cisbio KinEASE™ HTRF Assay auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den klinisch relevanten KIT-Varianten KIT^{D816H}, KIT^{V559D/V654A}, KIT^{V559D/T670I} und KIT^{wt} sowie VEGFR2 untersucht (Tabelle 18).²²⁴⁻²²⁵ Als Kontrolle dienten die GIST-Therapeutika Imatinib und Ponatinib.

Tabelle 18: IC₅₀-Bestimmung der Hybridinhibitoren **26a-k** auf den Zielkinasen.

^a Nicht-inhibierend bei einer 20 μM Inhibitorkonzentration.*



R	IC ₅₀ [nM]				
	KIT ^{WT}	KIT ^{V559D/T670I}	KIT ^{V559D/V654A}	KIT ^{D816H}	VEGFR2
	652.3 ± 84.6	a	a	a	a
	7233.1 ± 966.1	a	a	a	a
	205.1 ± 47.8	a	a	a	a
	6481.6 ± 20	a	a	a	a
	639.4 ± 45.2	a	a	a	a
	1268.3 ± 340.2	a	a	a	a
	503.5 ± 240.2	a	a	a	a
	540 ± 254.6	a	a	a	a

 26i	111.7 ± 46.9	a	a	a	a
 26j	2766.7 ± 205.4	a	a	a	a
 26k	a	a	a	a	a
Imatinib	24 ± 5	a	a	a	a
Ponatinib	0.3 ± 0.1	17.4 ± 9.8	136.0 ± 39.9	20 ± 2.2	1.1 ± 0.1

*Die ermittelten IC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Experimenten.

Die Determinierung der IC₅₀ zeigte, dass keiner der synthetisierten Hybridinhibitoren Aktivität auf den KIT-Mutanten aufwies. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sind die strukturellen Eigenschaften der verwendeten *back pocket*-Elemente. Bei dem Vergleich der *back pocket*-Elemente der Verbindungen **26a-k** zu den parallel synthetisierten Verbindungen **7a-l** stach das Fehlen der CF₃-Gruppe hervor, was bereits bei den Verbindungen **8a-d** und **9a, b** zum Aktivitätsverlust auf den Varianten KIT^{D816H}, KIT^{V559D/V654A} und KIT^{V559D/T670I} führte. Die zwischen der CF₃-Gruppe und der hydrophoben Subtasche in der *back pocket* ausgebildeten Interaktionen sind wahrscheinlich gemäß den zuvor gemachten Beobachtungen für eine Aktivität gegenüber den KIT-Mutanten essentiell, da sie eine Stabilisierung der inaktiven Konformation der konstitutiv aktivierten Kinasen bewirken. Die Verbindungen **26a-k** weisen kein Strukturelement auf, welches als Ersatz für die CF₃-Gruppe fungieren kann. Unter Annahme eines aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Ponatinib für Typ II-Inhibitoren charakteristischen Bindungsmodus sollte die Bindung der Hybridverbindungen ebenfalls von der inaktiven Kinasekonformation und deren Stabilisierung abhängig sein. Die *back pocket*-bindenden Elemente von **26a-k** sind wahrscheinlich zu flexibel, fordern zu wenig Raum und bilden unzureichende Wechselwirkungen mit der Kinase aus, um die aktivierten Varianten zu inhibieren. Aus diesem Grund konnte keine Struktur-Aktivitätsbeziehung für Verbindungen bezüglich der KIT-Mutanten abgeleitet werden.

Interessanterweise zeigen die Inhibitoren **26a-k** auch keinerlei inhibitorische Aktivität gegenüber VEGFR2, während für den Großteil der Verbindungen eine moderate Potenz auf KIT^{wt} ermittelt werden konnte. Die isolierte KIT^{wt} Kinase scheint deutlich Sensitiver gegenüber Inhibitoren zu sein als der Wild-Typ von VEGFR2.

Die Substanz **26c**, die das *back pocket* Element der Patentverbindung **25** implementiert, zeigte eine sechsfache Zunahme des IC₅₀-Wertes für KIT^{wt} im Vergleich zu **25** (205 nM vs. 32 nM). Der Vergleich des Scharnierregion-bindenden Elements der Substanzen **25** und **26c** weist darauf hin, dass **25** über den Amid-Linker zwischen dem Scharnierregion-bindenden Element (a) und dem *back pocket*-bindenden Element (c) eine Wasserstoffbrückenbindung zur Türsteheraminoäure Thr670 des KIT^{wt} ausbilden könnte, während der Alkin-Linker von **26c** auf die Interaktion mit der Mutante T670I optimiert ist und keine zusätzlichen Wechselwirkungen mit dem KIT^{wt}-Türsteher eingehen kann (Abbildung 29). Dies könnte eine Erklärung für die erhöhte Aktivität von **25** im Vergleich zu **26c** sein. Die bestimmten IC₅₀-Werte von **26e-h** für KIT^{wt} befanden sich in einem Bereich von 0,5-1 µM. Diese Verbindungen unterscheiden sich kaum in Größe, Struktur und Polarität, was die ähnliche Aktivität auf KIT^{wt} erklären könnte. Das Molekül **26d** zeigte eine limitierte Löslichkeit, was die vergleichsweise geringe Aktivität (6 µM) innerhalb dieser Substanzserie erklären könnte. Der Vergleich der IC₅₀-Werte von **26a** und **26b** weist darauf hin, dass die um ein Kohlenstoffatom im hydrophoben Rest R (vgl. Tabelle 18) verkürzte Substanz **26b** weniger toleriert wird (7 µM), während **26a** mit 652 nM eine noch moderate inhibitorische Aktivität auf KIT^{wt} zeigt. Docking-Studien von **26a-c** mit der Kristallstruktur von Ponatinib im Komplex mit KIT^{wt} (pdb 4u0i) deuten auf eine Orientierung des *back pocket*-Elements der Hybridinhibitoren in die hydrophobe Subtasche hin, die von der CF₃-Gruppe der Parentalverbindung Ponatinib belegt wird (Abbildung 30). Der Grad der Interaktion der drei Moleküle mit dieser Subtasche könnte eine mögliche Erklärung für die determinierten IC₅₀ Werte sein. Während die Orientierung der polaren Ester-Funktionalitäten der *back pocket* Elemente von **26a** und **26b** vermutlich ungünstig mit der unpolaren Subtasche wechselwirken, scheint die Interaktion zum weniger polaren *back pocket* Element von **26c** vorteilhafter für die Ausbildung von Interaktionen (van der Waal-Wechselwirkungen) zu sein. Zudem ist der unpolare Teil in Verbindung **26a** dominanter (ein zusätzliches Kohlenstoffatom) und könnte bezüglich seiner möglichen Orientierung für die potentielle Interaktion mit der Subtasche vorteilhafter sein als der unpolare Teil in **26b** (Abbildung 30).

Aufgrund der Flexibilität der Verbindungen gestaltet sich die Einschätzung der bevorzugten Konformation der Moleküle für die Komplexbildung mit KIT schwierig. Dementsprechend sind auch die Dockingergebnisse kritisch zu beurteilen.

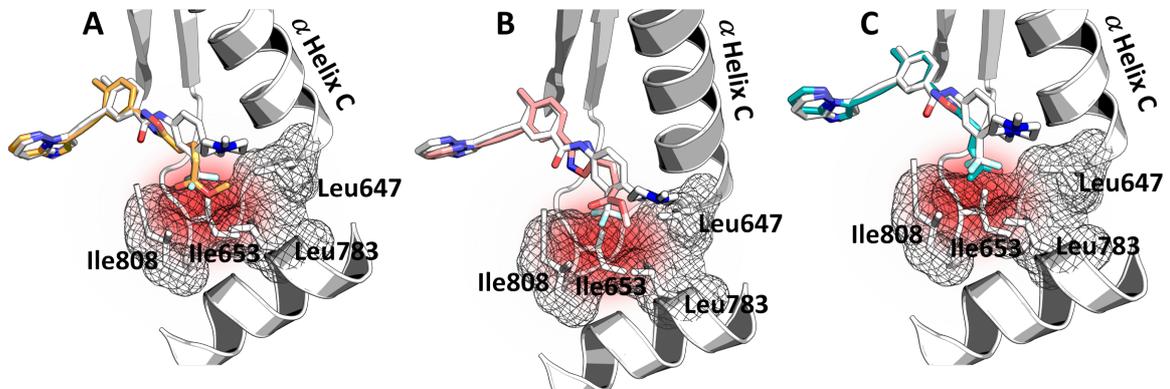


Abbildung 30: Docking der Hybridinhibitoren A) **26a**, B) **26b**, C) **26c** mit der Ko-Kristallstruktur von Ponatinib (weiß) im Komplex mit KIT^{wt} (PDB 4u0i). Die hydrophobe Subtasche der *back pocket* ist rot unterlegt.

Die Moleküle **26j-k** demonstrieren keine (**26k**) bis geringe Aktivität (**26j**) in Bezug auf KIT^{wt}. Die entsprechenden kleinen *back-pocket*-Motive interagieren vermutlich aufgrund ihrer relativen Größe nicht oder nur geringfügig mit der allosterischen Bindetasche. Das um zwei Methylengruppen verlängerte *back pocket*-Motiv von **26j** zeigt im Einklang mit dieser Hypothese mehr Aktivität als **26k** (3 μ M vs. keine Inhibition).

26i weist mit einem IC₅₀-Wert von 112 nM die größte Potenz gegenüber KIT^{wt} auf. Die relative Größe und Polarität des Isopentanrestes R von **26i** könnte am besten geeignet sein, um mit der Subtasche der *back pocket* zu interagieren. Zusammenfassend konnte keine Struktur-Aktivitätsbeziehung für die untersuchten Verbindungen bezüglich der klinisch relevanten KIT-Mutanten abgeleitet werden, da die Moleküle wahrscheinlich aufgrund ihrer relativ geringen Größe sowie hoher Flexibilität nicht in der Lage sind, die inaktive Konformation der konstitutiv aktivierten KIT-Mutanten zu stabilisieren und somit zu inhibieren. Auch die inhibitorische Aktivität auf KIT^{wt} deutet darauf hin, dass diese Art von flexiblen *back pocket*-Motiven für eine effiziente Inhibition nicht geeignet ist. Aus diesen Gründen wurde keine weitere Optimierung dieser Substanzklasse durchgeführt und stattdessen die Entwicklung der in Kapitel 3.3.3 vorgestellten Verbindungen weiterverfolgt.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Teilprojekts der Arbeit wurden reversible Typ II-Inhibitoren für die klinisch relevanten KIT-Mutanten synthetisiert und biochemisch als auch zellulär evaluiert (Kapitel 3.3.4 und 3.3.5). Die biochemische und zelluläre Charakterisierung erforderte die Optimierung und Etablierung von insgesamt fünf HTRF-Testsystemen, um die Testung der KIT-Varianten und VEGFR2 sowie die von vier humanen GIST-Zelllinien und einer KIT-negativen Zelllinie (GIST-48B) abzudecken. Die erste Substanzbibliothek basierte auf dem bis dato gegenüber den zu untersuchenden KIT-Mutanten effektivsten Inhibitor Ponatinib. Mittels MD-Simulationen der relevanten Mutanten und anschließenden Docking-Studien wurde in iterativen strukturbasierten Designzyklen die Optimierung des Scharnierregion-bindenden Elements zur Erhöhung der Affinität zu den KIT-Varianten sowie die Verbesserung des Selektivitätsprofils angestrebt. Der potenteste (**7f**) und der bezüglich seines potentiellen Selektivitätsprofils interessanteste (**10**) Inhibitor wurden anschließend pharmakokinetisch untersucht und einem Kinase Profiling unterzogen (Kapitel 3.3.6-3.3.7). In Kooperation mit der Taros Chemical GmbH wurde eine zweite Substanzbibliothek, basierend auf einem *scaffold hopping*-Ansatz, synthetisiert und biochemisch evaluiert, um neue patentierbare KIT-Inhibitoren zu generieren (Kapitel 3.4.2-3.4.4).

Basierend auf den durchgeführten MD-Simulationen der Varianten KIT^{wt}, KIT^{V559D/V654A} und KIT^{V559D/T670I} wurden Verbindungen designt und anschließend in Docking-Studien untersucht, um im Anschluss an eine biochemische und zelluläre Charakterisierung eine aussagekräftige Struktur-Wirkungsbeziehung aufstellen zu können. Durch Optimierung und Etablierung eines Synthesewegs konnte die in Kapitel 3.3.1 vorgestellte Substanzbibliothek synthetisiert werden. Die Sonogashira-Reaktion erwies sich dabei als Engpass der Syntheseroute und erschwerte die Darstellung der designten Verbindungen erheblich. Nach einer intensiven Durchmusterung von Reaktionsbedingungen konnte die Synthese der gewünschten Verbindungen unter den Bedingungen einer *in situ* Sonogashira-Reaktion mit TBAF als Entschützungsreagenz ermöglicht werden. Die biochemische und zelluläre Charakterisierung der Substanzbibliothek zeigte eine eindeutige Präferenz bestimmter Substitutionsmuster. Die CF₃-Gruppe im *back pocket*-bindenden Element stellte sich als essentiell für die Inhibition der KIT-Mutanten KIT^{D816H}, KIT^{V559D/V654A} und KIT^{V559D/T670I} heraus.

Ohne diesen Substituenten sind die Inhibitoren unabhängig vom Scharnierregion-bindenden Motiv nicht in der Lage die untersuchten KIT-Mutanten zu inhibieren (vgl. **8a-d** und **9a, b** (Tabelle 11)). Es konnte im biochemischen Assay gezeigt werden, dass die Reduzierung des Scharnierregion-bindenden Motivs auf Pyrimidin-basierte Struktur motive mit einem Protonendonor-Substitutionsmuster in *para*-Position zum Alkin-Linker zu Verbindungen mit zu Ponatinib vergleichbarer Aktivität gegenüber den hier getesteten Varianten führte. Auf der Ponatinib-resistenten KIT-Variante KIT^{V654A} konnte für die im biochemischen Assay auf allen Varianten aktivste Verbindung **7f** eine dreifache Verbesserung der inhibitorischen Aktivität auf der entsprechenden Zelllinie GIST-430-V654A beobachtet werden (51 nM vs. 149 nM, **7f** vs. Ponatinib; Tabelle 14). Die vielversprechende Verbindung **7f** sollte dahingehend auf die selektive Adressierung der Sekundärmutation V654A optimiert werden. Das Resultat des Optimierungsversuchs stellte Derivat **10** dar, welches auf der KIT-negativen GIST-Zelllinie GIST-48B eine geringere *off-target*-Toxizität zeigte und damit ein verbessertes Selektivitätsprofil vermuten ließ (16 µM vs. ~2 µM, **10** vs. Ponatinib und **7f**). Die daraufhin durchgeführte Profilierung von **7f** und **10** gegenüber 90 Kinasen bestätigte diese Annahme (Kapitel 3.3.7). Die pharmakokinetische Charakterisierung zeigte, dass **7f** und **10** im Vergleich zu den bereits zugelassenen Inhibitoren Regorafenib, Ponatinib und Imatinib eine ähnliche Mikrosomen- und Plasmastabilität sowie zelluläre Absorption (Caco-2-Zellassay) und Plasmaproteinbindung aufweisen (Kapitel 3.3.6). Eine Selektivität gegenüber VEGFR2 konnte sowohl im biochemischen Testsystem, als auch im externen Profilierungsassay nicht nachgewiesen werden. Zukünftig wäre die Untersuchung der Verbindungen auf VEGFR2-abhängigen Zellen von großem Interesse. Auf diese Weise könnte untersucht werden, ob die im biochemischen Assay erhobenen Daten für VEGFR2 auch mit einer komplexen zellulären Charakterisierung korrelieren. Weiterführend wäre die Etablierung eines Expressionssystems für die hier untersuchten KIT-Mutanten, KIT^{wt} und VEGFR2 sowie die Entwicklung von entsprechenden Kristallisationssystemen von Bedeutung. Die basierend auf den MD-Simulationen getroffenen Hypothesen bezüglich des durch die KIT-Mutationen T670I und V654A bedingten Resistenzmechanismus gegenüber zugelassenen Inhibitoren und die im Docking erhaltenen Bindungsmodi könnten durch Kristallisation der Proteine im Apo-Zustand und durch Ko-Kristallisation mit den Liganden überprüft werden.

In Kooperation mit der Taros Chemical GmbH wurde der Patentraum für KIT-Inhibitoren analysiert, um im Zuge eines auf diesen Patenten basierenden *scaffold hopping* neuartige patentierbare KIT-Inhibitoren zu generieren. Die Parentalverbindung für diesen Ansatz stellte Ponatinib dar (Kapitel 3.4.1). Nach Kombination des Imidazolo-pyridazin-basierten Scharnierregion-bindenden Motivs von Ponatinib über einen Alkin-Linker mit dem *back pocket*-Element einer der auf KIT^{wt} potentesten Verbindungen aus dem Patent der Firma IRM LLC (WO2013/033116A1),²³⁸ wurde um die resultierende Hybridverbindung **26c** eine Substanzbibliothek aufgebaut. So sollte das Potential dieser Verbindungsklasse gegenüber den hier untersuchten KIT-Varianten evaluiert und eine Aussage über die Struktur-Wirkungsbeziehung der Inhibitoren gegenüber den KIT-Varianten sowie VEGF2 aufgestellt werden. Entsprechend wurde eine Syntheseroute (Kapitel 3.4.3) entwickelt, sodass eine auf dem Hybridinhibitor **26c** basierende Substanzbibliothek synthetisiert werden konnte. Die generierte Substanzbibliothek wurde anschließend biochemisch charakterisiert. Sämtliche Verbindungen zeigten gegenüber den KIT-Varianten KIT^{D816H}, KIT^{V559D/V654A} und KIT^{V559D/T670I} keine Aktivität bei einer maximalen Inhibitorkonzentration von 20 µM. VEGFR2 wurde ebenfalls nicht im Bereich der maximalen Assaykonzentration inhibiert. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, die schon im Zusammenhang mit **8a** und **8c** aufgestellt werden konnte. Ohne zusätzliche Interaktionen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen (**8b** und **8d**) zum Scharnierregion-bindenden Element und ohne einen ausreichend mit der Subtasche in der *back pocket* wechselwirkenden Substituenten (wie beispielsweise CF₃; vgl. **7a** und **7e**) wurde VEGFR2 von diesen Inhibitoren nicht adressiert, während KIT^{wt} erfolgreich inhibiert wurde (IC₅₀ = 3-250 nM). Neben **26c** (IC₅₀ = 205 nM) erwies sich Verbindung **26i** mit einem IC₅₀-Wert von 112 nM als aktivste Substanz gegenüber KIT^{wt}. Die *back pocket*-bindenden Motive in **26c** und **26i** scheinen insoweit mit der *back pocket* zu interagieren, dass eine moderate Inhibition von KIT^{wt} ermöglicht werden kann. Weiterführend wäre auch für diese Substanzklasse eine Ko-Kristallisation im Komplex mit KIT von Bedeutung, um den Bindungsmodus zu bestätigen und die aufgestellten Hypothesen in Bezug auf die Belegung der Subtasche innerhalb der allosterischen Tasche zu festigen. Die Verknüpfung des *back pocket*-Elements von Ponatinib durch die Reaktion von 4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)benzoyl-chlorid mit dem entsprechenden Oxim könnte die Auswirkung des Oxadiazol-Strukturmotivs als Bioisoster der ursprünglichen Amidbindung auf die Aktivität im Vergleich zu Ponatinib aufklären.

Dieses Experiment könnte Aufschluss darüber geben, ob der Ringschluss eine für die Bindung zum Zielprotein stabilere Konformation dieses Strukturmotivs generiert.

4 Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden KIT-Inhibitoren

4.1 Kovalente Inhibitoren

Die bisher in dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren wechselwirken mit den Zielproteinen über reversible Interaktionen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen und ionischen Wechselwirkungen. Der reversible Charakter der gebundenen Inhibitoren zu ihren Zielproteinen unterliegt somit dem dynamischen Gleichgewicht von Assoziation und Dissoziation. Der therapeutische Nutzen der Inhibitoren hängt maßgeblich davon ab, in welche Richtung dieses Gleichgewicht durch die Interaktion von Inhibitor und Zielprotein verschoben wird. Die Maximierung von molekularen Interaktionen zum Zielprotein und die damit verbundene Erhöhung der intrinsischen Affinität der Interaktionspartner zueinander steht deshalb im Fokus der medizinischen Chemie.²⁴³

Neben dem Ansatz der reversiblen Adressierung von Zielproteinen etabliert sich zunehmend die kovalente Inhibition von therapeutisch relevanten Zielproteinen in der Wirkstoffforschung.^{118, 243} Das Konzept der kovalenten Modifikation identifizierter Zielproteine als Werkzeug in der Arzneimittelforschung für die Adressierung bestimmter Krankheitsbilder hat erst in den späten 1990er-Jahren in der pharmazeutischen Industrie an Bedeutung gewonnen.²⁴³ Als Gründe für die zurückhaltende Erforschung und Anwendung dieser Substanzklasse sind vor allem die mit der kovalenten Adressierung vermeintlich ausgelösten Immunantworten (Heptenisierung), Zellschäden und akute Toxizität zu nennen.^{118, 243-246} Die Tendenz, reaktive elektrophile Funktionalitäten in der Arzneimittelforschung zu meiden, beruht unter anderem auf verschiedenen Forschungsergebnissen, die beschreiben, wie chemisch stabile Verbindungen (z. B. Bromobenzene, Thioacetamide) und einige zugelassene Medikamente (z. B. Acetaminophen, Isoniazid, Furosemide, Halothane) zu elektrophilen Metaboliten metabolisiert werden und durch Reaktion mit Biomolekülen (z. B. Proteinen, DNA etc.) zu Zellschäden führen können.²⁴⁷⁻²⁵⁰

Alle diese Substanzen haben gemeinsam, dass sie oft in relativ hohen Dosen (Grammmaßstab) verabreicht wurden und nach ihrer Metabolisierung reaktive elektrophile Funktionalitäten tragen. Dies kann zu unspezifischer kovalenter Bindung zu diversen Proteinen führen und die oben genannten Nebenwirkungen provozieren.^{243, 251-255} Die Analyse der mechanistischen Grundlage von enzymspezifischen Medikamenten von Robertson *et al.* zeigte aber, dass ungefähr ein Drittel der von der FDA zugelassenen Inhibitoren kovalent an ihre Zielproteine bindet.²⁵⁶ Die im Nachhinein als kovalent bindend identifizierten Inhibitoren adressieren eine große Bandbreite an Krankheitsbildern, von bakteriellen Infektionen, über Krebs, gastrointestinalen Störungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen bis hin zu Erkrankungen des zentralen Nervensystems.¹¹⁷ Einige dieser kovalenten Inhibitoren werden in Langzeittherapien eingesetzt (z. B. Protonenpumpen- und 5 α -Reduktase-Inhibitoren) und indizieren, dass ein kovalenter Bindungsmodus effektiv in der Behandlung von chronischen Krankheiten sein kann.¹¹⁷

Diese Diskrepanz im Nebenwirkungsspektrum der zugelassenen kovalent bindenden Inhibitoren stimulierte weiterführenden Studien, die Aufschluss über die Struktur und Reaktivität der kovalenten Metaboliten der Inhibitoren gaben und unter anderem die Rolle der Reaktivität der Elektrophile herausstellten.^{117, 255, 257-259} Dies führte zu einer Neubewertung des Ansatzes der kovalenten Modifizierung zur selektiven Adressierung von Zielproteinen. Die Optimierung der Reaktivität des Elektrophils kombiniert mit einer auf die Selektivität und Affinität zum Zielprotein optimierten Struktur der Wirkstoffkandidaten sollen das Risiko einer unspezifischen Modifikation weitestgehend unterbinden, während die Vorteile einer kovalenten Adressierung weiterhin ausgenutzt werden können.^{117, 260} Das Produkt dieses Optimierungsprozesses sind zielgerichtete kovalent bindende Inhibitoren (TCIs: *targeted covalent inhibitors*), welche in einem initialen Bindungsschritt durch reversible Interaktionen mit ihrem Zielprotein wechselwirken, bevor im nachfolgenden Schritt die irreversible kovalente Bindungsknüpfung zwischen einer schwach-elektrophilen Funktionalität des Inhibitors („*warhead*“) und einem nukleophilen Aminosäurerest des Zielproteins erfolgt.^{117-118, 243} Die Ausbildung einer irreversiblen Bindung zwischen Inhibitor und Zielprotein erfordert die räumliche Nähe der funktionellen Gruppen, welche durch ein entsprechend im Grundgerüst positioniertes und orientiertes Elektrophil erreicht wird. Durch die sorgfältige Optimierung der designten Inhibitoren bezüglich ihrer Affinität zur Zielkinase sowie der Reaktivität und Positionierung des Elektrophils kann ein hoher Grad an Selektivität und Potenz zum Zielprotein erreicht werden.^{117-118, 243}

Die kovalente Bindungsknüpfung ermöglicht zudem die maximale Verweildauer des Inhibitors am Zielprotein, bis hin zu dessen Proteolyse.^{117-118,243} Diese Eigenschaft korreliert mit einer hohen biochemischen Effizienz, da die kovalent gebundenen Inhibitoren keiner Gleichgewichts-abhängigen Bindungskinetik unterliegen und damit auch nicht in Konkurrenz mit endogenen Substraten (z. B. ATP) stehen. Ein weiterer Vorteil, der sich aus der kovalenten Bindung an das Zielprotein ergibt, ist die mögliche Administration der Inhibitoren in geringen Dosen. Diese resultiert aus der verlängerten Wirkungsdauer (maximale Verweilzeit) und kann wiederum das Risiko der *off target*-Bindung sowie den damit verbundenen Nebenwirkungen minimieren.^{117-118, 243, 261}

Die aufgeführten Vorteile des kovalenten Wirkmechanismus tragen im Wesentlichen zum Paradigmenwechsel in Bezug auf die irreversible Modifizierung von Proteinen bei und spiegeln sich in der stetig ansteigenden Anzahl an Publikationen in diesem Forschungsfeld und den mittlerweile gezielt kovalent-bindend designten und zugelassenen zielgerichteten kovalenten Inhibitoren wieder.²⁴³

4.2 Kovalente Adressierung von KIT^{wt}

Zum jetzigen Zeitpunkt stehen keine TCIs für die Adressierung von klinisch relevanten KIT-Mutationen zur Verfügung. Die Therapie von KIT-abhängigen Krankheiten erfolgt mit den in Kapitel 1.1.4 vorgestellten reversiblen Inhibitoren. Die nächste Generation von eigens für die genetischen Läsionen in KIT entwickelten Inhibitoren in Form der klinischen Phase I-Kandidaten BLU285¹⁶⁸ und DCC-2618¹⁶⁸ bildet ebenfalls lediglich reversible Interaktionen aus. Insbesondere Mutationen, die eine Resistenz gegen Inhibitoren nicht nur basierend auf einer sterischen und/oder elektrostatischen Repulsion ausbilden, sondern auf einer Aktivierung des Zielproteins basieren, könnten ein attraktives Ziel für eine kovalente Inhibition sein. Der kovalente Bindungsmodus unterliegt keiner Gleichgewichts-abhängigen Bindungskinetik und steht dadurch auch nicht in Konkurrenz mit dem endogenen Substrat (ATP) der Kinase.^{117, 243} Diese Strategie könnte sich vor allem für die Inhibition von KIT^{V559DV654A} und der Primär- und/oder Sekundärmutation D816 in KIT als vorteilhaft herausstellen. Die Mutation dieser beiden Aminosäuren führt zu einer Verschiebung des Aktivitätszustandes der Kinase auf Seiten der aktiven Konformation und dementsprechend zu einer konstitutiven Aktivierung.

Dabei ist die aktivierende Wirkung der D816-Mutationen sehr viel ausgeprägter als die der Primär-, kombiniert mit der Sekundärmutation in KIT^{V559D/V654A}. Neben der hier postulierten zusätzlich aktivierenden Wirkung der V654A-Mutation (Kapitel 3.3) spielt auch der durch die Mutation induzierte Verlust von van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den verfügbaren Inhibitoren selbst eine Rolle in der Resistenzbildung.^{82, 97, 157} Mutationen an D816 in KIT befinden sich nicht im aktiven Zentrum der Kinasedomäne und können deshalb nicht direkt mit Inhibitoren adressiert werden. Die Punktmutation V654A ergibt aufgrund des relativen Größenunterschieds der mutierten Aminosäure zum ursprünglichen Val nicht genügend direkte Angriffspunkte für kleine Moleküle. Deshalb lag der Fokus bei den in Kapitel 3.3.1 designten Inhibitoren in der Maximierung der Affinität zu KIT, um eine verbesserte Inhibition zu erreichen. Mit dem symmetrischen Aufbau und durch die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung des Scharnierregion-bindenden Motivs von **7f** zu den KIT-Varianten ist dies auch gelungen. Dennoch wäre eine weitere Erhöhung der Affinität zu den klinisch schwer adressierbaren KIT-Varianten KIT^{D816H} und KIT^{V559D/V654A} von großem Interesse. Zum einen ist durch die Maximierung der Verweildauer am Zielprotein durch potentiell kovalent bindende Inhibitoren die Möglichkeit gegeben, eine weitaus geringere Dosis anzuwenden, um den gewünschten inhibitorischen Effekt zu erreichen. Dies ist im Hinblick auf die schwerwiegenden, dosisabhängigen Nebenwirkungen der Parentalverbindung Ponatinib erstrebenswert. Zum anderen kann durch die Adressierung eines spezifischen nukleophilen Aminosäurerestes, welcher an dieser Stelle nicht konserviert ist, durch eine entsprechende Positionierung des elektrophilen *warhead* im Molekülgerüst Selektivität zu anderen Kinasen erzeugt werden. Die Strukturanalyse der KIT-KD führte zur Identifizierung von vier in der KD befindlichen Cysteinen. Von diesen kommen Cys788 und Cys809 aufgrund ihrer Zugänglichkeit und vermeintlichen Reaktivität für die Adressierung durch einen mit einem Elektrophil dekorierten ATP-kompetitiven Inhibitor in Frage (Abbildung 31A). Für die in dieser Arbeit vorgenommenen initialen Studien zur kovalenten Adressierung von KIT wurde der Fokus auf die Adressierung von Cys788 gelegt. Dieses Cystein ist in der *back pocket* lokalisiert und nur in der inaktiven Konformation zugänglich. Die Ko-Kristallstruktur von Ponatinib im Komplex mit KIT^{wt} (pdb 4u0i) weist auf eine räumliche Nähe des Methylpiperazin-Motivs von Ponatinib zu Cys788 hin. Leproult *et al.* synthetisierten 2011 Imatinib-basierte kovalente Inhibitoren zur Adressierung von Cys814/Cys788 in der *back pocket* von PDGFR und KIT.²⁶² Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass der Austausch des Methylpiperazin-Motivs Imatinibs durch ein Chloroacetamid in einer kovalenten Modifikation von Cys788 resultierte.²⁶³

Die Substitution des Methylpiperazins in den in Kapitel 3.3.1 vorgestellten Typ II-Inhibitoren (z. B. **8b**) sollte durch entsprechende Modifikation mit einem Elektrophil ebenfalls zu einer kovalenten Bindungsknüpfung zu dem in der inaktiven Konformation Lösungsmittel-exponierten Cys788 in der Lage sein.

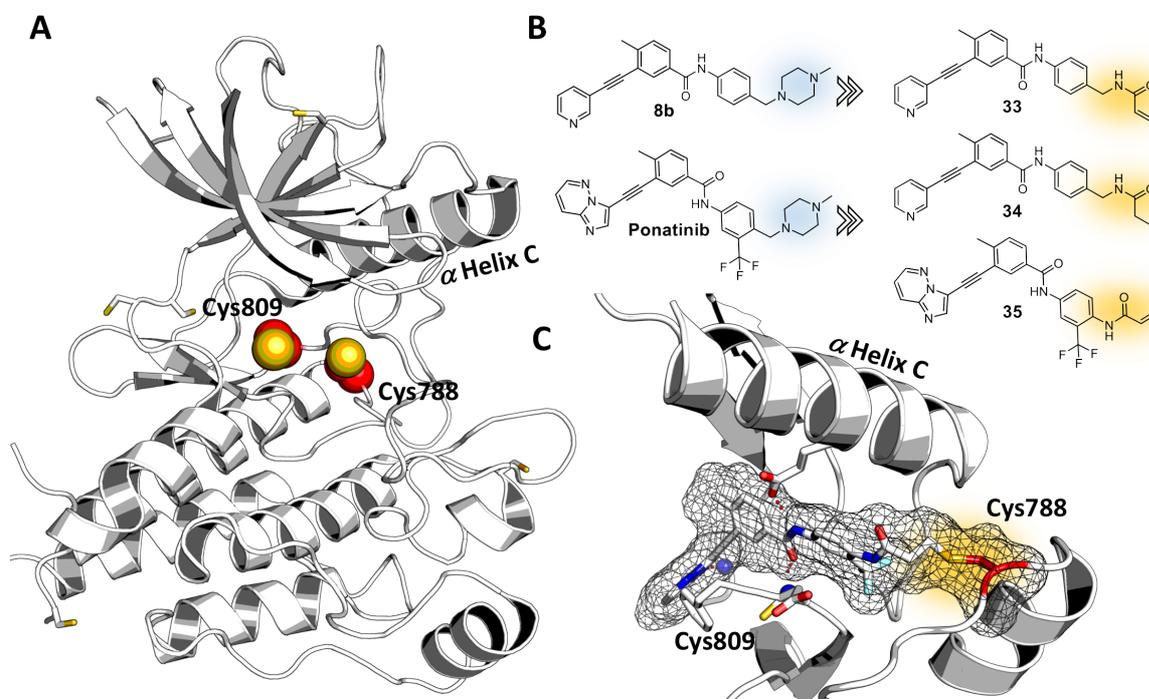


Abbildung 31A) Native Cysteinreste im aktiven Zentrum von KIT, die potentiell mit kovalent bindenden Liganden modifiziert werden könnten. Cys809 und Cys788 sind Sphären (rot: Kohlenstoff, gelb: Schwefel) dargestellt. **B)** Entwickelte Moleküle für die potentiell kovalente Adressierung von KIT sowie ein reversibles Analogon (**34**). Die potentiell kovalent bindenden organischen Moleküle sind mit einem elektrophilen *warhead* dekoriert, der für die kovalente Adressierung von Cys788 positioniert ist. **C)** Kovalentes Docking der Ponatinib-basierten Verbindung **35**.

Basierend auf der strukturellen Analyse der vorhandenen Kristallstrukturen von KIT (PDB 1t46, 1t45, 3g0e, 3g0f und 4u0i) und den von Leproult *et al.*²⁶³ publizierten Ergebnissen wurde im Rahmen der Masterarbeit von Jasmin Krüll¹⁹⁰ Substanz **33** rational design. **33** wurde vom reversiblen Molekül **8b** abgeleitet, welches aufgrund seiner guten synthetischen Zugänglichkeit und seines Imatinib-ähnlichen Inhibitionsprofils gegenüber KIT^{wt} (**8b**: 3.3 nM vs. Imatinib: 16.4 nM) ausgewählt wurde (Abbildung 31B). Das Methylpiperazin-Motiv von **8b** sollte hierfür durch einen Michael-Akzeptor (Elektrophil) in Form eines Acrylamid-Motivs ersetzt werden. Docking-Studien mit der designten Verbindung **33** deuteten darauf hin, dass diese Substitution eine kovalente Adressierung von Cys788 ermöglichen könnte.

Prinzipiell kann die kovalente Modifikation von Proteinen durch niedermolekulare organische Moleküle durch Hemiketalausbildung, Alkylierung, Acylierung, Disulfidbrückenbindung, Metallbindung, die Pinner-Reaktion und Michael-Addition erreicht werden.²⁶⁴ Schwach reaktive Michael-Akzeptoren wie Acrylamid und dessen Derivate haben sich aufgrund ihrer Eigenschaften als favorisierte *warhead* in TCIs für die Adressierung von Cysteinen in Proteinkinasen herausgestellt.^{257, 265} Acrylamide weisen eine niedrige intrinsische Reaktivität in Lösung auf (Minimierung des *off-target*-Effekts) und werden deshalb im Vergleich zu reaktiveren Elektrophilen wie Chloroacetamiden bevorzugt als *warhead* eingesetzt.²⁶⁵

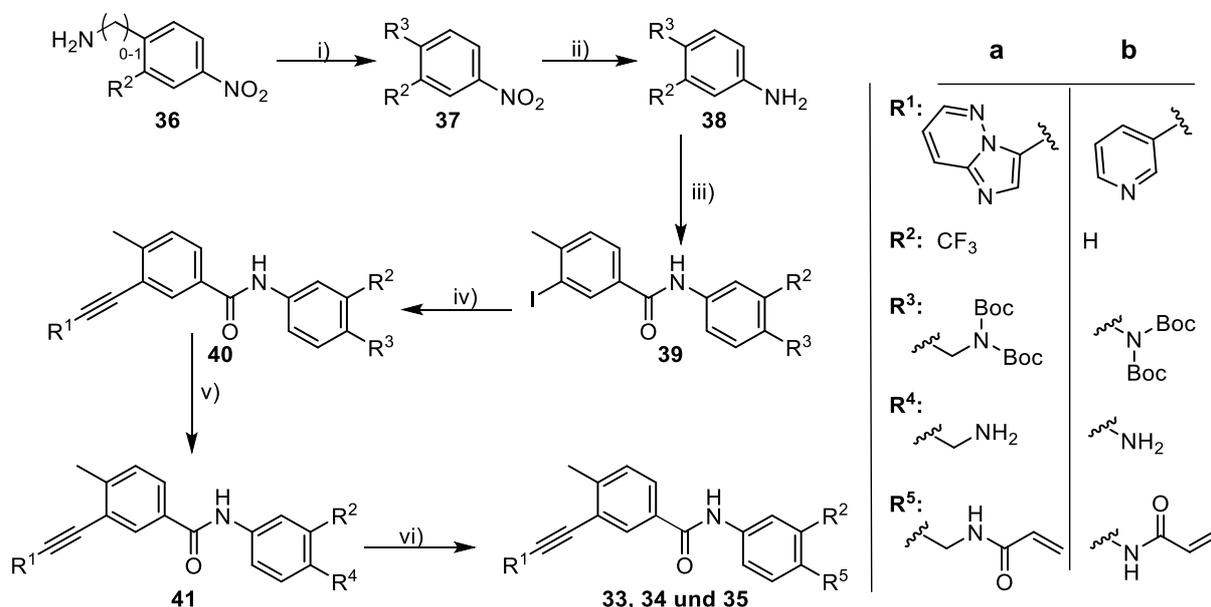
Mit dem Hintergrundwissen, dass sowohl Imatinib als auch Verbindung **8b** gegenüber den Sekundärmutationen und der D816H-Mutation in KIT ihre inhibitorische Aktivität verlieren, sollte ein auf dem Ponatinib-Grundgerüst basierendes, irreversibel bindendes Molekül entwickelt werden. Auch hier demonstrierte die Positionierung des Elektrophils anstelle des Methylpiperazin-Motivs in Dockingstudien eine ausreichende Nähe und entsprechende Orientierung, um Cys788 zu erreichen. Das kovalente Docking der strukturbasiert designten Verbindung **33** deutet darauf hin, dass die Positionierung des Acrylamids für eine kovalente Bindungsknüpfung mit Cys788 in einer verkürzten Variante favorisiert sein könnte. Aus diesem Grund wurde die Ponatinib-basierte Variante **35** ohne eine Methylengruppe zwischen dem Acrylamid und dem restlichen Grundgerüst designt (Abbildung 31B). Auch hier suggerierten Docking-Versuche eine potentielle kovalente Bindungsknüpfung zwischen **35** und Cys788 in KIT^{wt} (Abbildung 31C). Nachfolgend sollten die designten Verbindungen synthetisiert, biochemisch und zellulär evaluiert und die kovalente Bindungsknüpfung durch massenspektrometrische Analysemethoden nachgewiesen werden.

4.2.1 Synthese kovalenter KIT-Inhibitoren

Die Synthese der in 4.2 vorgestellten Verbindungen erfolgte durch Kombination literaturbekannter Synthesevorschriften,^{162, 198, 200-204, 266} die dahingehend aufeinander abgestimmt wurden, in möglichst wenigen Syntheseschritten die gewünschten Moleküle zu erhalten. Die mit einer *warhead* dekorierte Verbindung **33** und ihr reversibles Pendant **34** wurden von Jasmin Krüll im Zuge ihrer Masterarbeit synthetisiert.¹⁹⁰ Als vermeintlich optimierte Version dieser Moleküle wurde **35** strukturbasiert designt und synthetisiert (Schema 11)

Ausgehend von den Nitroanilinderivaten **36a, b** wurde zunächst eine Boc-Schätzung der Anilinfunktion durchgeführt,²⁶⁶ um eine selektive Amidkupplung mit 3-Iodo-4-methylbenzoesäure und der zuvor reduzierten Nitrogruppe zu gewährleisten. Die Nitrogruppe in den Molekülen **37a, b** wurde über eine Palladium (Pd/C)-katalysierte Hydrierung in die korrespondierenden Aminogruppen **38a, b** überführt. Die anschließende Amidkupplung mit 3-Iodo-4-methylbenzoesäure lieferte die Boc-geschützten Amide **39a, b** in Ausbeuten von 48-74 %.

Schema 11: Darstellung der potentiell irreversibel bindenden Moleküle **33, 35** sowie des reversiblen Pendant zu **33** (**34**).^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) DMAP, Et₃N, Boc-Anhydrid, THF, 5 h, reflux (89 %); (ii) Pd/C, H₂, EtOH, 12 h (98 %); (iii) HATU, DIPEA, DCM, DMAP, 3-Iodo-4-methylbenzoesäure, rt, 16 h (48-74 %); (iv) Alkin, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, (*i*-Pr)₂NH, TBAF, ACN, 80 °C, 16 h (14-45 %); (v) 10 % TFA, DCM, 0 °C-rt, 1 h (>98 %); (vi) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, -78 °C-rt, 5 h (14-45 %).

Die Sonogashira-Reaktion wurde mit den zuvor synthetisierten Alkinbausteinen **21d** und **30** unter den etablierten Bedingungen der *in situ*-Desilylierung mit TBAF durchgeführt.²²¹ Auch hier ergaben sich erhebliche Schwierigkeiten bei der Aufreinigung der Produkte **40a, b**. Die Aufreinigung konnte mit den in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Aufreinigungsschritten erreicht werden. **40a, b** konnten in moderaten Ausbeuten von 2-65 % erhalten werden. Durch Zugabe von 10 %-iger TFA in DCM konnte die Boc-Schutzgruppe entfernt und die Amine **41a, b** erhalten werden (Ausbeute >95 %). Die Umsetzung der Amine **41a, b** mit Acryloylchlorid bzw. Propionylchlorid ergab die gewünschten Endprodukte **33** (14 %) und **35** (45 %), sowie das reversible Pendant **34** (24 %). Die moderaten Ausbeuten resultieren aus einer nicht vollständigen Reaktion der Amine **41a, b**. Auch nach der Zugabe von bis zu zehn Äquivalenten der reaktiven Säurechloride sowie einer Erhöhung der Reaktionszeit (bis 5 h) und der Reaktionstemperatur (bis rt) konnte kein Fortschreiten der Reaktion beobachtet werden. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde auf eine weitere Zugabe der Säurechloride verzichtet und die gewünschten Produkte **33, 34** und **35** durch HPLC von den Edukten getrennt. Die erhaltenen Produkte wurden im nächsten Schritt hinsichtlich biochemischer Aktivität auf den KIT-Varianten und VEGFR2 sowie auf den GIST-Zelllinien untersucht.

4.2.2 Biochemische Charakterisierung

Die Moleküle **33, 34** und **35** wurden mit dem bereits beschriebenen KinEASE™ HTRF-Assaysystems²²⁵ auf ihre inhibitorische Aktivität auf KIT^{wt}, KIT^{D816H}, KIT^{V559D/V654A}, KIT^{V559D/T670I} und VEGFR2 untersucht. Als Referenzverbindungen wurden die kommerziell erhältlichen GIST-Therapeutika Imatinib, Sunitinib, Regorafenib und Ponatinib eingesetzt. Eine reine IC₅₀-Wert-Bestimmung gibt keine Auskunft über den Bindungsmodus der getesteten Moleküle. Aus diesem Grund wurden in weiterführenden Untersuchungen die kinetischen Parameter nach Krippendorf *et al.*²⁶⁷ ermittelt sowie MS-Experimente durchgeführt.

Tabelle 19: IC₅₀-Bestimmung der Substanzen **33**, **34** und **35** sowie der entsprechenden Referenzverbindungen auf den Zielkinasen. ^aNicht-inhibierend bei einer 20 μM Inhibitor-Konzentration. *

Verbindung	IC ₅₀ [nM]				
	KIT ^{wt}	KIT ^{V559D/T670I}	KIT ^{D816H}	KIT ^{V559D/V654A}	VEGFR2
33 **	9.5 ± 3.7	a	a	a	299.3 ± 49.2
34 **	28.7 ± 20.5	a	a	a	513.3 ± 62.6
8b **	3.3 ± 1.8	a	a	a	78.0 ± 20.8
35	1.0 ± 0	154.9 ± 16.8	28.7 ± 0.6	a	1.5 ± 0
Ponatinib	1.7 ± 0.7	17.4 ± 9.8	20.0 ± 2.2	136.0 ± 39.9	4.3 ± 0.1
Sunitinib	1.1 ± 0.8	99.6 ± 27.8	616.8 ± 14.9	124.9 ± 24.6	53.5 ± 0.9
Regorafenib	6.1 ± 1.5	2153.3 ± 744.4	239.1 ± 168.9	a	2.9 ± 0.8
Imatinib	16.4 ± 3.1	a	a	a	a

*Die ermittelten IC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die IC₅₀-Werte wurden mit Unterstützung von M. Sc. Marina Keul bestimmt.

Die Verbindungen **33 und **34** sind im Rahmen der Masterarbeit von Jasmin Krüll¹⁹⁰ synthetisiert worden.

Der Vergleich der reversiblen Verbindung **8b** zu der abgeleiteten irreversiblen Verbindung **33** zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität zu KIT^{wt} (IC₅₀ = **8b**: 3.3 nM vs. **33**: 9.5 nM). Das reversible Pendant **34** verhält sich bezüglich seiner Aktivität gegenüber KIT^{wt} ähnlich (IC₅₀ = 28 nM). Das vermeintlich kovalent bindende Molekül **33** adressierte analog zu **8b** die KIT-Mutanten KIT^{D816H}, KIT^{V559D/V654A} und KIT^{V559D/T670I} nicht. Für VEGFR2 zeigte sich eine verringerte Aktivität von **33** und **34** (IC₅₀ = 300 nM bzw. 500 nM) im Vergleich zu **8b** (78 nM). Diese Ergebnisse korrespondieren mit der Beobachtung für die Oxadiazol-Derivate (vgl. Kapitel 3.3.4) hinsichtlich der Aktivität gegenüber VEGFR2. Die potente Inhibition von VEGFR2 scheint im Vergleich zu KIT^{wt} ein entweder stark mit der *back pocket* oder der Scharnierregion interagierendes Strukturmotiv zu benötigen. **33** und **34** besitzen weder die CF₃- noch den Methylpiperazin-Substituenten in der *back pocket* und können über den Pyridinstickstoff nur eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung zur Scharnierregion ausbilden. Diese Beobachtung lässt sich nicht durch eine vergleichende strukturelle Analyse der aktiven Zentren von VEGFR2 und KIT^{wt} erklären. Wie in Kapitel 3.3.2 untersucht, unterscheidet diese sich in nur wenigen AS, die für die Interaktion mit den Ponatinib-basierten Molekülen nicht entscheidend sind. Die Beobachtungen hinsichtlich VEGFR2 müssen in Bezug auf die globale Konformation der gesamten KD und die konformationellen Änderungen bei Ligandenbindung im Vergleich zu KIT untersucht werden.

Die Substitution des Methylpiperazins durch das Acrylamid-Motiv in den Molekülen **33** bewirkt wahrscheinlich den Verlust der Interaktionen (Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Bindung) zwischen Ile789 und His790 von KIT zum positiv geladenen methylierten Stickstoff des Piperazinrings (siehe Docking Abbildung 31C). Dies schwächt mit hoher Wahrscheinlichkeit die Wechselwirkungen der potentiell kovalenten Verbindungen mit der *back pocket*, was sich im Aktivitätsverlust von VEGFR2 widerspiegelt. Die Inhibition von KIT^{wt} scheint nicht im Speziellen von dieser Interaktion abhängig zu sein.

Die Bedeutung der Interaktion zwischen der *back pocket* KITs und dem methylierten Stickstoff des Methylpiperazins zeigt sich deutlich in dem Aktivitätsprofil von Verbindung **35**. Das potentiell kovalent bindende Ponatinib-Derivat **35** demonstriert im Vergleich zu seiner Parentalverbindung eine neunfach niedrigere Aktivität gegenüber KIT^{V559D/T670I} (IC₅₀ = **35**: 155 nM vs. Ponatinib: 17 nM) und keine detektierbare Aktivität gegenüber KIT^{V559D/V654A}. Für KIT^{D816H}, KIT^{wt} sowie VEGFR2 entsprechen die IC₅₀-Werte von **35** denen der Parentalverbindung (IC₅₀ KIT^{D816H} = **35**: 29 nM vs. Ponatinib: 20 nM; IC₅₀ KIT^{wt} = **35**: 1 nM vs. Ponatinib: 2 nM; IC₅₀ VEGFR2 = **35**: 2 nM vs. Ponatinib: 4 nM). Für die Mutanten KIT^{V559D/T670I} und KIT^{V559D/V654A} wird ein zusätzlich zur Primärmutation aktivierender Mechanismus durch die Stabilisierung des regulatorischen Rückgrats und damit der aktiven Konformation vermutet.^{188, 268} Die Mutation in KIT^{V559D/V654A} führt zudem zu einer Verringerung der van-der-Waals-Interaktionen zwischen Kinase und Inhibitor.¹⁵⁷ Die aktivierende Wirkung der Aktivierungsschleifenmutationen im Codon kodierend für D816 in KIT beruht auf der Destabilisierung der Bindung der Juxtamembran und der Erhöhung der Affinität für ATP.⁹⁷⁻⁹⁸ Die beobachtete inhibitorische Aktivität von **35** auf den einzelnen KIT-Mutanten deutet darauf hin, dass sich diese in ihrer Qualität so unterscheidet, dass ein Aktivitätsunterschied zwischen den einzelnen Mutanten für den Interaktionsverlust zwischen fehlendem Methylpiperazin-Motiv und der *back pocket* deutlich ermittelt werden kann. Im Vergleich zwischen Ponatinib und **35** wird deutlich, dass der Verlust der Interaktionen von Methylpiperazin zur *back pocket* für KIT^{wt}, KIT^{D816H} und VEGFR2 keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität von **35** hat, während für KIT^{V559D/T670I} und KIT^{V559D/V654A} ein signifikanter Aktivitätsverlust detektiert werden konnte (IC₅₀ KIT^{V559D/T670I} = **35**: 155 nM vs. Ponatinib: 18 nM; IC₅₀ KIT^{V559D/V654A} = **35**: keine Inhibition vs. Ponatinib: 136 nM;).

Da sich **33** und **35** vor allem in den durch den CF₃-Substituenten zur Zielkinase ausgebildeten Interaktionen unterscheiden, rührt der Unterschied im Aktivitätsprofil von **35** gegenüber den untersuchten KIT-Mutanten und VEGFR2 vermutlich aus dessen zusätzlichen Interaktionen mit der Subtasche in der *back pocket* her (siehe Kapitel 3.3.4.). Die Signifikanz der CF₃-Gruppe für die Inhibition der KIT-Varianten wurde schon in den vorherigen Kapiteln herausgestellt. Die Modifizierung der Inhibitoren mit dem Acrylamid-*warhead* führte bei keiner der hier untersuchten KIT-Mutanten sowie VEGFR2 zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität (vgl. Tabelle 19). Eine Selektivität zu VEGFR2 bei gleichzeitigem Erhalt von inhibitorischer Aktivität gegenüber den KIT-Mutanten konnte nicht beobachtet werden. Im Nachfolgenden sollten **33** und **35** auf ihre antiproliferative Wirkung in GIST-Zellen untersucht werden.

4.2.3 Zelluläre Charakterisierung^{VII}

Die Verbindungen **33**, **34** und **35** wurden mit der in Kapitel 3.3.5 beschriebenen Methodik auf ihre Aktivität in humanen GIST-Zellen untersucht. Als Referenzverbindungen wurden die GIST-Therapeutika Imatinib, Sunitinib, Regorafenib und Ponatinib eingesetzt.

Tabelle 20: GI₅₀-Bestimmung der Substanzen **33**, **34** und **35** sowie den entsprechenden Referenzverbindungen auf den Zielkinasen. ^aNicht-inhibierend bei einer 20 μM Inhibitor-Konzentration. *

Verbindung	GI ₅₀ [nM]				
	GIST-48B	GIST-T1	GIST-T1-T670I	GIST-T1-D816E	GIST430-V654A
33 ^{**}	a	806 ± 156	15770 ± 5981	17424 ± 1908	13897 ± 4316
34 ^{**}	a	1659 ± 235	13445 ± 9271	a	17571 ± 1806
8b ^{**}	a	150 ± 37	6352 ± 1825	9610 ± 1089	4032 ± 97
35	a	112 ± 25	2450 ± 433	1728 ± 75	3719 ± 2142
Ponatinib	2000 ± 450	17 ± 8	40 ± 19	106 ± 6	149 ± 36
Sunitinib	a	40 ± 4	90 ± 36	5880 ± 1991	98 ± 37
Regorafenib	a	130 ± 77	380 ± 48	1350 ± 845	3000 ± 814
Imatinib	a	40 ± 19	a	a	1100 ± 814

*Die ermittelten IC₅₀-Werte sind Mittelwerte ± zugehöriger Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen in Duplikaten durchgeführten Experimenten. Die GI₅₀-Werte wurden mit Unterstützung von M. Sc. Marina Keul bestimmt.

Die Verbindungen **33 und **34** sind im Rahmen der Masterarbeit von Jasmin Krüll¹⁹⁰ synthetisiert worden.

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

Im zellulären Experiment zeigten **33** und **34** keine nennenswerte Inhibition der Zelllinien GIST-T1-T670I, GIST-T1-D816E und GIST430-V654A. Die GI_{50} -Werte korrelieren mit den ermittelten IC_{50} -Werten (vgl. Tabelle 19). Die mit den Elektrophil dekorierte Verbindung **33** ist im Vergleich zum reversiblen Analogon **34** doppelt so effektiv in Bezug auf die Reduktion der Zahl der GIST-T1-Lebendzellen (806 nM vs. 1659 nM). Diese Beobachtung könnte auf eine kovalente Modifikation von KIT durch **33** hindeuten.

Die in der biochemischen Evaluation aktivste Verbindung **35** weist im zellulären System einen Aktivitätseinbruch in den Zelllinien GIST-T1-T670I ($GI_{50} = 2450$ nM vs. $IC_{50} = 155$ nM (16-fach)) und GIST-T1-D816E ($GI_{50} = 1730$ nM vs. $IC_{50} = 29$ nM 860-fach)) auf. Für die Zelllinie GIST430-V654A konnte im Gegensatz zur biochemischen Evaluierung (keine Inhibition) ein GI_{50} -Wert von ca. 4 μ M bestimmt werden. Auch im zellulären System weist **35** im Vergleich zu **33** und **34** die höchste Potenz auf den untersuchten Zelllinien auf. Dies resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den Wechselwirkungen der CF_3 -Gruppe im *back pocket* bindenden Bereich des Inhibitors zur Kinase.

Die ermittelten GI_{50} -Werte für **35** und **33** wiesen einen vergleichbaren Trend innerhalb der behandelten Zelllinien entsprechend dem im biochemischen Experiment erhobenen Daten auf. Die Abnahme der Aktivität gegenüber allen GIST-Zelllinien der von **8b** und Ponatinib abgeleiteten Verbindungen **33**, **34** und **35** resultiert vermutlich aus dem Verlust des Methylpiperazin-Motivs (bspw. $GI_{50} = 150$ nM (**8b**) vs. 806 nM (**33**) und 1659 nM (**34**) in GIST-T1; $GI_{50} = 17$ nM (Ponatinib) vs. 112 nM (**35**) in GIST-T1). Der Vergleich der Verbindungen **8b** mit **33** und Ponatinib mit **35** zeigt, dass der Ersatz dieses Strukturmotiv durch den Michael-Akzeptor den prominenten Unterschied zwischen den Molekülen darstellt. Das Methylpiperazin interagiert nicht nur mit KIT über Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen, sondern fungiert auch als Löslichkeitsvermittelnde Gruppe. Der Verlust dieser Wechselwirkungen sowie eine mögliche verringerte Löslichkeit im wässrigen Zellmedium, welche eine verminderte Absorption der Verbindungen in die Zellen bewirkt, könnte die Abnahme der antiprolerativen Wirkung von **33**, **34** und **35** im Vergleich zu **8b** und Ponatinib erklären.

Als Negativkontrolle wurde die KIT-unabhängige Zelllinie GIST-48B herangezogen. Insgesamt wiesen alle getesteten Verbindungen ein vergleichbares *off-target*-Profil auf und zeigten keine signifikante Abnahme der Proliferation in dieser Zelllinie.

Für eine weitere Charakterisierung des inhibitorischen Effekts auf KIT wurde eine Western Blot Analyse von **33**, **34** und **35** auf der am effektivsten adressierten Zelllinie GIST-T1 durchgeführt (Abbildung 32). Substanz **35** reduziert die zelluläre Menge an phosphoryliertem KIT (KIT Y703 (Autophosphorylierungs-stelle)). Die Phosphorylierung der im KIT-Signaltransduktionsweg nachgeschalteten Kinasen Akt (pS473) und MAPK (pT202/pY204) wird ebenfalls in konzentrationsabhängiger Weise von **35** inhibiert. Bei einer Konzentration von 100 nM zeigte **35** eine starke Inhibition der Signalkaskade in GIST-T1 Zellen. Diese Beobachtung korreliert mit den zellulären Daten für **35** ($GI_{50} = 112$ nM). Die Verbindungen **33** und **34** reduzierten die zelluläre Menge an pKIT, pAkt, und pMAPK in GIST-T1 bei einer Konzentration von 1 μ M, was ebenso mit den ermittelten zellulären Daten korreliert (vgl. Tabelle 20). Für alle Substanzen wurde eine konzentrationsabhängige Verringerung der Zellviabilität der GIST-T1-Zellen beobachtet. Die Western Blot Analyse steht im Einklang mit den zellulär ermittelten Ergebnissen.

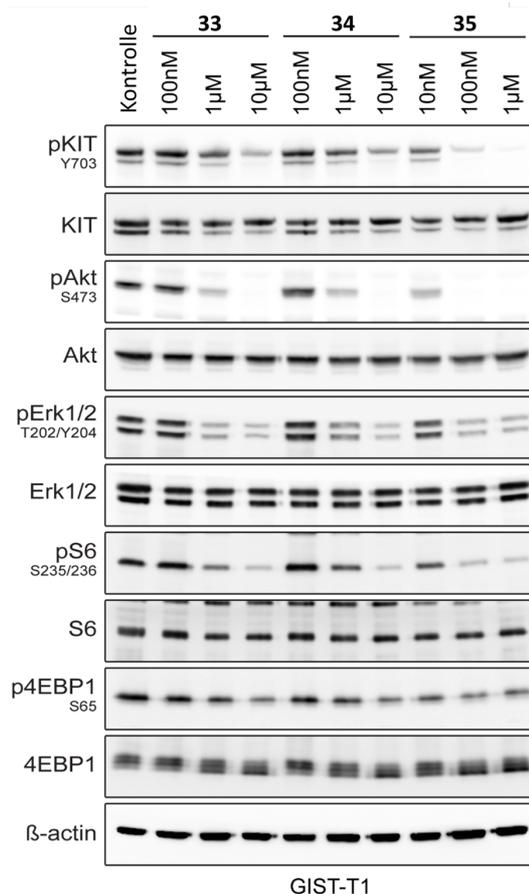


Abbildung 32^{VIII}: A, C) Western-Blot nach 3 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von **33**, **34** und **35** (+DMSO-Kontrolle) in GIST-T1. Die Western-Blots wurden im Rahmen der Kooperation mit der AG Bauer von Julia Ketzner angefertigt.

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

Über die Bestimmung der GI_{50} - und IC_{50} -Werte kann eine Aussage über die Aktivität der synthetisierten Substanzen auf den untersuchten Zielproteinen getroffen werden. Aus der Analyse der ermittelten Aktivitäten der Substanzen kann eine bestimmte Struktur-Aktivitätsbeziehung abgeleitet werden, die zur chemischen Optimierung der untersuchten Substanzen herangezogen werden kann.

Es ist allerdings nicht möglich, Auskunft über die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu den getesteten Proteinen zu geben. Um diese Fragestellung zu klären, wurden die Methode der massenspektrometrischen Analyse sowie die Ermittlung der kinetischen Parameter K_i und k_{inakt} im folgenden Kapitel angewendet, um den Bindungsmodus von **33** und **35** in Bezug auf die kovalente Bindungsknüpfung zu untersuchen.

4.2.4 Massenspektrometrische Evaluierung

Die potentielle kovalente Bindungsknüpfung von **33** und **35** sollte durch massenspektrometrische Experimente (MS-Experimente) mit der isolierten KIT^{wt}-KD analysiert werden. Zusätzlich wurde **34** als reversible Kontrollverbindung untersucht. KIT^{wt} wurde aufgrund der guten Aktivität der Substanzen ($IC_{50} = 10$ nM (**31**), 28 nM (**32**) und 1 nM (**33**)) für die anfänglichen Studien gewählt. Dazu wurde das Protein mit einem 5-fachen molaren Überschuss an Inhibitoren inkubiert, bevor die kovalente Modifikation *via* Elektrospray-Ionisation (ESI) Massenspektrometrie untersucht wurde (Abbildung 33). Die erhaltenen Spektren wurden mit Messungen des Apoproteins in Anwesenheit von DMSO als Negativkontrolle verglichen und resultierende Massendifferenzen berechnet. Die Inkubation von Protein und Liganden erfolgte unter Variation der Parameter Inkubationszeit und pH-Wert. Auf diese Weise sollten neben der Verifizierung der kovalenten Bindungsformation Hypothesen hinsichtlich der Reaktivität des Cys788 sowie eine Abschätzung des Reaktionsfortschritts getroffen werden.

Für die initiale Untersuchung des Bindungsmodus der Verbindungen sollte zunächst KIT^{wt} genutzt werden. KIT^{wt} wurde von M. Sc. Patrik Wolle exprimiert und gereinigt. Da GST (Glutathion-S-Transferase) nach der Aufreinigung nicht vollständig entfernt werden konnte, wurde die Inhibition von GST unter den gleichen Parametern untersucht, um sicherzustellen, dass die zu untersuchenden Moleküle nicht durch die Reaktion mit GST abgefangen werden. Eine Modifizierung von GST konnte auch nach 24 h bei allen untersuchten Bedingungen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). **35** und **33** scheinen nicht mit GST unter Knüpfung einer kovalenten Bindung zu reagieren.

Es kann also angenommen werden, dass die untersuchten Moleküle in den hier verwendeten Konzentrationen (5-fach molarer Überschuss) nicht mit GST reagieren. Diese Verunreinigung kann damit in der weiteren Diskussion der Ergebnisse vernachlässigt werden.

Zu Beginn wurden alle Reaktionsbedingungen mit der auf KIT^{wt} potentesten Verbindung **35** evaluiert. Bei einem pH-Wert von 7.5 ließ sich keine kovalente Modifikation des Proteins in einem Zeitraum von 2-24 h und einer Temperatur von 4 °C feststellen. Die Anwendung dieser Bedingungen bei einem pH-Wert von 8 zeigte nach 24 h Inkubationszeit eine Massenzunahme von 469 Da verglichen mit der Negativkontrolle (KIT^{wt} + DMSO), welche dem Molekulargewicht von **35** entspricht. Den dekonvolutierten ESI-MS-Spektren (Abbildung 33) ist zu entnehmen, dass die kovalente Modifikation durch den Inhibitor nicht vollständig verläuft.

Der Vergleich der relativen AUC (*Area Under the Curve*) vom Apoprotein und modifiziertem Protein zeigt einen relativen Umsatz von ca. 25 % nach einer Inkubationszeit von 24 h. Bei einem pH-Wert von 8.5 konnte bereits nach 2 h eine Massenzunahme entsprechend dem Molekulargewicht von **35** detektiert werden. Zwischen 8 h bis 24 h Inkubationszeit konnte für pH 8.5 ein Fortschritt der Reaktion beobachtet werden. Im Vergleich zum Apoprotein konnte nach 24 h bei pH 8.5 durch den Vergleich der AUC ein relativer Umsatz von ca. 45 % detektiert werden. Nach Inkubation mit der potentiell irreversibel bindenden Substanz **35** zeigte sich bei einem pH von 8-8.5 eine signifikante, wenn auch nicht vollständige Modifizierung von KIT^{wt}. Die detektierte Massenzunahme konnte jeweils dem einfachen Addukt der Kinasen im Komplex mit **35** zugeordnet werden. Die beobachtete unvollständige Modifizierung von KIT^{wt} kann viele Ursachen haben. Die Addition eines α,β -ungesättigten Elektrophils an die Thiofunktion von Cysteinen ist abhängig von Temperatur, pH-Wert, der elektronischen Konfiguration des Elektronen-Akzeptor-Donor-Paares sowie der Mikroumgebung des Nukleophils.²⁶⁹ Die Erhöhung des pH-Wertes auf 8.5, um eine Modifikation des Proteins mit **35** zu erreichen, deutet darauf hin, dass das adressierte Cystein im isolierten Protein im gegebenen Puffersystem und der vorherrschenden Temperatur (4 °C) nicht ausreichend nukleophil für die Additionsreaktion ist. Durch die Erhöhung des pH-Wertes über 8 wird die Reaktivität der Thiofunktion des Cysteins durch Deprotonierung und Bildung des Thiolanions erhöht.

Um eine Adressierung bei physiologischem pH zu erreichen, müsste **35** mit einem reaktiveren Elektrophil dekoriert werden. Eine Option wäre der von Leproult *et al.* verwendete Chloroacetamid-*warhead*.²⁶³

Die zuvor für **35** ermittelten optimalen Bedingungen zur Detektion der Adduktbildung zwischen Ligand und Kinase wurden auf **33** und **34** übertragen. Wie erwartet wurde für den als reversibles Gegenstück synthetisierten Liganden **34**, welcher keinen elektrophilen *warhead* besitzt, keine Modifizierung der Kinase festgestellt. Die theoretisch potentiell kovalent bindende Verbindung **33** zeigte ebenfalls keine Adduktbildung. Diese Substanz ist mit einem um eine Methyleneinheit verlängerten Acrylamid-*warhead* ausgestattet, dessen Raumforderung und die damit verbundene Orientierung in der *back pocket* für die kovalente Bindungsknüpfung unvorteilhaft zu sein scheint (Abbildung 33). Zudem könnte das Fehlen des CF₃-Substituenten in **35** dazu führen, dass aufgrund der Abwesenheit des polarisierenden Effekts (-I-Effekt) dieses Substituenten die Reaktivität des Acrylamids herabsetzt ist, was eine kovalente Bindungsknüpfung zwischen **33** und der Kinase benachteiligen könnte.

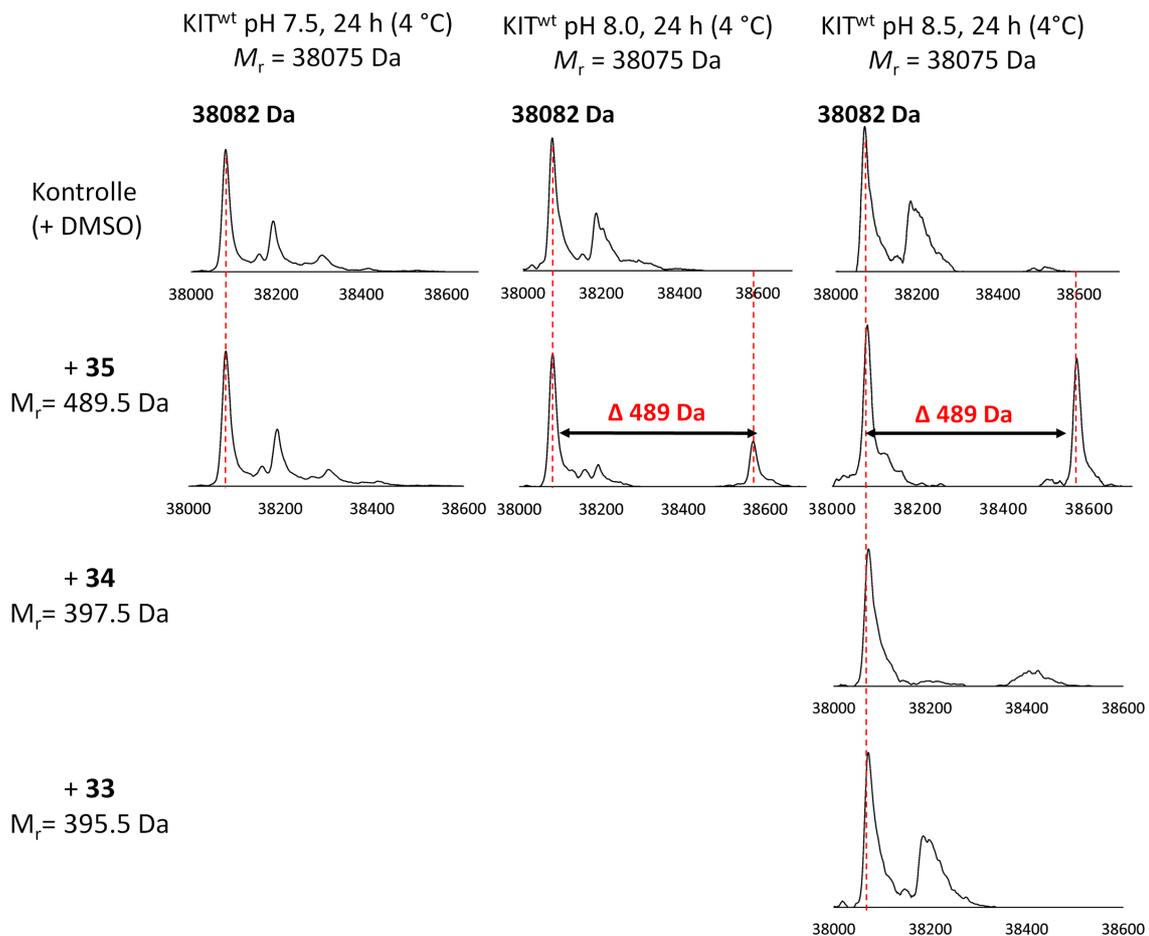


Abbildung 33: Identifikation von Protein-Ligand-Addukten via MS-Spektroskopie. Dekonvolutierte MS-Spektren von KIT^{wt} bei den pH-Werten 7.5, 8 und 8.5 für eine Inkubationszeit von 24 h und einer Temperatur von 4 °C in Abwesenheit (DMSO-Kontrolle) und Anwesenheit von **33**, **34** und **35**.

4.2.5 Tandem-Massenspektrometrie

Nachdem eine kovalente Modifikation von Kit^{wt} durch **35** via MS-Spektroskopie identifiziert werden konnte, sollte die Bestimmung der genauen Position der durch den Liganden modifizierten Aminosäure erfolgen. Die identifizierten Protein-Ligand Addukte sollten diesbezüglich durch MS/MS Experimente untersucht werden. Dazu wurden die bei einem pH Wert von 8.5 und einer Inkubationszeit von 24 h erhaltenen KIT^{wt}-Ligand-Komplex-Proben mit **35** (siehe Kapitel 4.2.4) zunächst mit der Protease Trypsin verdaut. Die dadurch generierten Peptide wurden mittels HPLC und Tandem-MS-Experimenten analysiert. Trotz mehrerer identisch generierter Versuchsansätze konnte nur eine unvollständige Sequenzabdeckung durch die Peptidfragmente erhalten werden, sodass nicht alle Cystein-tragenden Sequenzabschnitte aufgeklärt werden konnten. Ein ungünstiges Flugverhalten der generierten Peptidfragmente könnte diese Beobachtung erklären. Cys788-tragende Peptidfragmente konnten sowohl in der Apoproteinprobe, als auch in einer der vier Protein-Ligand-Komplex-Proben nach Inkubation mit **35** nachgewiesen werden. Allerdings konnte die Modifikation durch **35** im Rahmen der Tandem-MS-Experimente nicht bestätigt werden. Die Modifikation durch den Liganden **35** beeinflusst vermutlich das Flugverhalten der durch den Trypsinverdau generierten Peptidfragmente ungünstig, was die Detektion des entsprechenden modifizierten Fragments erschwert. Die nachgewiesenen nicht-modifizierten Peptidfragmente in den mit **35** inkubierten Proben könnten durch die Anwesenheit von Apoprotein zusätzlich zum modifizierten Protein erklärt werden (siehe Kapitel 4.2.2 und Abbildung 33).

4.2.6 Kinetische Parameter K_i und k_{inakt}

Mit der Kenntnis, dass **35** KIT^{wt} kovalent modifiziert, wurden zur vollständigen Bindungscharakterisierung von **35** die kinetischen Parameter K_i und k_{inakt} bestimmt. Der reversible Anteil der Bindungsknüpfung wird durch K_i (Affinität zum Zielprotein), der irreversible Anteil durch k_{inakt} (Komplementarität von Elektrophil und Nukleophil) reflektiert (Abbildung 34).²⁶⁰

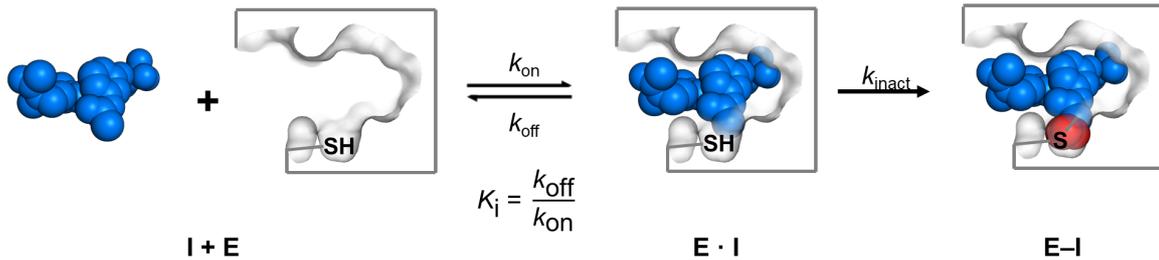


Abbildung 34: Schematische Darstellung des zweistufigen Bindungsmechanismus von kovalenten Inhibitoren (I) an Kinasen (E) mit den Parametern K_i (Quotient aus k_{off} und k_{on}), der die reversible Bindungsaffinität beschreibt, und k_{inakt} , der die Inaktivierungsrate beschreibt. (Adaptiert mit Genehmigung des Autors M. Sc. Marina Keul).

Die Bestimmung dieser Parameter erfolgt über die zeitaufgelöste Ermittlung des IC_{50} -Wertes für KIT^{wt}. Krippendorf *et al.*²⁶⁷ beschrieben den Zusammenhang zwischen K_i , k_{inakt} und der zeitabhängigen Abnahme der IC_{50} -Werte bei kovalenter Proteininhibition durch die Gleichungen 4 und 5:²⁶⁷

$$IC_{50}(t) = K_i \left(1 + \frac{[I]}{K_M} \right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta_{IC_{50}} \cdot k_{\text{inakt}} \cdot t}}{\eta_{IC_{50}} \cdot k_{\text{inakt}} \cdot t} - 1 \right) \quad (4)$$

$$\text{mit } \eta_{IC_{50}} = \frac{IC_{50}(t)}{K_i \left(1 + \frac{[I]}{K_M} \right) + IC_{50}(t)} \quad (5)$$

[I]: Inhibitorkonzentration, K_M : Michaeliskonstante, t: Zeit [min], k_{inakt} : Geschwindigkeit der kovalenten Bindungsknüpfung, K_i : Affinität zu Zielprotein.

Für **35** wurden die IC_{50} -Werte zeitaufgelöst in einem Zeitraum von 90 min bei dem pH-Wert von 7 (Standardassaybedingung) und bei einem pH-Wert von 8.5 via Cisbio KinEASETM HTRF²²⁵ Assay bestimmt. Mit den ermittelten IC_{50} -Werten und Gleichung (4) konnten durch graphische Auswertung mit XLFit die Parameter K_i und k_{inakt} abgeleitet werden. Bei einem pH-Wert von 7 konnte bei Raumtemperatur keine kovalente Inhibition von KIT^{wt} festgestellt werden (Abbildung 35). Die Durchführung des Assays bei einem pH von 8.5 indizierte eine kovalente Modifikation von KIT^{wt} durch **35**.

Es konnte ein K_i von 1.5 ± 0.2 nM und ein k_{inact} von 0.03 ± 0.01 min⁻¹ bestimmt werden. Der Vergleich der generierten Daten von **35** zu denen im Arbeitskreis bereits ermittelten Daten für den zugelassenen kovalent bindenden Drittgenerations-EGFR-Inhibitor Osimertinib (K_i (EGFR^{L858R}/EGFR^{L858R/T790M}): 1.5 ± 0.3 nM/ 1.6 ± 0.1 nM und k_{inact} (EGFR^{L858R}/EGFR^{L858R/T790M}): 0.30 ± 0.01 min⁻¹/ 0.33 ± 0.06 min⁻¹)²⁷⁰ zeigte eine vergleichbar hohe Affinität von **35** zu KIT^{wt} ($K_i = 1.5$ nM (**35**) vs. $1.5/1.6$ nM²⁷⁰ (Osimertinib)). Die Geschwindigkeit der kovalenten Bindungsknüpfung erfolgte dagegen sehr langsam im Vergleich zu Osimertinib ($k_{\text{inact}} = 0.03$ min⁻¹ vs. $0.30/0.33$ min⁻¹; ca. 10-fach langsamer). Die Effizienz der kovalenten Bindung wird durch das Verhältnis $\frac{k_{\text{inact}}}{K_i}$ determiniert und beträgt für **35** $0.3 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, was eine deutlich niedrigere Effizienz von **35** im Vergleich zu dem zugelassenen Inhibitor ($3.24/3.75 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)²⁷⁰ aufzeigt. Die niedrige Geschwindigkeit der kovalenten Bindungsknüpfung liefert einen Erklärungsansatz für den unvollständigen Umsatz von KIT^{wt} mit **35** zum erwünschten Protein-Ligand-Komplex im MS-Experiment. Durch die Durchführung der MS-Experimente bei niedrigen Temperaturen (4 °C), um die Degradation des Proteins zu verzögern, wurde die Geschwindigkeit der Bindungsknüpfung zusätzlich verlangsamt. Als Konsequenz könnte eine Inkubationszeit von 24 h, unter den gegebenen Bedingungen, ungenügend für eine vollständige Modifizierung sein.

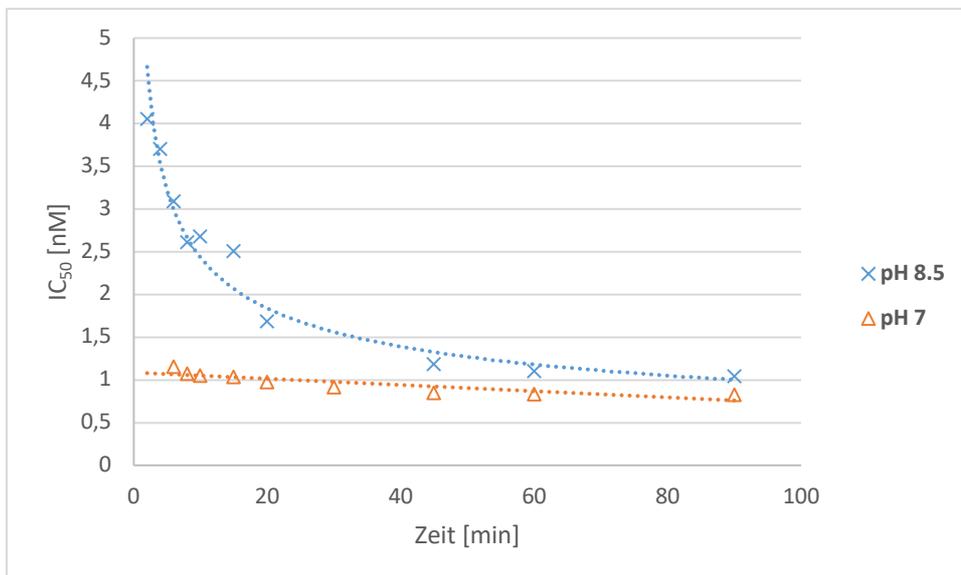


Abbildung 35: Zeitaufgelöste IC₅₀-Bestimmung von **35** bei pH 7 (orange) und pH 8.5 (blau) für KIT^{wt}.

Die Auswertung weist darauf hin, dass unter den hier genutzten Bedingungen ein reaktiveres Elektrophil vorteilhaft für eine schnellere Knüpfung der kovalenten Bindung sein könnte.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick: Kovalente KIT-Inhibitoren

Im Rahmen der initialen Studien zur Struktur-basierten Entwicklung von kovalenten Inhibitoren zur Adressierung von KIT konnte eine Syntheseroute für kovalente Derivate der in dieser Arbeit vorgestellten reversiblen Inhibitoren (Kapitel 3.3.1) etabliert werden.

Zunächst wurden durch rationales Design und anschließende Untersuchung des Bindungsmodus mittels Docking geeignete Positionen am Ponatinib/Imatinib-Grundgerüst zur Einführung eines Michael-Akzeptors identifiziert. Die Substitution des Methylpiperazin-Motivs der reversiblen Moleküle **8b** und Ponatinib durch einen Acrylamid-*warhead* stellte sich als vorteilhaft für die Adressierung eines in der *back pocket* lokalisierten Cysteins (Cys788) heraus. Basierend auf der reversiblen Substanz **8b** wurden die potentiell kovalent bindenden Derivat **33** und das auf Ponatinib basierende, um eine Methyleneinheit am Elektrophil-Motiv verkürzte Derivat **35**, entwickelt. Nach erfolgreicher Synthese von **33** und **35** mit der in Kapitel 4.2.1 vorgestellten Syntheseroute wurden die Verbindungen sowohl biochemisch als auch zellulär charakterisiert.

Die biochemische Charakterisierung von **33** ergab im Vergleich zur Parentalverbindung **8b** einen signifikanten Verlust der Aktivität auf VEGFR2, während die Potenz gegenüber KIT^{wt} erhalten blieb. Für die KIT-Mutanten konnte keine verbesserte Aktivität verzeichnet werden. Für **35** hingegen konnte lediglich ein Aktivitätsverlust gegenüber den KIT-Varianten KIT^{V559D/T670I} und KIT^{V559D/V654A} ermittelt werden. Zusammengefasst verdeutlichen die im biochemischen Experiment ermittelten Daten wiederum die Bedeutung der CF₃-Gruppe für die inhibitorische Aktivität gegenüber den Mutanten KIT^{V559D/T670I} und KIT^{V559D/V654A}. Zudem konnte durch die Substitution des Methylpiperazinsubstituenten durch den Acrylamid-*warhead* die Relevanz der Interaktionen des Methylpiperazins mit der *back pocket* für die Aktivität gegenüber den Mutanten KIT^{V559D/T670I} und KIT^{V559D/V654A} erschlossen werden. Die anschließende Charakterisierung der potentiell kovalent bindenden Substanzen in humanen GIST-Zelllinien stellte zusätzlich die Rolle der ausgebildeten Wechselwirkungen des Methylpiperazins-Motivs zur Kinase heraus.

Eine detaillierte Untersuchung der löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften des Methylpiperazins-Motivs erscheint vor allem im für den zellulären Kontext erstrebenswert, da eine verminderte Löslichkeit ebenfalls ein Grund für den Aktivitätsverlust im Gegensatz zur Parentalverbindung Ponatinib sein kann.

Die untersuchten Verbindungen verloren im zellulären Experiment signifikant an Aktivität gegenüber allen KIT-Varianten im Vergleich zu den verwandten reversiblen Molekülen **8b** und Ponatinib. Die zuvor sehr gute Übereinstimmung zwischen biochemischen und zellulären Aktivitäten, wie sie für Ponatinib, **8b** und den restlichen in Kapitel 3.3.4 untersuchten Substanzen gegeben war, war hier nicht zu beobachten. Eine verminderte Löslichkeit sowie der Verlust von Interaktionen in der *back pocket* von **33**, **34** und **35** durch die Substitution des Methylpiperazin-Motivs mit einer Acrylamidfunktionalität könnte die wahrscheinlichste Erklärung für den Aktivitätsverlust in Zellen darstellen.

Durch MS-Experimente sollte die Modifikation von KIT^{wt} durch **33** und **35** nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente neben der DMSO-Kontrolle Substanz **34**, welche als reversibles Pendant zu **33** synthetisiert wurde. Obgleich sich für **33** und **35** eine gute Aktivität gegenüber KIT^{wt} (**33**: 9.5 nM; **35**: 1 nM) determinieren ließ, zeigte sich lediglich mit dem um eine Methylengruppe verkürzten *warhead* in **35** eine Adduktbildung mit KIT^{wt} (Abbildung 33). Eine anteilige kovalente Bindungsknüpfung konnte allerdings erst nach Erhöhung der Nukleophilie des wahrscheinlichen Michael-Donors Cys788 durch eine pH-Wert Erhöhung auf pH 8.5 erreicht werden. Die Wahl eines reaktiveren Elektrophils könnte hier in Betracht gezogen werden, um eine effektivere Modifizierung der Kinase durch den Liganden zu erreichen. Nach tryptischem Verdau der Protein-Ligand-Komplex enthaltenden Probe wurden die generierten Peptidfragmente via Tandem-MS analysiert. Die lückenhafte Sequenzabdeckung der generierten Peptidfragmente, der unvollständige Reaktionsablauf sowie ein nicht auszuschließendes ungünstiges Flugverhalten der Peptid-Ligand-Komplex-Fragmente könnte die Identifizierung einer modifizierten Aminosäure erschwert haben. Eine kovalente Modifizierung der Kinase durch **35** könnte unter den gewählten Bedingungen nicht mittels MS/MS nachgewiesen werden. Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_i und k_{inakt} für **35** unterstützt die in den MS-Experimenten und der biochemischen Evaluierung beobachteten Ergebnisse. **35** zeigte eine hohe Affinität zu KIT^{wt} ($K_i = 1.5$ nM), während die Geschwindigkeit der kovalenten Bindungsknüpfung sehr langsam erfolgte ($k_{\text{inakt}} = 0.03$ min⁻¹).

Die relativ langsame Bindungsknüpfungsgeschwindigkeit liefert einen Erklärungsansatz für die in einem Zeitraum von 24 h unvollständige Reaktion zwischen **35** und KIT^{wt} und unterstützt die Hypothese bezüglich der zu geringen Reaktivität des gewählten Elektrophils.

Zusammenfassend konnte eine kovalente Adressierung von KIT^{wt} erfolgreich realisiert werden. Die Identifizierung der durch **35** kovalent gebundenen AS steht noch aus. Aus den designten Verbindungen **33** und **35** konnten wertvolle Informationen hinsichtlich der Positionierung, Reaktivität und Struktur des Michael-Akzeptors gewonnen werden. In Einklang mit den hier durchgeführten Docking-Studien konnte eine vorteilhafte Positionierung sowie Orientierung und relative Größe für den Michael-Akzeptor innerhalb der Ponatinib-basierten Verbindungen abgeleitet werden. Auch für die Substanzklasse der irreversibel bindenden Moleküle wären strukturbiochemische Untersuchungen in Form von Ko-Kristallisationsversuchen mit KIT und dessen Varianten von Interesse. Zum einen könnte so der *in silico*-beobachtete Bindungsmodus untersucht und gegebenenfalls bestätigt werden, zum anderen könnten die aufgestellten Hypothesen in Bezug auf die Modifizierung des in der allosterischen Tasche lokalisierten Cys788 verifiziert werden. Eine systematische Mutagenesestudie, in der alle zugänglichen Cysteine in KIT einzeln durch z. B. Serine ersetzt werden, könnte als alternatives Experiment zur Ermittlung der Identität der kovalent gebundenen Aminosäure herangezogen werden. Speziell die Identifizierung der von **35** modulierten Aminosäure sollte noch durch die Erzeugung andersartiger Peptidfragmente durch die Verwendung alternativer Proteasen angestrebt werden.

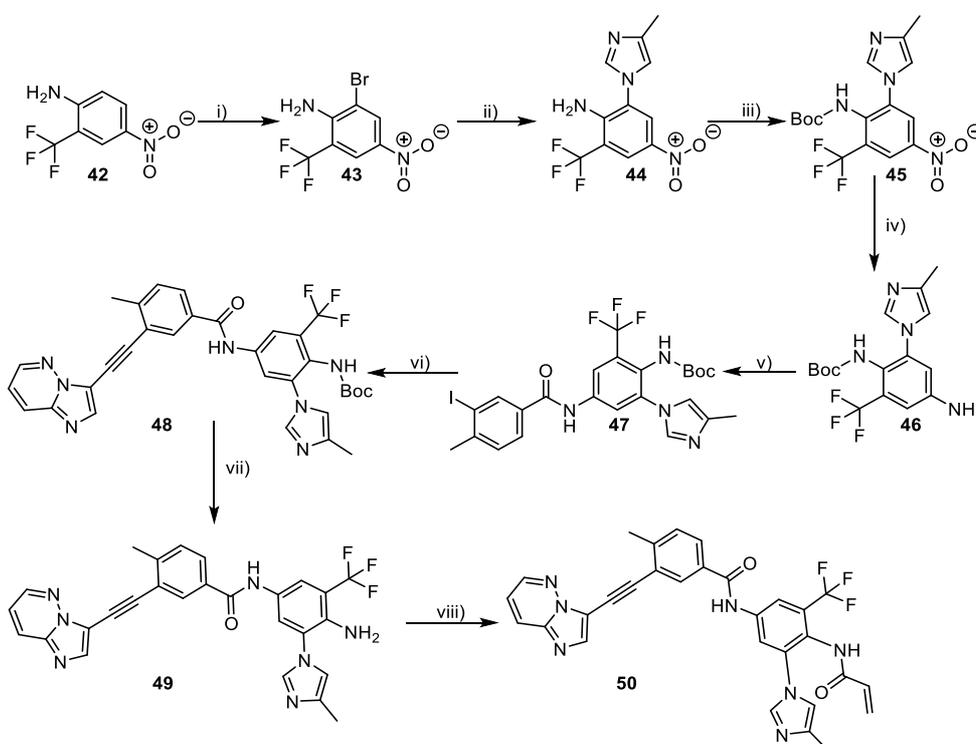
Um die aus den Ergebnissen gewonnenen Informationen weiterführend zu evaluieren, müsste eine Substanzbibliothek um den elektrophilen *warhead* der Substanz **35** herum synthetisiert und untersucht werden. Das angestrebte Ziel sollte dabei sein, eine vollständige einfache Adduktbildung zwischen der hinsichtlich des *warheads* optimierten Substanz und KIT^{wt} zu generieren. Die Dekoration von **35** mit Michael-Akzeptoren in Form des reaktiveren Chloracetamids oder des Thiolaktivierenden 4-(Dimethylamino)but-2-enamids könnte mögliche Zielverbindungen generieren, um dieses Ziel zu erreichen. Des Weiteren sollte eine Durchmusterung unterschiedlicher Peptidasen angestrebt werden, um alternative Peptidfragmente zu generieren, die eventuell eine Detektion des modifizierten Peptidfragments begünstigen.

Um den Verlust des Methylpiperazins zu kompensieren und möglicherweise die Aktivität von **33**, **34** und **35** in Zellen wiederherzustellen/zu verbessern, könnte die Einführung einer neuen Löslichkeitsvermittelnden Gruppe zielführend sein.

Schema 12 zeigt die potentiell für die Aktivität in Zellen vorteilhafte synthetische Einführung einer Löslichkeitsvermittelnden Gruppe in *ortho*-Position zum Michael-Akzeptor.

Dieses Vorgehen sollte es ermöglichen die Hypothese bezüglich verminderter Löslichkeit, Verlust von Interaktionen durch Substitution des Methylpiperazins zur Kinase und/oder einer Kombination daraus weiterführend zu untersuchen. Im Idealfall sollten zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese die Löslichkeit der Verbindungen **33**, **34** und **35** im Vergleich zu **8b** und Ponatinib, z. B. durch Durchführung eines SolRank-Assays, ermittelt werden.

Schema 12: Vorschlag einer Syntheseroute zur Einführung einer Löslichkeits-vermittelnden-Gruppe für die Darstellung eines Derivates von **50**.^a



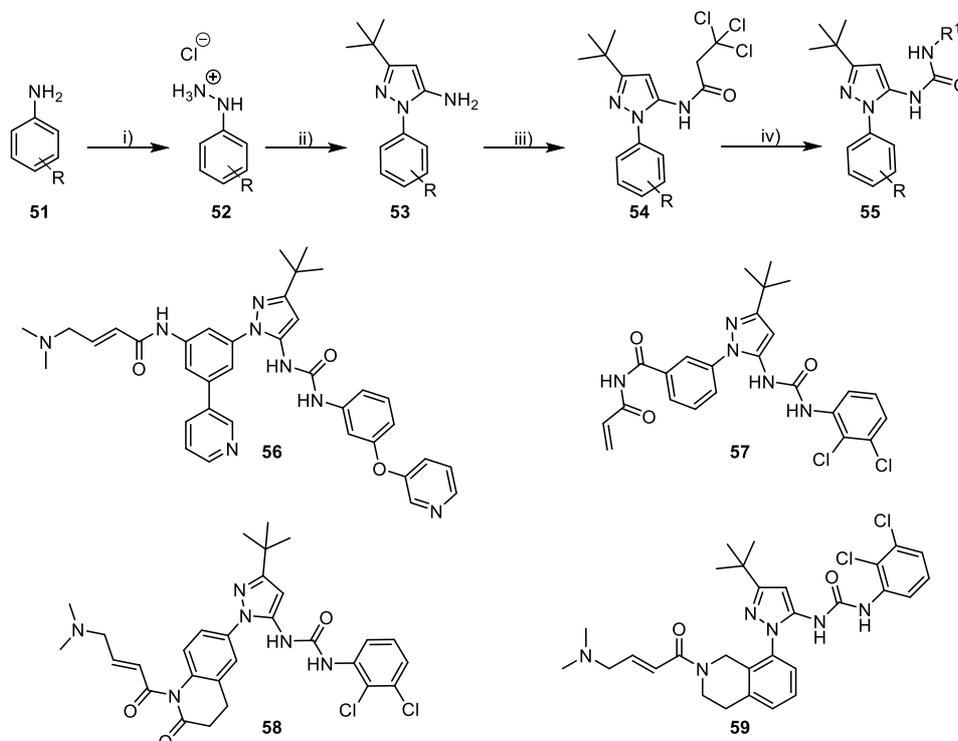
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Br₂, Essigsäure, 120 °C, 2,5 h; (ii) Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0), Di-*tert*-butyl(2',4',6'-triisopropyl-3,4,5,6-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-2-yl)phosphan, K₃PO₄, Toluol/^tBuOH (1:1) 120 °C, 12 h; (iii) DMAP, Et₃N, Boc-Anhydrid, THF, 5 h, reflux; (iv) Pd/C, H₂, EtOH, 12 h; (v) HATU, DIPEA, DCM, DMAP, 3-Iodo-4-methylbenzoesäure, rt, 16 h; (vi) Alkin, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, (*i*-Pr)₂NH, TBAF, ACN, 80 °C, 16 h; (vii) 10 %-ige TFA, DCM, 0 °C-rt, 1 h; (viii) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, -78 °C-rt, 5 .

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4-Nitro-2-(trifluoromethyl)anilin (**42**) könnte durch eine selektive Bromierung mit elementarem Brom in Essigsäure das 2-Bromo-4-nitro-6-(trifluoromethyl)anilin (**43**) erzeugt werden.²⁷¹ Die regioselektive Kupplung von 4-Methylimidazol nach Ueda *et al.*²⁷² könnte die Integration der gewünschten Löslichkeitsvermittelnden Gruppe ermöglichen (**44**).²⁷²

Nach Schützung der Aminfunktion (**45**) und anschließender Reduktion der Nitrogruppe könnte die generierte Substanz **46** wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben weiter umgesetzt werden, um schließlich das gewünschte Zielmolekül **50** zu erhalten (siehe Schema 12). Modellierungsstudien mit **50** in KIT^{wt} weisen darauf hin, dass die Positionierung der Löslichkeitsvermittelnden Gruppe durchaus toleriert werden könnte und potentiell zusätzliche Interaktionen zur Kinase ausgebildet werden könnten (Abbildung 36A).

Basierend auf den von der Firma Deciphera patentierten, für die KIT-ähnlichen Kinasen Abl und VEGFR2 entwickelte Typ II- und Typ III-Inhibitoren, könnten potentiell kovalente Inhibitoren für die Adressierung von KIT designt werden.²⁷³ Richters *et al.*²⁷⁴ zeigten 2013, dass diese Art von Inhibitoren zur Inhibition von KIT^{wt} und KIT^{V559D/T670I} biochemisch und zellulär genutzt werden können.²⁷⁴ Hinsichtlich dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass es sich bei dem Pyrazolo-Harnstoff-Molekülgerüst um eine Substanzklasse mit gut zugänglichen Derivatisierungsstellen handelt, wurde basierend auf diesen eine mögliche Synthese entwickelt. In Schema 13 ist der Vorschlag für die Synthese von kovalent bindenden Pyrazolo-Harnstoff-Derivaten sowie potentiellen Zielverbindungen dargestellt.

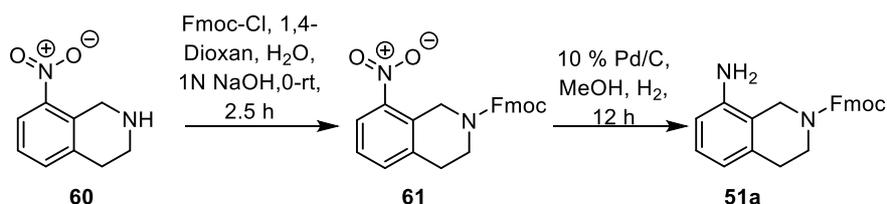
Schema 13: Vorschlag einer Syntheseroute zur Darstellung von potentiell kovalenten Pyrazolo-Harnstoff-Derivaten zur Adressierung der KIT-Varianten, sowie Vorschläge für mögliche Zielverbindungen.^a



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) 1) HCl, NaNO₂, H₂O, 0 °C; 2) SnCl₂, konz HCl, rt; (ii) Pivaloylacetoneitril, konz. HCl, EtOH, 90 °C; (iii) Troc-Cl, H₂O/EtOAc, NaOH, 0 °C-rt; (iv) R¹-NH₂, DIPEA, DMSO, 60 °C.

Die Position für die nachträgliche Einführung des Michael-Akzeptors ist in einigen Startmaterialien in Form einer zweiten Aminfunktionalität enthalten und muss gegebenenfalls erst geschützt werden, bevor die Synthese nach Schema 13 fortgeführt werden kann. Beispielhaft ist eine mögliche Synthese des Amins **51a** für die Generierung von **59** in Schema 14 gezeigt.

Schema 14: Vorschlag für die Darstellung eines Amins (**51**) für die Generierung von **59**.



Die mit entsprechenden Schutzgruppen präparierten Amine (**51a**) können durch die Reduktion des Diazoniumsalzes mit Zinn(II)chlorid zum Hydrazinderivat **52** umgesetzt werden.²⁷⁴ Die unterschiedlichen Hydrazinderivate **52** könnten in einer Pinner-ähnlichen Zyklisierungsreaktion mit Pivaloylacetoneitril zu den entsprechenden Pyrazolen **53** umgesetzt werden.²⁷⁴ Die primären Aminfunktionalitäten würden durch die Schützung mit Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester (Troc) zur Generierung der Carbamate **54** führen, welche durch die anschließende Reaktion mit diversen primären Aminen zu den gewünschten Harnstoffderivaten **55** umgesetzt werden könnten.²⁷⁴ Aus der Umsetzung der primären Amine mit den ausgewählten Michael-Akzeptoren könnten beispielsweise die Pyrazolo-Harnstoff-Derivate **56-59** hervorgehen. Modellierungsstudien von **56-59** zeigten, basierend auf den von Richters *et al.*²⁷⁴ publizierten Ko-Kristallstrukturen von strukturell verwandten Urea-Derivaten in cSrc, dass ein ähnlicher Bindungsmodus zur Kinase wahrscheinlich ist.²⁷⁴ Die Verbindungen **56-59** binden vermutlich konform zu einem Typ III bzw. Typ II Bindungsmodus in der inaktiven Kinasekonformation (Abbildung 36B). Das Pyrazolo-Motiv würde, wie die CF₃-Gruppe in den Ponatinib-basierten Inhibitoren **7a-7l**, die Subtasche in der *back pocket* belegen. Das Harnstoff-Strukturmotiv sollte ähnlich wie die Amidbindung in Ponatinib mit Asp810 des DFG-Motivs und Glu640 der α -Helix C über Wasserstoffbrücken interagieren. Der Stickstoff des Pyridin-Elements könnte Wasserstoffbrücken zur Scharnierregion ausbilden. Die Positionierung des Michael-Akzeptors sollte die potentielle Adressierung von Cys788 ermöglichen.

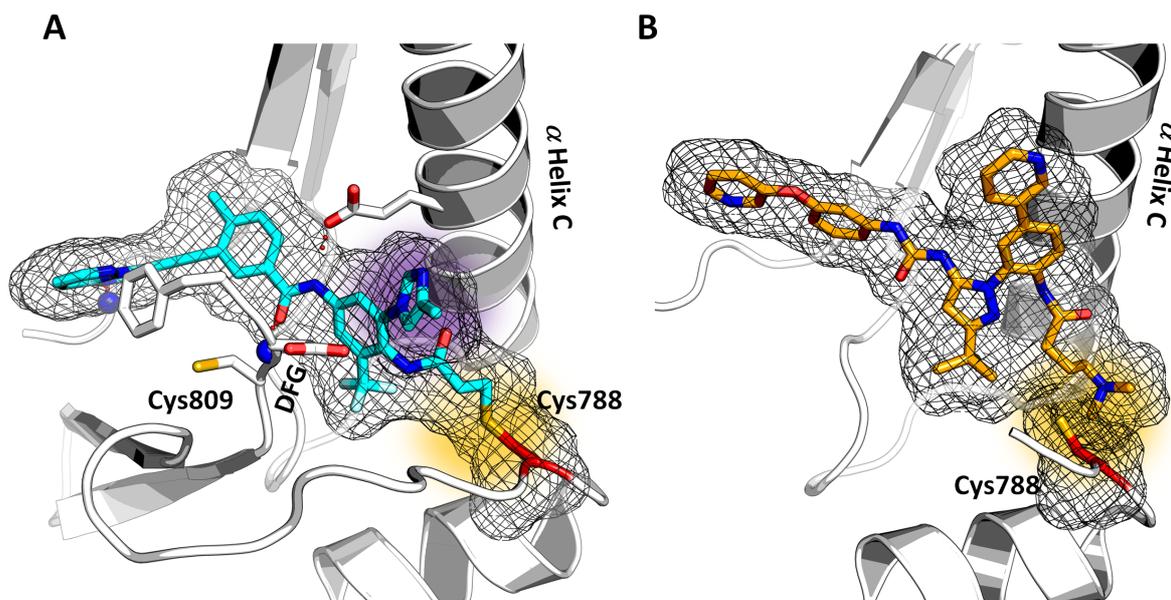


Abbildung 36: A) Modellierungsstudien von Verbindung 48 in KIT^{wt}. Die potentielle Bindungsknüpfung zwischen Cys788 und 48 ist gelb, der mögliche Löslichkeitsvermittelnde Substituent ist violett hinterlegt. B) Modellierung der Beispiolverbindung 54 in KIT^{wt}. Der Bindungsmodus wurde basierend auf den von Richters *et al.*²⁷⁴ publizierten Kristallstrukturen von verwandten Pyrazolo-Harnstoffderivaten in cSrc (pdb 3tz7-9) modelliert.

Die kovalente Modifikation von KIT durch niedermolekulare Substanzen ist weitestgehend unerforscht. Dabei könnte genau dieser Ansatz wertvoll für eine selektive und potente Inhibition wirkstoffresistenter KIT-Mutanten sein. Das aus der Arbeit von Leproult *et al.*²⁶³ als adressierbar hervorgehende Cys788 in KIT^{wt} ist innerhalb der Kinasefamilie in nur 20 weiteren humanen Proteinkinasen vorhanden.²⁶³ Durch Optimierung der Affinität der reversiblen Interaktion der niedermolekularen Moleküle auf das Zielprotein und der anschließenden kovalenten Bindungsknüpfung könnte die Selektivität gegenüber diesen 20 Proteinkinasen weiter erhöht werden. Deshalb ist es zwingend notwendig, den in dieser Arbeit begonnenen strukturbasierten Ansatz zur Entwicklung von kovalenten KIT-Inhibitoren weiterzuführen, bspw. indem die aufgeführten Verbesserungsvorschläge für die Ponatinib basierten Substanzen sowie die Nutzung neuer Substanzklassen wie den hier vorgeschlagenen Pyrazolo-Harnstoff-Derivaten weiterverfolgt werden. Auf diese Weise könnten im Vergleich zu den für die Therapie von GIST verwendeten reversiblen Multikinaseinhibitoren selektivere und potentere, irreversible Inhibitoren (maximale Verweildauer, hohe biologische Effizienz) entwickelt werden. Zusammenfassend konnten in diesem Kapitel der Arbeit grundlegende Untersuchungen für die Entwicklung und Synthese von kovalent bindenden KIT-Inhibitoren durchgeführt werden, auf denen mit den oben aufgeführten weiterführenden Synthesevorschlägen aufgebaut werden könnte.

5 Kurzfassung

Die Assoziation von Krebserkrankungen mit der Dysregulation von RTKs und damit der von ihnen gesteuerten Signaltransduktionswege ist ein Schlüsselement in der modernen zielgerichteten Krebstherapie, bzw. Präzisionsmedizin. Die Inhibition dieser fehlregulierten Kinasen durch kleine, organische Moleküle hat sich als wertvoller Ansatz für die Behandlung der aus der konstitutiven Aktivierung dieser Proteine resultierenden Krankheitsbilder erwiesen. Der Mast-/Stammzellen-Wachstumsfaktorrezeptor KIT ist ein Beispiel für eine solche klinisch relevante RTK. KIT ist das Zielprotein in der Behandlung von GIST und CML. Die Resistenz gegenüber Kinaseinhibitoren durch das Auftreten von Sekundärmutationen im aktiven Zentrum während der Behandlung mit diesen stellt die Herausforderung in der Präzisionsmedizin dar. Auch das fortschreitende Tumorwachstum von behandelter GIST ist auf das Auftreten von Sekundärmutationen zurückzuführen. Die meisten Patienten sprechen nur übergangsweise auf die Zweit- und Drittlinien-Therapeutika an. Die verbesserte Aktivität dieser Inhibitoren geht mit teils schweren Nebenwirkungen einher, die auf das promiskuitive Kinaseinhibitionsprofil dieser zurückzuführen sind. Ponatinib, ein hochpotenter ATP-kompetitiver BCR-ABL-Inhibitor, inhibiert ebenfalls ein breites Spektrum an Imatinib-resistenten KIT-Mutationen, darunter auch die für die D816-Mutation, die zu einer Resistenz gegenüber allen zugelassenen Inhibitoren führt. Auch gegenüber Ponatinib zeigt sich mit fortschreitender Behandlung eine Resistenz in Form der Sekundärmutation V654A. Die aus der Behandlung mit Ponatinib resultierenden schweren Nebenwirkungen sind die Konsequenz des Multikinaseinhibitor-Selektivitätsprofils dieses Inhibitors. Die Identifizierung von Molekülen mit hoher Aktivität und Selektivität gegenüber Exon 13/14 und 17 Mutationen ist nicht nur für GIST, sondern auch für KIT-abhängige Leukämien und Melanome von hoher klinischer Relevanz.

In der vorliegenden Arbeit sollte das strukturbasierte Design und die Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek zur Adressierung klinisch relevanter KIT-Mutationen sowie die anschließende biochemische und zelluläre Charakterisierung dieser erfolgen, um Wirkstoffresistenzen in KIT-abhängigen Krebserkrankungen zu überwinden.

Als strukturelle Basis für das rationale Inhibitor-Design wurde das Grundgerüst des derzeit effektivsten zugelassenen Inhibitors auf die klinisch relevanten KIT-Mutationen, Ponatinib, herangezogen, um Optimierungsstudien hinsichtlich einer erhöhten Potenz, insbesondere für die Sekundärmutation V654A, verbesserten Selektivität und damit verringerten Toxizität durchzuführen.

Insbesondere sollte dabei die Möglichkeit zur Optimierung der Selektivität zu der strukturell verwandten Kinase VEGFR2 untersucht werden. Zwischen der Inhibition dieser und verwandter Kinasen und der Thrombenbildung in Patienten während der Ponatinib-Behandlung wird ein kausaler Zusammenhang vermutet. Ausgehend von publizierten Kristallstrukturen wurden computerchemische Methoden zur Generierung von MD-Simulationen der Mutanten V654A und T670I verwendet, um eine differenzierte Analyse ihrer strukturellen Konformationen durchzuführen und die erhaltenen Informationen in das strukturbasierte Inhibitor-Design einfließen zu lassen. Neben den Docking-Studien war die Etablierung von validen biochemischen und zellulären Testsystemen wesentlich für die Bestimmung und Aufstellung der SAR. Aus diesem Grund wurden biochemische Testsysteme für fünf KIT-Varianten (KIT^{wt}, und 4 klinisch relevante KIT-Mutanten) sowie VEGFR2 und fünf humane GIST-Zelllinien für die Testung der hier synthetisierten Verbindungen etabliert und validiert.

Bei der Synthese der Substanzbibliothek wurde besonderes Augenmerk auf die Variation des Scharnierregion-bindenden-Elements (**7a-7l**), die Variation des Substitutionsmusters in dem *back pocket*-bindenden Motiv (**8a-d** und **9a-b**) und die Modifikation der Substituenten R³ und R⁴ (**5c-d** und **10**) für die Adressierung der KIT-Variante V654A gelegt. Dieses Vorgehen erlaubte die Ermittlung einer ausgeprägten Struktur-Aktivitätsbeziehung hinsichtlich der untersuchten KIT-Mutanten und folglich die Identifizierung einer biochemisch und zellulär auf KIT^{D559V/V654A}/GIST430-V654A potenten Verbindung (**7f**) sowie einer Verbindung (**10**) mit verbessertem Selektivitätsprofil im Vergleich zu Ponatinib. Parallel zu dieser Strategie wurde ein *scaffold hopping*-Ansatz in Kooperation mit der Taros Chemical GmbH durchgeführt, um neue patentierbare Hybridinhibitoren zu generieren. Die Kombination des Typ I^{1/2}-Motivs von Ponatinib mit dem Type II-Motiv eines potenten, von der Firma IRM LLC (WO2013/033116A1)²³⁸ patentierten KIT^{wt}-Inhibitors, wurde als Inspiration für die Synthese von elf Verbindungen genutzt, die Aktivität auf KIT^{wt}, allerdings keine inhibitorische Aktivität auf den untersuchten KIT-Mutanten sowie VEGFR2 zeigten.

Die Analyse aller experimentell ermittelten Daten erlaubte die Identifizierung wichtiger Struktur motive und Substitutionsmuster für das Inhibitor design, die essentiell für eine erfolgreiche Inhibition der KIT-Varianten sind.

Der zweite Teil dieser Arbeit beinhaltet die Untersuchung der Möglichkeit KIT irreversibel zu adressieren, um die Verweilzeit und damit Effizienz von potentiellen Inhibitoren zur Zielkinase zu maximieren und eine Verbesserung des Selektivitätsprofils dieser zu erreichen. KIT^{wt} konnte erfolgreich kovalent von einer der hier entwickelten Substanzen (**35**) adressiert werden, was durch massenspektrometrische Analysen bewiesen werden konnte. Während eine einfache Adduktbildung von **35** mit der Kinase beobachtet werden konnte, war eine Ermittlung der genauen Lokalisation und Identität der modifizierten Aminosäure im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Durch die ermittelten Daten konnte ein Einblick in die Nukleophil-Elektrophile-Kompatibilität gewonnen werden. Diese Erkenntnisse wiesen auf mögliche strukturelle Verbesserungen bezüglich der Wahl des Elektrophils hin. Des Weiteren wurde die Notwendigkeit der Einführung einer löslichkeitsvermittelnden Gruppe für die Aktivität der Substanzen im zellulären Experiment deutlich. Durch Implementierung dieser Ergebnisse in den nächsten Designzyklus könnte eine Optimierung der hier vorgestellten Substanzen erreicht werden.

Zusammenfassend konnten durch die Nutzung strukturbasierter Methoden Inhibitoren für unterschiedliche klinisch relevante KIT-Mutanten entwickelt werden. Insbesondere wurde die Optimierung der Affinität zu der Sekundärmutation V654A angestrebt. Es konnte eine Verbindung mit erhöhter inhibitorischer Aktivität (**7f**), besonders bezüglich V654A, und eine in Bezug auf ihr Selektivitätsprofil optimierte Verbindung (**10**) generiert werden. Des Weiteren konnte ein potenter kovalenter Modulator (**35**) für KIT entwickelt werden, der als Startpunkt für die weitere Optimierung der nächsten Generation von kovalent bindenden KIT-Inhibitoren fungieren kann. Die Resultate dieser Arbeit lieferten in ihrer Gesamtheit wichtige Informationen für die Entwicklung neuer Inhibitoren für die Adressierung klinisch relevanter KIT-Mutanten.

Abstract

The association of cancer with dysregulated signalling pathways, which are linked to RTKs represents a key element in targeted cancer therapy/precision medicine. The use of small organic molecules against constitutively active RTKs has been shown to be a valuable strategy to efficiently inhibit these malfunctioning kinases. The tyrosine kinase mast/stem cell growth factor receptor KIT is an example of a clinically relevant RTK. Mutations in KIT represent an early oncogenic event in gastrointestinal stromal tumors (GIST) and chronic myelogenous leukemia (CML). These Kit-driven cancers have been very successfully targeted with the TKI imatinib and have therefore become a paradigm for genotype driven targeted cancer therapy. However, drug resistance to Imatinib due to acquired secondary mutations within the catalytic pocket represents a common mechanism and a major challenge in targeted cancer therapy. Attempts to harness progression in GIST is challenging due to secondary drug resistance mutations. Most patients respond only transiently to second and third-line treatments and the improved activity is paid for with side effects resulting from the promiscuous kinase inhibition profile of those inhibitors. ponatinib, a highly potent next-generation ATP-competitive inhibitor of BCR-Abl, also inhibiting a broad spectrum of Imatinib-resistant KIT mutants, including those affecting the exon 17 codon encoding Asp816, which confers resistance to all approved drugs in GIST. Unfortunately, ponatinib loses potency on the secondary mutant V654A and shows severe side effects due to its poor selectivity profile. The identification of compounds with strong activity against exon 13/14 and 17 mutations is therefore of utmost clinical relevance for both the treatment of GIST as well as KIT-driven leukemias and melanomas.

The present work is focused on the structure-based design and synthesis of a focused library targeting clinically relevant KIT mutants as well as their biochemical and cellular characterization to overcome drug resistance in KIT-driven cancer. The general scaffold of to this point most efficient approved KIT-inhibitor ponatinib was used as a template for the rational design to advance its scaffold in terms of reduced toxicity, increased potency and increased selectivity, especially towards resistant KIT mutation V654A. Attention was also paid to the improvement of inhibitor selectivity towards the structurally related kinase VEGFR2. The inhibition of this kinase as well as related enzymes is hypothesised to cause side-effects such as thrombotic events during treatment with ponatinib.

Therefore, starting from already published X-ray-structures of KIT, computational chemistry methods were utilized to generate MD simulations of the V654A and T670I variants in order to analyse their differential structural behaviour and devise structure-based hypotheses for our inhibitor design.

In addition to the conducted docking studies the establishment of valid biochemical and cellular testing systems was crucial for the determination of the SAR. Therefore, five biochemical assays for KIT and its variants as well as for VEGFR2 and five human GIST cell lines had to be established and validated, which was successfully achieved in this work.

Using synthetic chemistry, we produced a focused compound library, paying particular attention to variation of the hinge binding element (resulting in compounds **7a-7l**), as well as the change of the substitution pattern of the back pocket-binding element (**8a-b** and **9a-b**). Also, we modified the substituents R³ and R⁴ specifically to target the secondary mutant V654A, resulting in the compounds **5c-d** and **10**. This approach led to the determination of a distinct SAR concerning KIT and its variants as well as to the identification of a compound with potency towards the KIT secondary mutant KIT^{V654A} (**7f**) as well as a compound (**10**) with an improved selectivity profile compared to ponatinib. In parallel, a scaffold hopping approach in cooperation with the Taros Chemical GmbH was utilized to generate new patentable hybrid inhibitors. The combination of the Type I_{1/2} element of ponatinib with the Type II motif of a potent KIT^{wt} inhibitor, which was patented by IRM LLC (WO2013/033116A1)²³⁸ inspired the synthesis of eleven compounds with inhibitory activity on KIT^{wt}. The analysis of the gained data allowed the identification of important structural features of the molecules, which were crucial for the inhibition of KIT.

Another part of this thesis featured the examination of the possibility to target KIT irreversibly to extend the drug target residence time and further improve the selectivity profile towards KIT. KIT^{wt} was successfully targeted by one of the designed electrophile-decorated compounds (**35**) as determined by mass spectrometry analysis. While mono-labelling of the kinase was observed, the specific localisation of the modified amino acid could not be verified by tandem MS. The collected data gave insights into the nucleophile-electrophile compatibility and therefore hinted towards possible structural improvements with respect to the design of compounds in a future design cycle.

In summary, using structure-based design, we developed inhibitors for various KIT mutants, especially focusing on the ponatinib resistant secondary mutant KIT^{V654A}.

We observed increased inhibitory activity (**7f**) and an optimized inhibition profile concerning selectivity to KIT (**10**). We also designed and synthesised a potent covalent inhibitor for KIT (**35**) whose characterisation provided useful data for further optimisation of covalent next generation KIT inhibitors. Taken together, these results will aid the development of next generation inhibitors to target clinically relevant KIT mutants.

6 Experimenteller Teil

6.1 Organische Synthese

6.1.1 Allgemeine Anmerkungen

Sämtliche zur Herstellung und Isolierung der Intermediate und Zielverbindungen verwendeten Lösemittel und Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Anbietern Acros, Fluka, Sigma-Aldrich Co., Alfa Aesar, Combiblocks, Apollo, Merck KGaA, Deutero oder VWR bezogen und ohne weitere Aufarbeitung genutzt. Trockene Lösungsmittel wurden von kommerziellen Herstellern erhalten. Oxidations- sowie hydrolyseempfindlichen Reaktionen wurden in Argon oder Stickstoff-Atmosphäre in ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt.

6.1.2 Materialien und Methoden

Die **NMR Spektren** wurden auf 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), Deutereodimethylsulfat ($\text{DMSO-}d_6$, $\delta = 2.50$ ppm bzw. $\delta = 39.52$ ppm) und Deuteureomethanol ($\text{MeOD-}d_4$, $\delta = 3.34$ ppm bzw. $\delta = 49.86$ ppm). Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Spinmultiplizitäten der Protonenkopplungen In den ^1H NMR-Spektren wurden wie folgt abgekürzt:

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

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

LC-MS-Messungen wurden auf dem 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) aufgenommen.

Die **Auswertung der Spektren** erfolgte mit der Software *MestReNova* der Firma *Mestrelab Research* (Version 6.0.3-5604). Die Auswertung der LC-MS-Spektren wurde mit der Software XcaliburTM (Thermo Fisher Scientific Inc., Version 2.0.7) durchgeführt.

Die Aufreinigung von bis zu 100 mg Rohprodukt wurde mittels einer **präparativen HPLC**-Agilent 1200 HPLC-Anlage (Säule VP 125/21 Nucleodur C18 der Firma Macherey-Nagel; Wellenlängendetektion zwischen $\lambda = 210\text{--}254$ nm) durchgeführt. Für größere Ansätzen (Multigrammaßstab) erfolgten die chromatographischen Trennungen an einer **Flash Chromatographie**-Anlage (Biotage Isolera One; Wellenlängendetektion bei $\lambda = 254$ nm und 280 nm). Verwendet wurden C4- und C18-Säulen (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).

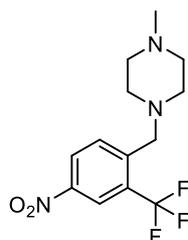
Die **präparativen Dünnschichtchromatographien (prep: TLC)** die Aufreinigung von bis zu 1 g Rohprodukt wurde auf Glas-DC-Platten der Firma ANALTECH (Silica gel GF; UV254; 20x20 cm; 1000 micron) durchgeführt.

Die **Dünnschichtchromatographien** wurden auf Aluminium-DC-Platten der Firma Merck (Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F254) durchgeführt. Die Aufreinigung mittels **Säulenchromatographie** wurde mit Kieselgel (Partikelgröße 40 – 60 μm) der Firma VWR durchgeführt.

Die Alpha 2–4 Dplus **Gefriertrocknungsanlage** der Firma Christ wurde für die Trocknung der Produkte verwendet.

6.2 Synthesevorschriften und Charakterisierung der Verbindungen

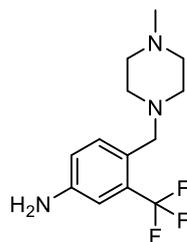
6.2.1 Synthese reversibler KIT-Inhibitoren



6.2.1.1 1-Methyl-4-(4-nitro-2-(trifluoromethyl)benzyl)piperazin (**3a**).

Die Synthese von **3a** unter Verwendung von 1-Methyl-4-nitro-2-(trifluormethyl)benzol als Ausgangsmaterial wurde bereits zuvor beschrieben.²⁷⁵ 4-Nitro-2-(trifluormethyl)benzaldehyd (3 g, 0.013 mol) und 1-Methylpiperazin (1.37 g, 0.013 mol) wurden bei rt in THF (48 ml) gelöst. Dann wurden Na(OAc)₃BH (4 g, 0.0190 mol) und Essigsäure (1,6 g, 0.026 mol) zu der Lösung zugegeben. Nach 2 h waren die Edukte vollständig umgesetzt und die Suspension wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (50 ml) gequench und die wässrige Phase mit DCM (4 × 15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Durch säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts (1-10 % MeOH/DCM) konnte das gewünschte Produkt als orangefarbenen Feststoff (2.7 g, 0.01 mol, 66 %) isoliert werden. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein²⁷⁵

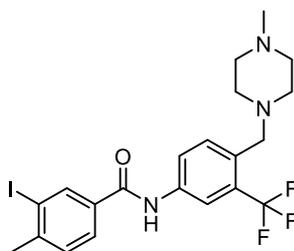
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.33 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.72 (s, 2H), 2.45 (br, 8H), 2.28 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.56, 145.92, 131.64, 130.01, 129.75, 126.47, 124.28, 122.10, 57.82, 55.15, 53.22, 46.03. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 304.29 für C₁₃H₁₇F₃N₃O₂ [M+H⁺], Gefunden: 304.26.



6.2.1.2 4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)anilin (**4a**).

Zu einer Lösung von 1-Methyl-4-(4-nitro-2-(trifluormethyl)benzyl)piperazin (2.6 g, 8.57 mmol) in EtOH (20 ml) wurde Pd/C (256 mg, 2.41 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde 16 h bei rt unter H₂ Atmosphäre gerührt. Nach Filtration wurde das Filtrat unter vermindertem Druck konzentriert und das gewünschte Produkt (**4a**) konnte als hellgelber Feststoff (2.3 g, 8.41 mmol, 98 %) erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁰¹

¹H NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 4.87 (s, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.71 – 2.30 (br, 8H), 2.27 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 148.59, 133.23, 130.57, 130.34, 127.15, 125.62, 124.98, 118.87, 58.98, 55.90, 45.94. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 274.31 für C₁₃H₁₉F₃N₃ [M+H⁺], Gefunden: 274.09.

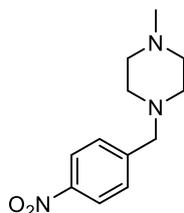


6.2.1.3 4-Iodo-3-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (**5a**).

EDC*HCl (1.75 g, 9 mmol), *N,N*-Diisopropylethylamin (4.2 ml, 24.6 mmol), DMAP (10 mg, 0.08 mmol) und HOBt (1.2 g, 9 mmol) wurden zu einer Lösung von 4-iodo-3-methylbenzoesäure (2.36 g, 9 mmol) in DMF (25 ml) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei rt gerührt. Dann wurde **4a** (2.24 g, 8:2 mmol) hinzugegeben und die Reaktion für 24 h bei rt gerührt.

Nach vollständigem Verbrauch des Edukts wurde das Reaktionsgemisch mit EtOAc (15 ml) verdünnt und mit Wasser (10×10 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (1-10 % MeOH/DCM) wurde das gewünschte Produkt als cremefarbener Schaum (3 g, 6 mmol, 70 %) isoliert. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein²⁰¹

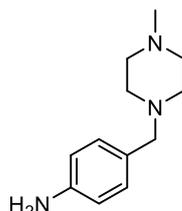
¹H NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄) δ 10.28 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.42 – 7.39 (m, 1H), 3.64 (s, 2H), 2.54 (br, 8H), 2.48 (s, 3H), 2.30 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 147.13, 139.30, 139.21, 134.98, 132.54, 130.83, 128.70, 125.06, 119.32, 119.26, 101.36, 58.95, 56.00, 45.97, 30.78, 28.42. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 518.09107 für C₂₁H₂₄ON₃F₃I [M+H⁺], Gefunden: 518.09063.



6.2.1.4 1-Methyl-4-(4-nitrobenzyl)piperazin (3b)

Zu einer Suspension von *para*-Nitrobenzaldehyd (3 g, 19.87 mmol) in THF (48 ml) wurden 1-Methylpiperazin (2.22 ml, 19.87 mmol) und Essigsäure (2 ml, 27.38 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei rt gerührt und anschließend Na(OAc)₃BH (5.4 g, 25.61 mmol) zugegeben und das Rühren wurde weitere 12 h bei rt fortgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (50 ml) gequenchet und mit EtOAc (3×50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Durch säulenchromatographische Reinigung (1-5 % MeOH/DCM) wurde das gewünschte Produkt als braun-orangefarbener Feststoff (3.78 g, 16,09 mmol, 81 %) erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁷⁶

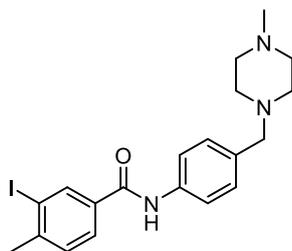
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 2.38 (br, 8H), 2.17 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 146.72, 146.53, 129.59, 123.28, 60.95, 54.47, 52.32, 45.40. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 236.13935 für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 236.13857.



6.2.1.5 4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)anilin (**4b**)

Zu einer Lösung von **3b** (2 g, 8.57 mmol) in THF (7 ml) wurden MeOH (28 ml), Wasser (7 ml), NH_4Cl (3,65 g, 68,16 mmol) und Eisenstaub (2.38 g, 42.6 mmol) hinzugefügt. Die Suspension wurde 3 h bei 90 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Reaktion auf rt abgekühlt und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (50 ml) gequenchet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3×40 ml) und 10 % MeOH/DCM (3×40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt, um **4b** als braunen Feststoff zu erhalten (1.7 g, 8.29 mmol, 97 %). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein²⁷⁷.

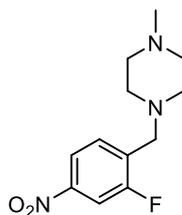
^1H NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.40 (s, 2H), 2.46 (b, 8H), 2.26 (s, 3H). HRMS (ESI-MS): Berechnet: 206.16517 für $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 206.16415.



6.2.1.6 4-Iodo-3-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)benzamid (5b)

4b (1.7 g, 8,29 mmol), HATU (3.65 g, 9.6 mmol) und DIPEA (2.3 ml, 42.6 mmol) wurden in DCM (14 ml) suspendiert und die Reaktion für 30 min bei rt gerührt. Dann wurde 3-Iod-4-methylbenzoesäure (2.34 g, 9.12 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (50 ml) gequench und mit 10 % MeOH/DCM (4×25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Flash Chromatographie (1-12 % MeOH/DCM+1 % NH₃). **5b** wurde in Form eines cremefarbenen Feststoffs (3.3 g, 7.33 mmol, 88 %) isoliert.

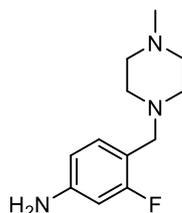
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.40 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.42 (s, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.37 (b, 8H), 2.19 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.50, 144.54, 137.74, 137.39, 134.05, 133.46, 129.67, 129.02, 127.65, 120.19, 109.07, 101.08, 61.52, 54.52, 52.19, 45.42, 45.29, 27.48. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 450.10368 für C₂₀H₂₅IN₃O [M+H⁺]. Gefunden: 450.10497, Berechnet: 472.08563 für C₂₀H₂₄IN₃Na [M+Na⁺]. Gefunden: 472.08589.



6.2.1.7 1-(2-Fluoro-4-nitrobenzyl)-4-methylpiperazin (**3c**)

1-(Bromomethyl)-2-fluor-4-nitrobenzol wurde wie bereits beschrieben synthetisiert.²⁷⁵ 1-(Bromomethyl)-2-fluor-4-nitrobenzol (3 g, 13 mmol) wurde in 1-Methylpiperazin (6 ml) gelöst und die Reaktion 3 h bei rt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (50 ml) gequench und mit EtOAc (4×25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (1-10 % MeOH/DCM) lieferte **3c** als orangenen Feststoff (1.69 g, 6.6 mmol, 54 %). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁷⁸

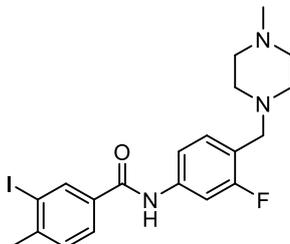
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.04 – 7.98 (m, 2H), 7.69 – 7.62 (m, 1H), 3.55 (s, 2H), 2.13 (b, 8H), 2.08 (s, 3H), ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.27, 132.03, 119.36, 111.03, 110.81, 55.89, 52.43, 48.58, 45.34. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 254.12993 für C₁₂H₁₇N₃O₂F [M+H⁺]. Gefunden: 254.13070.



6.2.1.8 3-Fluoro-4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)anilin (**4c**)

3c (900 mg, 3.56 mmol) wurde in EtOH (6 ml) gelöst und in einer H-Cubes®-Apparatur zur Reduktion über eine 10 % Pd/C-Kartusche mit in situ erzeugtem H₂ behandelt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das gewünschte Produkt **4c** wurde als weißer Feststoff erhalten (706 mg, 3.17 mmol, 89 %). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁷⁸

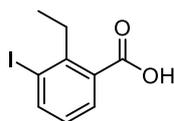
^1H NMR (500 MHz, MeOD- d_4) δ 7.03 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.39 (dd, J = 12.2, 2.0 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H), 2.48 (b, 8H), 2.27 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD- d_4) δ 133.94, 133.89, 125.06, 111.74, 102.32, 102.11, 58.33, 55.47, 52.89, 45.66. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 224.15575 für $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{F}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 224.15654.



6.2.1.9 *N*-(3-Fluoro-4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-4-iodo-3-methylbenzamid (**5c**)

Zu einer Suspension des primären Amins **4c** (0.72 g, 3.21 mmol) in THF (8 ml) wurden PyClock (1.98 g, 3.57 mmol) und DIPEA (1.1 ml, 6.42 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei rt gerührt, bevor 3-Iod-4-methylbenzoesäure (0.92 g, 3.52 mmol) zugegeben wurde. Das Rühren wurde für weitere 12 h fortgesetzt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (50 ml) gequench und mit 10 % MeOH/DCM (4×25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (1-10 % MeOH / DCM + 1 % NH_3) lieferte das gewünschte Produkt **5c** als hellgelben Feststoff (0.73 g, 1.57 mmol, 49 %).

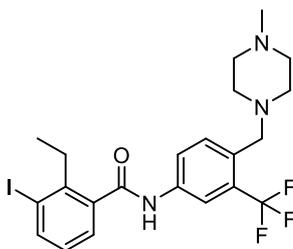
^1H NMR (500 MHz, MeOD- d_4) δ 8.36, (d, J = 1.8, 1H) 7.83 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 12.2, 1.9 Hz, 1H), 7.46 – 7.38 (m, 2H), 7.36 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 3.62 (s, 2H), 2.80 (br, 4H), 2.65 (br, 4H), 2.50 (s, 3H), 2.48 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD- d_4) δ 166.76, 163.58, 161.64, 146.97, 139.20, 135.08, 133.11, 130.72, 128.59, 120.33, 117.30, 108.94, 101.28, 55.82, 55.28, 52.17, 44.97, 28.32. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 468.09426 für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{OFI}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 468.09567, Berechnet: 490.07620 für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{FINa}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]. Gefunden: 490.07725.



6.2.1.10 2-Ethyl-3-iodobenzoensäure (11f)

n-Butyllithium (1.5 M in Hexan, 18.1 ml, 28,6 mmol) wurde tropfenweise zu einer Lösung von Diisopropylamin (4 ml, 28.6 mmol) in THF (57 ml) unter Eiskühlung gegeben und 30 min gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf -50 °C abgekühlt worden war, wurde eine Lösung von 3-Iod-2-methylbenzoensäure (2.5 g, 9.55 mmol) in THF (19 ml) zugegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für 1 h gerührt. Anschließend wurde Iodmethan (4.75 ml, 76.5 mmol) zugefügt und die Temperatur wurde von -50 °C auf -20 °C über 1 h erhöht. Die Reaktionsmischung wurde in 1 M Salzsäure (100 ml) gegossen und mit EtOAc (3×25 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde nacheinander mit 1 M Salzsäure (3×25 ml), Wasser (2× 25ml) und gesättigter Kochsalzlösung (2×25 ml) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, um 3-Iod-2-ethylbenzoensäure als einen cremefarbenen Feststoff (2.6 g, 95 %) zu erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein²⁷⁹.

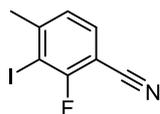
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.19 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 2.98 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.45, 144.68, 142.07, 129.53, 127.72, 102.77, 39.52, 31.17, 14.26. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 277.08 für C₉H₁₀IO₂ [M+H⁺]. Gefunden: 277.97.



6.2.1.11 2-Ethyl-3-iodo-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide (**5f**)

4a (250 mg, 0.92 mmol), HATU (402 mg, 1.06 mmol) und DIPEA (0.8 ml, 4.69 mmol) wurden in DCM (3 ml) gelöst und die Reaktion für 30 min bei rt gerührt. Dann wurde 3-Ethyl-4-iodbenzoesäure (279 mg, 1.01 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (20 ml) gequench und mit EtOAc (4×5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Schichten wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt. Reinigung Die säulenchromatographische Reinigung (1-10 % MeOH/DCM) ergab **5f** als einen beigefarbenen Feststoff (356.6 mg, 0.67 mmol, 73 %).

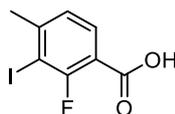
¹H NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.10 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.92 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.79 (s, 2H), 3.31 (br, 4H), 2.93 (q, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.62 (br, 4H), 1.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄) δ 170.71, 144.88, 142.81, 139.81, 139.16, 133.14, 132.79, 129.00, 128.42, 126.67, 124.86, 124.61, 116.53, 102.32, 58.29, 55.06, 51.14, 49.00, 43.61, 32.63, 15.23. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 532.10587 für C₂₂H₂₆N₃OF₃I [M+H⁺]. Gefunden: 532.10587.



6.2.1.12 2-Fluoro-3-iodo-4-methylbenzonitril (18)

n-Butyllithium (2.5 M in Hexan, 10.20 ml, 25.43 mmol) wurde langsam zu einer Lösung von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (4.72 ml, 27.97 mmol) in THF (30 ml) bei -70 °C gegeben und die Mischung bei -50 °C gerührt. Nach 50 min wurde 2-Fluor-4-methylbenzonitril (2.76 g, 16.95 mmol) zu der Reaktionsmischung bei -70 °C hinzugegeben und die Reaktion wurde bei -50 °C weitergerührt. Nach 50 min wurde Iodid (6.02 g, 23.73 mmol) in THF (10 ml) zu der Reaktionsmischung bei -70 °C zugegeben die Reaktion langsam auf rt erwärmt. Nach 3 stündigem rühren bei rt wurde gesättigte wässrige NaHCO₃-Lösung (150 ml) zu der Reaktion zugegeben und die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (3×50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (100 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts durch Flash-Chromatographie (95:5 Hexane/EtOAc bis 8:2 Hexane/EtOAc) ergab das gewünschte Produkt als hellgelben Feststoff (3 g, 11,5 mmol, 68 %). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²¹¹

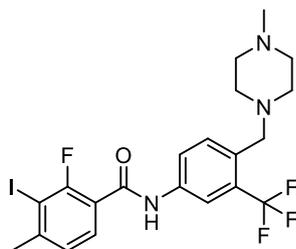
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (dd, *J* = 7.7, 6.7 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.55 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 163.11, 161.09, 150.74, 132.53, 125.69, 113.39, 88.76, 77.16, 28.72.



6.2.1.13 2-Fluoro-3-iodo-4-methylbenzoesäure (11g)

Schwefelsäure (60 %, 5 ml, 31.4 mmol) wurde langsam zu einer gerührten Lösung von 2-Fluor-3-iod-4-methylbenzonitril (**18**) (1 g, 3.83 mmol) in Dioxan (5 ml) gegeben und das Reaktionsgemisch anschließend auf 115 °C erhitzt. Nach 48 h wurde die Reaktion auf rt abgekühlt und in Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3×50 ml) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2×50 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (2×50 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt, um das gewünschte Produkt als weißer fester Feststoff (965.1 mg, 3.44 mmol, 90 %) erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸⁰

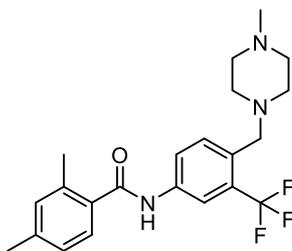
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.32 (s, 1H), 7.75 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.47 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 164.38, 160.71, 158.57, 149.06, 131.41, 125.59, 117.13, 39.52, 27.85. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 281.04 für C₈H₇FIO₂ [M+H⁺]. Gefunden: 281.09.



6.2.1.14 2-Fluoro-3-iodo-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (**5d**)

4a (250 mg, 0.92 mmol), HATU (402 mg, 1.06 mmol) und DIPEA (0.8 ml, 4.69 mmol) wurden in DCM (3 ml) gelöst und 30 min bei rt gerührt. Dann wurde 2-Fluor-3-iod-4-methylbenzoesäure (283 mg, 1.01 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (50 ml) gequenchet und mit EtOAc (4×5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (1-10 % MeOH/DCM) lieferte **5d** als beigefarbenen Feststoff (260.8 mg, 0,49 mmol, 53 %).

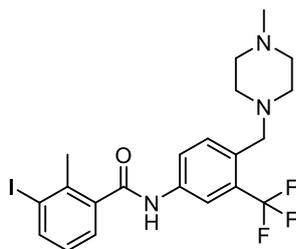
¹H NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.11 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.31 (br, 4H), 3.01 (br, 4H), 2.91 (s, 3H), 2.55 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄) δ 165.00, 160.63, 159.05, 149.24, 139.59, 133.02, 130.83, 130.81, 130.58, 130.38, 126.70, 124.79, 122.93, 122.81, 89.94, 58.26, 55.07, 51.13, 49.00, 43.59, 28.34. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 536.08164 für C₂₁H₂₃N₃OF₄I [M+H⁺]. Gefunden: 536.08234.



6.2.1.15 2,4-Dimethyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (**5g**)

4a (250 mg, 0.92 mmol), HATU (402 mg, 1.06 mmol) und DIPEA (0.8 ml, 4.69 mmol) wurden in DCM (3 ml) gelöst und 30 min bei rt gerührt. Dann wurde 2,4-Dimethylbenzoesäure (151.5 mg, 1.01 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 12 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (50 ml) gequenchet und mit EtOAc (4×5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt. Durch Reinigung mittels Flash Chromatographie (1-10 % MeOH/DCM) wurde **5g** als beigefarbener Feststoff (319.9 mg, 0.79 mmol, 86 %) isoliert.

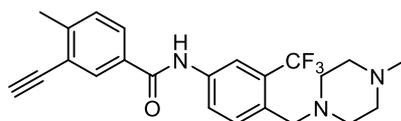
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN) δ 8.82 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.94 – 7.86 (m, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.36 (br, 4H), 3.05 (br, 4H), 2.80 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.31 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN) δ 170.07, 140.18, 137.79, 135.19, 133.45, 132.16, 130.29, 129.94, 128.71, 126.41, 125.56, 123.79, 118.26, 116.12, 57.38, 53.32, 50.05, 43.53, 20.07, 16.39. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 406.21062 für C₂₂H₂₇N₃OF₃I [M+H⁺]. Gefunden: 406.21081.



6.2.1.16 3-Iodo-2-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (**5e**)

4a (250 mg, 0.92 mmol), HATU (402 mg, 1.06 mmol) und DIPEA (0.8 ml, 4.69 mmol) wurden in DCM (3 ml) gelöst und 30 min bei rt gerührt. Dann wurde 3-Iod-2-methylbenzoesäure (265 mg, 1.01 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung gequench und mit EtOAc (4×5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (1-10 % MeOH/DCM) lieferte **5e** als beigefarbenen Feststoff (333.6 mg, 0.64 mmol, 70 %).

¹H NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.09 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 8.0, 4.7 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 2.89 (br, 4H), 2.62 (br, 4H), 2.58 (s, 3H), 2.51 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, MeOD-*d*₄) δ 170.66, 142.07, 139.90, 139.32, 139.27, 132.82, 128.69, 128.20, 128.11, 124.42, 118.57, 103.49, 58.56, 55.46, 52.38, 44.75, 25.98. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 518.34 für C₂₁H₂₄F₃IN₃O [M+H⁺]. Gefunden: 518.22.



6.2.1.17 3-Ethynyl-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (6a)

Trimethylsilylacetylen (0.1 ml, 3 mmol), Iodamid **5a** (150 mg, 0,3 mmol) und Diisopropylamin (127 μ l, 0.9 mmol) wurden in CH_3CN (5 ml) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 15 min bei Raumtemperatur mit Argon entgast. Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (21 mg, 0.03 mmol) und Cu(I)I (5.7 mg, 0.03 mmol) wurden zu der Reaktion gegeben. Die Reaktionsmischung wurde dann 6 h bei 80 °C gerührt, dann auf 30 °C abgekühlt und TBAF (1 M in THF, 0.9 ml, 0.9 mmol) wurde hinzugegeben. Nach Rühren für 1 h bei rt wurde die Reaktion über Celite® filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde dann durch präparative DC (5 % MeOH/DCM) gereinigt. Das Produkt wurde danach durch präparative HPLC gereinigt, um das gewünschte Produkt als weißen Feststoff (109.5 mg, 0.26 mmol, 88 %) zu erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸¹

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 10.32 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.98 (dd, J 3.9, 2.1 Hz, 1H), 7.93(m, 1H), 7.79 (dd, J = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.49 (br, 4H), 3.36 (s, 1H), 3.11 (br, 4H), 2.81 (s, 3H), 2.52 (s, 3H).
 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 165.16, 162.41, 162.17, 145.67, 138.30, 132.48, 131.76, 131.14, 130.33, 130.13, 129.31, 127.72, 124.82, 123.58, 123.00, 122.92, 118.38, 118.34, 82.47, 81.30, 77.16, 53.22, 20.72. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 415.18668 für $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 415.18721.

6.2.1.18 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Sonogashira-Reaktion zur Generierung der Alkinbausteine

Mehrmals verwendete Reaktionsvorschriften werden im Folgenden aufgeführt. Die angegebenen Mengen entsprechen dabei den eingesetzten Verhältnissen der Reaktanden in den durchgeführten Reaktionen. Abweichungen in den Mengenangaben, Reaktionsbedingungen oder Aufarbeitungsschritten sind entsprechen in den detaillierten Synthesebeschreibungen vermerkt.

Arylbromide **22a-I** (1 eq.), TMSA (20 eq.) und Diisopropylamin (3 eq.) wurden in CH₃CN gelöst. Die Mischung wurde 15 min bei rt mit Argon entgast. Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (10 mol%) und Cu(I)I (5-10 mol%) wurden zu der Reaktion gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei 80 °C gerührt, über LCMS und GCMS auf Vollständigkeit des Reaktionsumsatzes geprüft, anschließend über Celite® filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die erhaltenen silylgeschützten Alkinbausteine **21a-I** wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt

6.2.1.19 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 2): Sonogashira-Reaktion

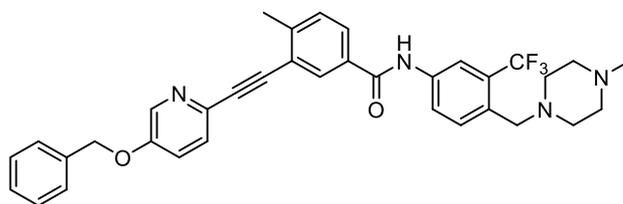
Die silylgeschützte Alkinbausteine **21a-I** (5 eq.), die entsprechenden Iodamide **5a-g** (1 eq.) und Diisopropylamin (3 eq.) wurden in CH₃CN gelöst. Die Mischung wurde 15 min bei rt mit Argon entgast. Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (10 mol%) und Cu(I)I (5-10 mol%) wurden zu der Reaktion gegeben. Die Reaktionsmischung wurde dann 30 min auf 60 °C erhitzt, dann auf 30 °C abgekühlt und TBAF (3Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei 80 °C gerührt, anschließend über Celite® filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde dann mittels präparativer DC oder Säulenchromatographie gereinigt. Das Endprodukt wurde des Weiteren mittels präparativer HPLC gereinigt.



6.2.1.20 4-Methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(pyridin-2-ylethynyl)benzamid (7a)

Die Substanz **7a** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff erhalten (16 mg, 0.03 mmol, 5 %).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.61 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.19 (dd, $J = 8.6$, 2.0 Hz, 2H), 8.01 (dd, $J = 8.5$, 2.0 Hz, 2H), 7.95 – 7.90 (m, 1H), 7.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 9.2$, 8.8, 4.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.22 (s, 4H), 2.83 (s, 3H), 2.76 (s, 4H), 2.65 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 166.62, 149.76, 145.19, 142.91, 137.69, 137.64, 132.62, 132.01, 131.60, 131.49, 130.17, 128.60, 127.83, 124.15, 123.83, 122.43, 92.51, 87.61, 57.31, 54.25, 50.32, 42.92, 19.91. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 493.22097 für $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 493.22236.

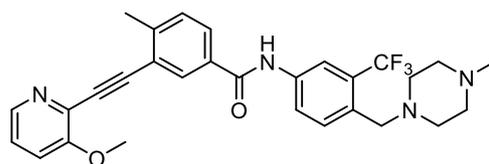


6.2.1.21 3-((5-(benzyloxy)pyridin-2-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7b)

Die Substanz **7b** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (25 mg, 0.4 mmol, 22 %).

$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, CDCl_3) δ 8.37 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.98 (dd, $J = 15.0$, 5.3 Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 7.9$, 1.9 Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 8.5$, 2.3 Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.47 (dd, $J = 14.2$, 5.3 Hz, 2H), 7.40 – 7.30 (m, 4H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 3.63 (s, 2H), 2.92 (br, 8H), 2.77 (s, 3H), 2.56 (s, 3H).

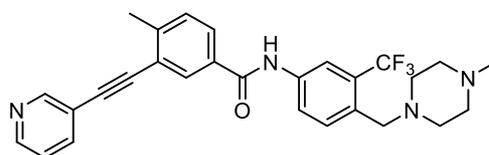
^{13}C NMR (176 MHz, CDCl_3) δ 165.28, 163.24, 150.18, 144.73, 141.33, 137.00, 132.05, 131.89, 130.49, 130.30, 128.67, 128.22, 128.18, 127.29, 124.97, 124.79, 123.82, 123.55, 123.26, 113.15, 111.33, 91.61, 88.72, 77.16, 68.13, 57.58, 53.95, 49.41, 43.53, 21.05. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 599.26284 für $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 599.26462.



6.2.1.22 *N*-(4-((4-Aminopiperidin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((3-methoxypyridin-2-yl)ethynyl)-4-methylbenzamid (7c)

Die Substanz **7c** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als braun-orangefarbener Feststoff (6 mg, 0.01 mmol, 8 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.43 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.05 – 7.97 (m, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 1H), 7.79 (dd, $J = 8.4, 4.7$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J = 8.1, 3.1$ Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.16 (br, 4H), 2.79 (s, 3H), 2.74 (br, 4H), 2.67 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 167.50, 145.91, 141.81, 139.33, 139.15, 138.89, 134.73, 134.69, 133.56, 133.34, 132.39, 131.94, 130.81, 130.46, 129.04, 128.34, 125.59, 124.90, 123.74, 120.00, 92.94, 90.17, 58.16, 56.31, 55.01, 51.41, 43.92, 28.03, 20.55. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 523.23154 für $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 523.23255.



6.2.1.23 4-Methyl-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(pyridin-3-ylethynyl)benzamid (7d)

Die Substanz **7d** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als beigefarbener Feststoff (13 mg, 0.03 mmol, 13 %) erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸²

^1H NMR (500 MHz, MeOD- d_4) δ 8.75 (s, 1H), 8.57 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 8.18 – 8.15 (m, 2H), 8.03 (ddd, $J = 8.5, 5.1, 1.8$ Hz, 2H), 7.92 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.14 (s, 4H), 2.78 (s, 3H), 2.73 (s, 4H), 2.63 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD- d_4) δ 167.58, 152.34, 149.57, 145.71, 140.36, 139.53, 133.60, 133.09, 133.07, 132.64, 132.21, 130.98, 129.17, 125.11, 123.85, 121.93, 91.68, 91.14, 58.32, 55.20, 51.63, 43.93, 20.88, 20.83. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 493.22097 für $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 493.22194.



6.2.1.24 3-((6-Aminopyridazin-3-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7e)

Die Substanz **7e** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten (3 mg, 0.006 mmol, 3 %). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸³

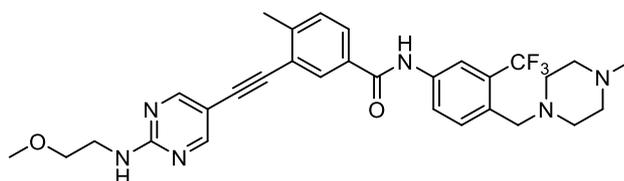
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.53 (s, 1H), 8.20 (dd, $J = 11.8, 1.6$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 14.7, 8.7$ Hz, 1H), 6.87 – 6.76 (m, 2H), 3.61 (s, 2H), 2.77 (br, 4H), 2.55 (s, 3H), 2.50 (br, 4H), 2.48 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.57, 143.73, 138.32, 132.09, 131.48, 131.46, 131.33, 130.81, 130.56, 129.99, 129.97, 128.32, 127.69, 127.57, 127.33, 123.47, 121.78, 117.30, 112.77, 92.01, 87.44, 76.67, 56.89, 53.75, 51.03, 43.91, 20.32. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 509.22712 für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 509.22828.



6.2.1.25 3-((2-Aminopyrimidin-5-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7f)

Die Substanz **7f** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als gelber Feststoff (2 mg, 0.004 mmol, 2%) erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸³

¹H NMR (700 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.45 (s, 2H), 8.37 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 2.86 (s, 3H), 2.78 (br, 8H), 2.58 (s, 3H). ¹³C NMR (176 MHz, MeOD-*d*₄) δ 167.87, 163.32, 161.58, 145.25, 139.72, 133.55, 132.89, 132.74, 131.84, 131.00, 130.32, 130.15, 128.64, 126.50, 125.14, 124.94, 124.58, 119.34, 108.58, 91.08, 89.73, 58.27, 55.14, 51.33, 43.76, 49.00, 20.92. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 509.22712 für C₂₇H₂₈F₃N₆O [M+H⁺]. Gefunden: 509.22859.

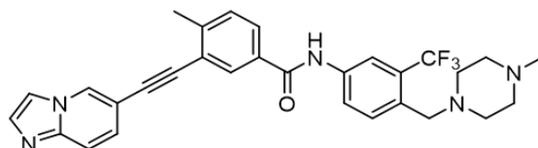


6.2.1.26 3-((2-((Methoxymethyl)amino)pyrimidin-5-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7g)

Die Substanz **7g** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als beigefarbener Feststoff (2 mg, 0.003 mmol, 1 %) erhalten.

¹H NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.43 (s, 2H), 8.12 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.59-3.56 (m, 2H), 3.56 – 3.53 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.03 (br, 4H), 2.68 (s, 3H), 2.67 (br, 4H), 2.55 (s, 3H).

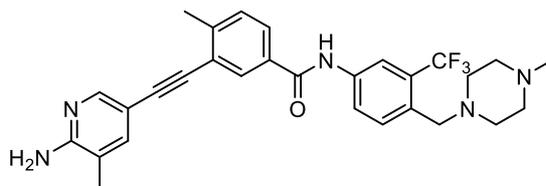
^{13}C NMR (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 168.08, 162.26, 161.47, 145.37, 139.75, 133.70, 133.67, 133.35, 132.83, 131.94, 131.11, 130.44, 130.24, 128.72, 126.78, 125.24, 124.82, 119.43, 108.37, 91.19, 90.09, 72.20, 59.13, 58.53, 55.39, 52.10, 49.00, 42.08, 21.08. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 567.26953 für $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 567.26899.



6.2.1.27 3-(Imidazo[1,2-a]pyridin-7-ylethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7h)

Die Substanz **7h** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als beigefarbener Feststoff (2 mg, 0.004 mmol, 1 %) erhalten.

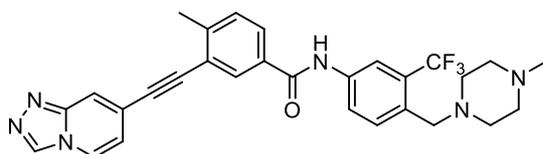
^1H NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 10.35 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.41 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.24 (br, 4H), 2.86 (s, 3H), 2.75 (br, 4H), 2.57 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 167.91, 145.77, 139.82, 133.66, 133.59, 133.03, 132.85, 132.29, 131.25, 131.19, 130.38, 129.48, 129.09, 126.94, 125.43, 125.23, 124.75, 124.24, 120.32, 119.52, 119.47, 117.62, 110.84, 91.23, 89.72, 58.39, 55.10, 51.24, 43.75, 21.09. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 532.23187 für $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 532.23129



6.2.1.28 3-((6-Amino-5-methylpyridin-3-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7i)

Die Substanz **7i** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (2.6 mg, 0.005 mmol, 2 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.95 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H), 7.81 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.41 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 2.87 (br, 4H), 2.65 (br, 4H), 2.56 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.02 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 168.02, 159.05, 148.94, 145.08, 141.02, 139.50, 136.38, 135.67, 135.60, 133.63, 133.51, 132.63, 131.64, 131.56, 131.48, 130.91, 128.24, 126.50, 125.13, 119.20, 118.38, 109.94, 93.34, 88.33, 55.71, 52.83, 20.95, 16.89. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 522.24752 für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$, Gefunden: 522.24701



6.2.1.29 3-([1,2,4]Triazolo[4,3-a]pyridin-7-ylethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7j)

Die Substanz **7j** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (1.8 mg, 0.003 mmol, 1.5 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 9.22 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.16 (dd, $J = 6.7, 2.0$ Hz, 1H), 8.01 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 9.4, 1.3$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.30 – 3.17 (br, 4H), 2.88 (s, 3H), 2.95 – 2.74 (br, 4H), 2.63 (s, 3H).

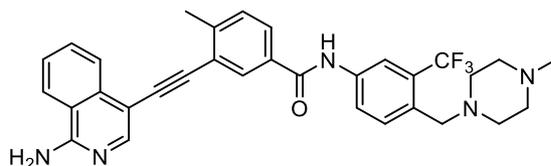
^{13}C NMR (176 MHz, MeOD- d_4) δ 167.60, 145.84, 139.66, 133.67, 132.94, 132.83, 132.76, 132.36, 131.17, 130.34, 130.16, 129.37, 128.95, 126.50, 125.11, 123.64, 119.26, 116.10, 112.51, 90.67, 89.97, 55.16, 51.24, 43.76, 20.88. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 533.22712 für $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 533.22670.



6.2.1.30 3-((6-Aminopyridin-3-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (7k)

Die Substanz **7k** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (2.1 mg, 0.004 mmol, 1 %) erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁰¹

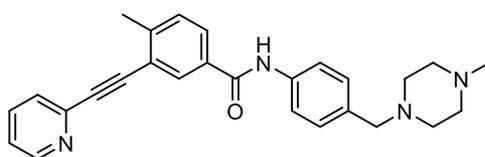
^1H NMR (600 MHz, MeOD- d_4) δ 8.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.98 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.13 (br, 4H), 2.72 (s, 3H), 2.63 (br, 4H), 2.56 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD- d_4) δ 168.03, 160.42, 151.44, 145.21, 141.46, 139.63, 135.66, 135.57, 133.48, 133.16, 132.69, 131.67, 130.94, 130.28, 130.07, 128.27, 126.65, 124.81, 119.28, 119.24, 93.19, 88.41, 58.46, 55.74, 51.94, 44.45, 21.04. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 522.24752 für $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 522.24701.



6.2.1.31 3-((1-Aminoisoquinolin-4-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (71)

Die Substanz **71** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (2.8 mg, 0.005 mmol, 2.3 %) erhalten.

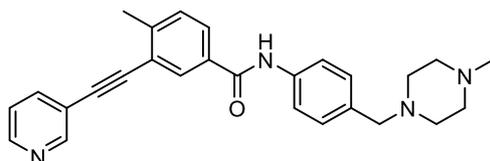
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.44 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.93 – 7.90 (m, 1H), 7.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.18 (br, 4H), 2.93 (s, 3H), 2.70 (s, 3H), 2.49 (br, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 168.01, 155.89, 145.95, 139.99, 137.79, 137.17, 134.02, 133.07, 132.72, 132.58, 131.46, 131.09, 129.50, 127.63, 127.01, 125.46, 124.15, 119.66, 119.31, 108.63, 94.53, 87.70, 58.45, 55.31, 51.32, 43.78, 21.38. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 558.24752 für $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 558.24854.



6.2.1.32 4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-3-(pyridin-2-ylethynyl)benzamid (8a)

Die Substanz **8a** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als gelber Feststoff (9 mg, 20 μmol , 4 %) erhalten.

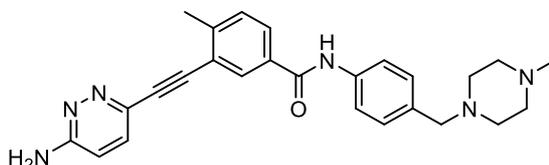
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.58 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.93 - 7.87 (m, 2H), 7.73 – 7.67 (m, 3H), 7.41 - 7.43 (m, 2H), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.53 (s, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.52 (s, 8H), 2.29 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 167.61, 150.78, 146.00, 143.85, 138.76, 134.05, 132.49, 131.15, 130.95, 129.60, 128.88, 124.96, 123.36, 122.28, 93.44, 88.66, 62.12, 54.72, 51.03, 43.70, 20.87. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 425.23359 für $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 425.23484.



6.2.1.33 4-Methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-3-(pyridin-3-ylethynyl)benzamid (8b)

Die Substanz **8b** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (3 mg, 8 μ mol, 2 %) erhalten.

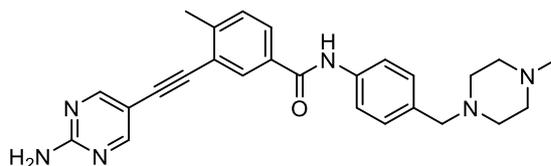
^1H NMR (500 MHz, MeOD- d_4) δ 8.72 (s, 1H), 8.53 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 8.11 (m, 1H), 8.00 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.44 - 7.49 (m, 2H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.62 (s, 2H), 2.97 (b, 4H), 2.69 (b, 4H), 2.63 (s, 3H) 2.59 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD- d_4) δ 167.64, 152.36, 149.48, 145.51, 140.43, 139.37, 134.04, 132.21, 131.05, 130.95, 129.24, 125.11, 123.78, 122.24, 122.07, 91.85, 91.13, 62.55, 55.06, 51.89, 44.50, 20.87. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 425.23359 für $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 425.23451.



6.2.1.34 3-((6-Aminopyridazin-3-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)benzamid (8c)

Die Substanz **8c** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (1.1 mg, 2.3 μ mol, 1 %) erhalten.

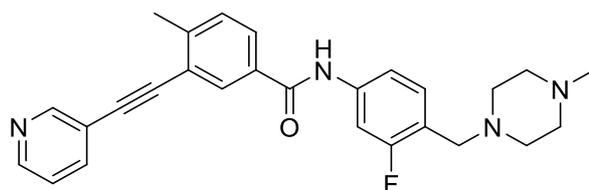
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.26 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.54 - 7.41 (m, 2H), 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (s, 2H), 6.79 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.33 (b, 8H), 2.14 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD- d_4) δ 167.68, 160.79, 155.95, 143.88, 139.18, 138.76, 134.88, 134.64, 132.48, 131.14, 130.73, 128.86, 124.95, 122.20 121.57, 93.41, 88.68, 62.36, 29.84, 26.03, 20.87. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 441.23974 für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 441.23991. Berechnet: 463.22168 für $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{ONa}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$. Gefunden: 463.22141.



6.2.1.35 3-((2-Aminopyrimidin-5-yl)ethynyl)-4-methyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)benzamid (**8d**)

Die Substanz **8d** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als hellgelber Feststoff (6 mg, 16 μ mol, 3 %) erhalten.

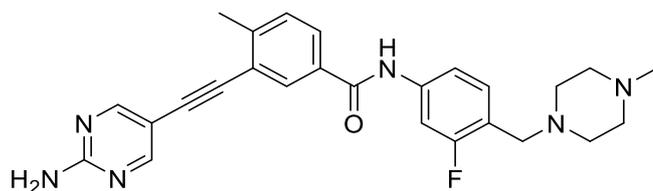
^1H NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.43 (s, 2H), 8.04 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J = 7.9$, 1.7 Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 2.94 (s, 3H), 2.69 (s, 4H), 2.61 (s, 4H), 2.56 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 163.30, 161.50, 145.00, 135.35, 133.95, 131.78, 130.97, 130.93, 130.18, 128.59, 124.50, 122.24, 108.71, 103.96, 89.58, 62.61, 55.13, 52.03, 44.62, 20.89. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 441.23974 für $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 441.24050.



6.2.1.36 *N*-(3-Fluoro-4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-4-methyl-3-(pyridin-3-ylethynyl)benzamid (**9a**)

Die Substanz **9a** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als hellgelber Feststoff (32 mg, 0.07 mmol, 14 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.48 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.61 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.06-8.01 (m, 1H), 7.94 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J = 12.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 2H), 7.34 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.48 (s, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.41 (br, 8H), 2.20 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.34, 161.18, 159.25, 151.38, 149.03, 143.60, 138.36, 132.16, 131.39, 130.57, 129.76, 128.36, 123.92, 121.43, 119.10, 115.55, 106.80, 106.58, 90.48, 90.28, 54.22, 54.03, 51.70, 45.10, 20.17. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 443.22417 für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{OF}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 443.22558, Berechnet: 465.20611 für $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{OFNa}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$. Gefunden: 465.20718.

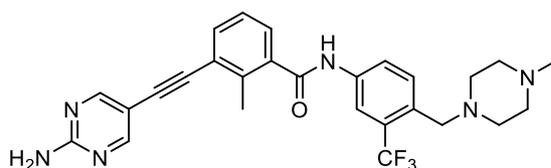


6.2.1.37 3-((2-Aminopyrimidin-5-yl)ethynyl)-*N*-(3-fluoro-4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**9b**)

Die Substanz **9b** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als hellgelber Feststoff (45 mg, 0.10 mmol, 19 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.39 (s, 1H), 8.46 (s, 2H), 8.06 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 12.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.37-7.29 (m, 1H), 7.17 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.32 (br, 8H), 2.14 (s, 3H);

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.51, 162.93, 162.24, 161.11, 160.31, 143.98, 140.57, 133.15, 132.41, 132.36, 131.05, 130.68, 128.62, 123.36, 120.29, 120.17, 116.56, 107.81, 106.61, 90.75, 90.52, 55.47, 55.16, 53.05, 46.45, 21.27. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 459.23031 für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{OF}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 459.23137. Berechnet: 481.21226 für $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{OFNa}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$. Gefunden: 481.21226.

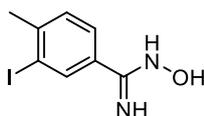


6.2.1.38 3-((2-Aminopyrimidin-5-yl)ethynyl)-2,4-dimethyl-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (10)

Die Substanz **10** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (1.3 mg, 0.002 mmol, 1.6 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.50 (s, 2H), 8.11 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.00 – 7.90 (m, 1H), 7.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.37 – 7.30 (m, 1H), 3.79 (s, 2H), 2.98 (br, 4H), 2.91 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.50 (br, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 171.74, 162.00, 140.55, 139.66, 139.22, 135.37, 133.81, 133.58, 131.37, 131.13, 129.10, 127.96, 127.59, 126.24, 125.39, 119.54, 119.49, 109.56, 92.57, 89.80, 59.01, 55.81, 51.88, 49.86, 44.33, 19.03. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 509.22712 für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{IN}_6\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 509.22656.

6.2.2 Synthese reversibler KIT Inhibitoren: Oxadiazole-Derivate



6.2.2.1 N-hydroxy-3-iodo-4-methylbenzimidamid (**28**)

NH₂OH (50 % wt in H₂O, 3.5 mL, 60mmol) wurden zu einer Lösung von 3-Amino-4-methylbenzimidamid (**27**) (2.5 g, 10mmol) in EtOH (25 ml) gegeben. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde bei 70 °C für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion, wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, um 3-Amino-N-hydroxy-4-methylbenzimidamid (**28**) in quantitativer Ausbeute (2.7 g, 10 mmol, 99 % erhalten).

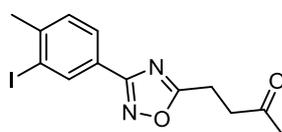
¹H NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.09 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD-*d*₄) δ 153.78, 144.15, 137.58, 133.54, 130.55, 127.14, 101.19, 28.08. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 277.07 für C₈H₁₀IN₂O [M+H⁺]. Gefunden: 277.09.

6.2.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AVV 3): Synthese von 1,2,4-Oxadiazolen

Zu einer Lösung von Benzamidoxims (**28**) (1 eq.) in Dioxan (20 ml) wurde bei 0 °C die entsprechenden Säurechloride (2 eq.) und BF₃·OEt₂ (5 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei rt gerührt und anschließend für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und der abgekühlte Rückstand in Eiswasser (10 ml) gegeben. Die erhaltene wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Das resultierende Rohprodukt wurde durch Flash Säulenchromatographie (10 % EtOAc/Cyclohexan) gereinigt, um die gewünschte Aryloxadiazole zu erhalten.

6.2.2.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AVV 4): Synthese von 1,2,4-Oxadiazolen

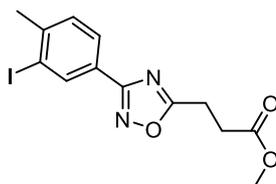
Zu einer Lösung der jeweiligen Carbonsäure (2 eq.) in DMF (5 ml) wurde langsam CDI (2 eq.) gegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde bei rt für 30 min gerührt. Dann wurde **28** (1 eq.) zugegeben und die Reaktion für 12 h bei 110 °C weitergerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Wasser (50 mL) gegossen, mit EtOAc (3x50 ml) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und die flüchtigen Bestandteile unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch säulenchromatographisch (50 % EtOAc/Cyclohexan) gereinigt, um die gewünschten 1,2,4-Oxadiazolen zu isolieren.



6.2.2.4 4-(3-(3-Iodo-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butan-2-on (29c)

Die Substanz **29c** wurde wie in der AAV 4 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (509 mg, 1.4 mmol, 79 %) erhalten.

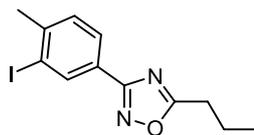
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 8.42 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J* = 10.3, 3.9 Hz, 2H), 3.05 (dd, *J* = 10.3, 3.8 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.17 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 206.99, 181.06, 167.62, 145.94, 138.13, 131.25, 127.88, 127.20, 101.55, 39.64, 29.87, 28.37, 21.49. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 357.16 für C₁₃H₁₄IN₂O₂ [M+H⁺]. Gefunden: 357.00.



6.2.2.5 Methyl 3-(3-(3-iodo-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)propanoat (29b)

Die Substanz **29b** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als hellgelber Feststoff (559 mg, 1.5 mmol, 83 %) erhalten.

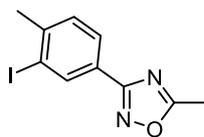
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.35 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, $\text{DMSO } d_6$) δ 179.52, 171.78, 165.98, 144.64, 136.53, 130.57, 126.71, 125.47, 101.66, 51.67, 29.58, 27.56, 21.59. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 372.99 für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 372.91.



6.2.2.6 3-(3-Iodo-4-methylphenyl)-5-propyl-1,2,4-oxadiazol (29j)

Die Substanz **29j** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (460 mg, 1.4 mmol, 78 %) erhalten.

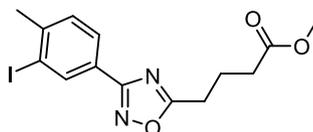
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.67 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.11 – 1.98 (m, 2H), 1.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 180.36, 167.05, 144.91, 137.86, 130.24, 127.29, 126.32, 101.44, 28.76, 28.56, 20.53, 13.95. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 329.15 für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 328.99.



6.2.2.7 3-(3-Iodo-4-methylphenyl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazole (29k)

Die Substanz **29k** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (502 mg, 1.7 mmol, 93 %) erhalten.

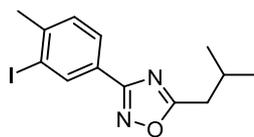
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.49 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.66 (s, 3H), 2.47 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 176.93, 166.94, 144.97, 137.69, 130.10, 127.09, 125.87, 101.25, 67.19, 28.38, 12.54. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 301.1 für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{IN}_2\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 300.98.



6.2.2.8 Methyl 4-(3-(3-iodo-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butanoate (29a)

Die Substanz **29a** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als hellgelber Feststoff (493 mg, 1.3 mmol, 71 %) erhalten.

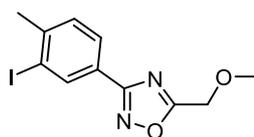
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.46 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 2.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.47 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.18 (m, $J = 7.3$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 179.15, 172.95, 166.83, 144.74, 137.56, 129.96, 127.01, 125.92, 101.16, 51.82, 32.78, 28.29, 25.76, 21.63. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 387.18 für $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{IN}_2\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 386.94.



6.2.2.9 3-(3-Iodo-4-methylphenyl)-5-isobutyl-1,2,4-oxadiazol (29i)

Die Substanz **29k** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (497 mg, 1.5 mmol, 82 %) erhalten.

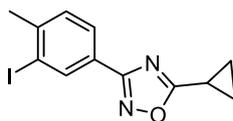
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.50 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.80 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.30 – 2.21 (m, 1H), 1.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 179.54, 166.82, 144.69, 137.62, 129.98, 127.05, 126.14, 101.21, 35.41, 28.33, 27.55, 22.41. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 342.18 für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{IN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 342.90.



6.2.2.10 3-(3-Iodo-4-methylphenyl)-5-(methoxymethyl)-1,2,4-oxadiazol (29f)

Die Substanz **29f** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als hellgelber Feststoff (408 mg, 1.2 mmol, 69 %) erhalten.

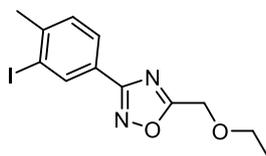
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.56 (s, 3H), 2.49 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 176.15, 167.12, 145.17, 137.83, 130.12, 127.23, 125.64, 101.27, 65.30, 59.86, 28.42. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 330.12 für $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{IN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 330.79.



6.2.2.11 5-Cyclopropyl-3-(3-iodo-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol (29h)

Die Substanz **29f** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (515 mg, 1.6 mmol, 88 %) erhalten.

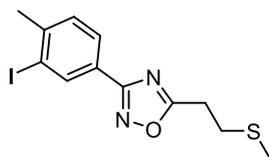
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.46 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.27 – 2.20 (m, 1H), 1.32 – 1.27 (m, 2H), 1.27 – 1.21 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 182.03, 167.08, 144.90, 137.88, 130.23, 127.31, 126.44, 101.44, 28.60, 10.59, 8.14. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 326.13 für $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{IN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 326.92.



6.2.2.12 5-(Ethoxymethyl)-3-(3-iodo-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol (29e)

Die Substanz **29e** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als gelber Feststoff (389 mg, 1.1 mmol, 63 %) erhalten.

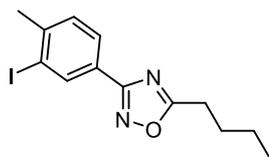
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.97 (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.72 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.49 (s, 3H), 1.31 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 176.47, 167.12, 145.13, 137.84, 130.11, 127.24, 125.71, 101.26, 67.81, 63.46, 28.42, 15.11. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 345.15 für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 344.92.



6.2.2.13 3-(3-Iodo-4-methylphenyl)-5-(2-(methylthio)ethyl)-1,2,4-oxadiazol (29d)

Die Substanz **29d** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als gelber Feststoff (382 mg, 1 mmol, 59 %) erhalten.

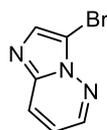
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (s, 1H), 7.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.25 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.00 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.17 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 178.29, 167.04, 144.94, 137.72, 130.08, 127.14, 125.95, 101.25, 30.67, 28.39, 27.19, 15.67. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 361.21 für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 360.86.



6.2.2.14 5-Butyl-3-(3-iodo-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol (29g)

Die Substanz **29g** wurde wie in der AAV 3 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als gelber Feststoff (486 mg, 1.4 mmol, 79 %) erhalten.

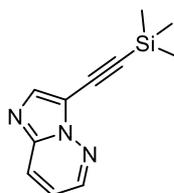
^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.37 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.94 – 7.87 (m, 1H), 7.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.99 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.80 – 1.69 (m, 2H), 1.44 – 1.33 (m, 2H), 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 180.59, 166.04, 144.60, 136.56, 130.61, 126.74, 125.63, 101.69, 27.97, 27.57, 25.44, 21.53, 13.45. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 343.18 für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{IN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 343.01.



6.2.2.15 3-Bromoimidazo[1,2-b]pyridazin (**32**)

Imidazo[1,2-b]pyridazin (6,0 g, 50,4 mmol), NBS (6,0 g, 75,6 mmol) und eine katalytische Menge AIBN wurden zu 50 ml Chloroform gegeben und das Reaktionsgemisch wurde 2 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde diese auf rt abgekühlt und anschließend in Eiswasser 100 mL gegossen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck konzentriert, um das gewünschte Produkt als grauen Feststoff (7 g, 35.8 mmol, 71 %) zu erhalten.

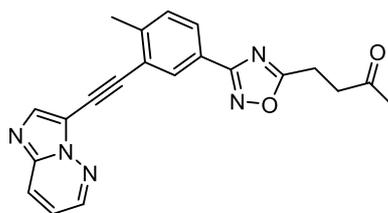
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8,50 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 8,01-7,98 (m, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,15-7,12 (m, 1H).



6.2.2.16 3-((Trimethylsilyl)ethynyl)imidazo[1,2-b]pyridazin (**30**)

3-Bromoimidazo[1,2-b]pyridazin (**30**) wurde wie in AAV 1 beschrieben synthetisiert. Das Produkt **28** wurde per LCMS nachgewiesen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

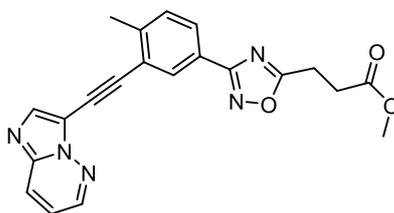
LCMS (ESI-MS): Berechnet: 216.09 für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 216.21.



6.2.2.17 4-(3-(3-(Imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butan-2-on (26c)

Die Substanz **26c** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (14 mg, 0.03 mmol, 21 %) erhalten.

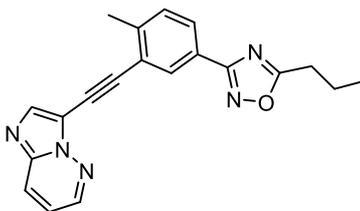
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.74 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.26 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.2, 4.2$ Hz, 1H), 3.14 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 2.18 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 206.17, 180.16, 166.64, 145.11, 142.82, 138.35, 130.74, 129.29, 127.13, 126.26, 124.31, 122.61, 119.08, 95.94, 81.44, 38.56, 29.52, 20.37. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 372.4 für $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 372.23.



6.2.2.18 Methyl 3-(3-(3-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)propanoat (26b)

Die Substanz **26b** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (33 mg, 0.09 mmol, 32 %) erhalten.

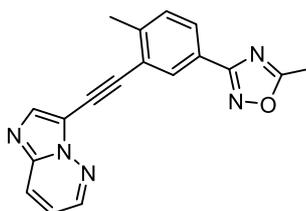
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.74 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 10.6$ Hz, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.97 – 7.93 (m, 1H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 9.2, 4.4$ Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.96 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.61 (s, 3H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 388.39 für $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 388.32.



6.2.2.19 3-(3-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-5-propyl-1,2,4-oxadiazol (26j)

Die Substanz **26j** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (24 mg, 0.07 mmol, 32 %) erhalten.

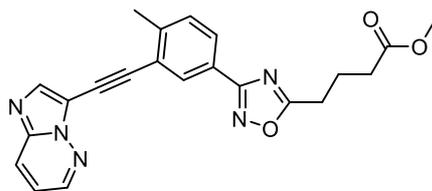
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.75 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 8.9, 4.3$ Hz, 1H), 3.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.84 (dd, $J = 14.7, 7.3$ Hz, 2H), 1.01 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 344.39 für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 344.41.



6.2.2.20 3-(3-(Imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol (26k)

Die Substanz **26k** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (65 mg, 0.33 mmol, 62 %) erhalten.

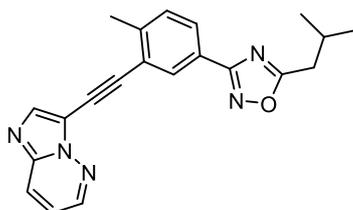
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.73 (dd, $J = 4.3, 1.1$ Hz, 1H), 8.26 (dd, $J = 9.2, 1.3$ Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 9.2, 4.4$ Hz, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.60 (s, 3H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 316.34 für $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 316.24.



6.2.2.21 Methyl 4-(3-(3-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butanoat (26a)

Die Substanz **26a** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (12 mg, 0.33 mmol, 12 %) erhalten.

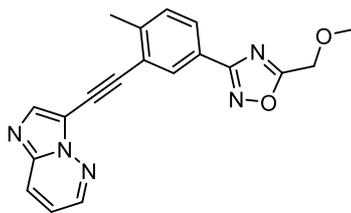
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.76 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.97 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.32 (t, 2H), 3.06 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.06 (m, $J = 7.4$ Hz, 2H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 402.42 für $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 402.44.



6.2.2.22 3-(3-(Imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-5-isobutyl-1,2,4-oxadiazol (26i)

Die Substanz **26i** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (9.4 mg, 0.03 mmol, 9 %) erhalten.

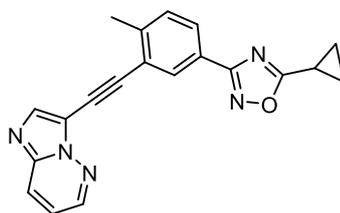
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.72 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.93 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz, 1H), 2.89 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.58 (s, 3H), 2.22 – 2.14 (m, 1H), 0.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 358.42 für $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 358.33.



6.2.2.23 3-(3-(Imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-5-(methoxymethyl)-1,2,4-oxadiazol (26f)

Die Substanz **26f** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als hellgelber Feststoff (4.2 mg, 0.01 mmol, 4 %) erhalten.

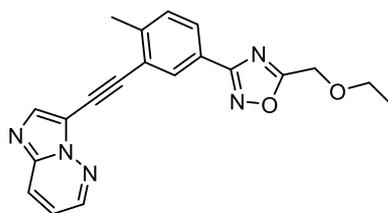
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.74 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 8.28 – 8.22 (m, 2H), 8.13 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.8, 4.1$ Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.61 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 177.11, 166.91, 145.10, 143.05, 139.69, 138.26, 130.79, 129.39, 127.34, 126.00, 123.73, 122.87, 119.18, 111.25, 96.01, 81.26, 64.45, 58.80, 20.41. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 346.36 für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 346.41.



6.2.2.24 5-Cyclopropyl-3-(3-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol (26h)

Die Substanz **26h** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (18.8 mg, 0.06 mmol, 18 %) erhalten.

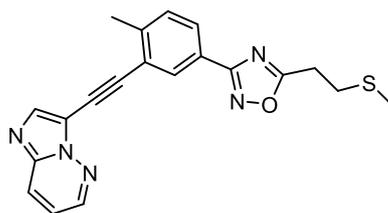
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.73 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 8.27 – 8.24 (m, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 9.2, 4.4$ Hz, 1H), 2.59 (s, 3H), 2.41 (ddd, $J = 13.0, 8.5, 4.8$ Hz, 1H), 1.32 – 1.28 (m, 2H), 1.23 – 1.19 (m, 2H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 342.37 für $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 342.41.



6.2.2.25 5-(Ethoxymethyl)-3-(3-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol (26e)

Die Substanz **26e** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (3 mg, 0.009 mmol, 3 %) erhalten.

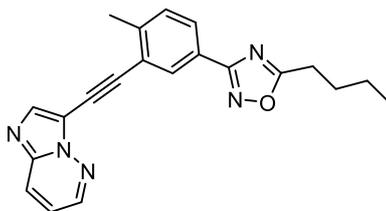
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.75 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 4.87 (s, 2H), 3.65 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 360.39 für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 360.42.



6.2.2.26 3-(3-(Imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-5-(2-(methylthio)ethyl)-1,2,4-oxadiazol (26d)

Die Substanz **26d** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (2 mg, 0.006 mmol, 2 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.74 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.13 (dd, $J = 15.3, 1.4$ Hz, 1H), 7.97 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 9.1, 4.4$ Hz, 1H), 3.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.99 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.13 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 179.38, 166.93, 145.27, 143.10, 138.60, 131.07, 130.63, 129.51, 127.37, 126.28, 124.41, 122.83, 120.39, 119.27, 96.20, 81.60, 29.76, 26.53, 20.57, 14.64. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 376.45 für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 376.41.

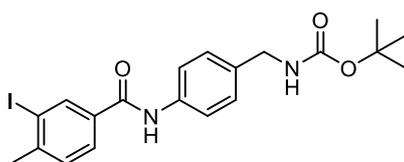


6.2.2.27 5-Butyl-3-(3-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol (26g)

Die Substanz **26g** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (11 mg, 0.03 mmol, 11 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.75 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 8.28 (s, 2H), 8.11 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.96 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 3.01 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.82 – 1.74 (m, 2H), 1.45 – 1.36 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 181.10, 167.22, 167.14, 167.10, 145.62, 143.36, 143.30, 131.30, 129.83, 127.68, 124.85, 123.09, 119.55, 96.61, 91.65, 28.46, 25.94, 25.56, 22.01, 20.88, 13.98. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 358.42 für $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 358.42.

6.2.3 Synthese irreversibler KIT Inhibitoren

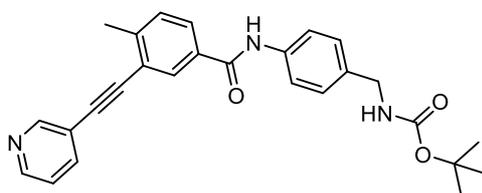


6.2.3.1 *Tert*-butyl (4-(3-iodo-4-methylbenzamido)benzyl)carbamate (39b)

Zu einer Lösung aus 4-*N*-Boc-(aminomethyl)anilin (1 g, 4.5 mmol) in 17 mL DCM wurden HATU (1.88 g, 4.95 mmol) und DIPEA (1.56 mL, 9.0 mmol) gegeben und für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 3-Iodo-4-methylbenzoesäure (1.18 g, 4.5 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für weitere 4 h bei rt umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung und DCM (4x20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Eine säulenchromatographische Reinigung wurde an Kieselgel (50 % EtOAc/PE) durchgeführt.

Nach Entfernung des Lösungsmittels im Hochvakuum wurde das gewünschte Produkt 31 (1.57 g 3.38 mmol, 74 %) als bräunlicher Feststoff isoliert.

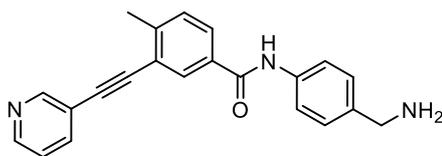
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.21 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.9 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.32 – 7.36 (m, 1H), 7.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.09 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.44 (s, 3H) 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 163.46, 155.73, 144.55, 137.48, 137.39, 135.56, 134.02, 129.68, 127.65, 127.18, 120.36, 100.99, 77.70, 43.01, 28.23, 27.47. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 467.08261 für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{IN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 467.08313.



6.2.3.2 *Tert*-butyl (4-(4-methyl-3-(pyridine-3-ylethynyl)benzamido)benzyl) Carbamate (**40b**)

Die Substanz **40b** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde als cremefarbener Feststoff (698 mg, 1.6 mmol, 65 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10.26 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.63 (m, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.03 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.22 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). HRMS (ESI-MS): Berechnet: 442.21252 für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 442.21340, berechnet: 464.19446 für $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$. Gefunden: 464.19561.



6.2.3.3 *N*-(4-(Aminomethyl)phenyl)-4-methyl-3-(pyridin-3-ylethynyl)benzamid (41b)

Zu einer Lösung aus **40b** (70 mg 0.15 mmol) in 5 mL DCM wurden 1.25 mL Trifluoressigsäure (TFA) gegeben und für 30 min bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 %-iger NaOH-Lösung in ein alkalisches Milieu überführt und anschließend mit EtOAc (3x15 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Zielmolekül **41b** wurde ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

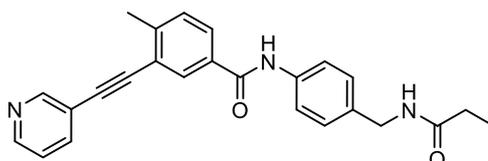


6.2.3.4 *N*-(4-(acrylamidomethyl)phenyl)-4-methyl-3-(pyridin-3-ylethynyl)benzamid (33)

41b (25 mg, 73 μ mol) wurde bei -70 °C in 3 mL THF und 128 μ L DIPEA (0.73 mmol) gelöst. Acryloylchlorid (14.5 μ L 0.18 mmol) wurde in 0.5 mL THF gelöst und langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung für 1.5 h bei -70 °C gerührt. Nachdem die Lösung auf rt aufgewärmt war, wurde diese mit Wasser aufgenommen. Eine Extraktion wurde mit EtOAc (3x15 mL) durchgeführt und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt. Durch säulenchromatographische (1-6 % MeOH/DCM) Reinigung wurde **33** (4 mg, 10 μ mol, 14 %) als weißer Feststoff isoliert.

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.74 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.88, (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52 – 7.48 (m, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H) 6.31 – 6.24 (m, 2H), 5.69 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 4.44 (s, 2H), 2.61 (s, 3H).

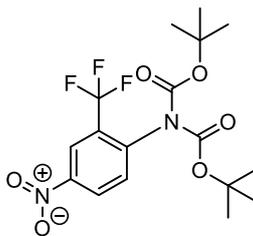
^{13}C NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 166.58, 166.25, 150.96, 148.08, 139.09, 137.57, 134.67, 132.69, 132.40, 131.74, 131.65, 130.81, 130.57, 129.66, 128.63, 127.79, 125.56, 123.76, 122.37, 120.95, 90.44, 89.69, 42.35, 19.47. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 396.17065 für $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 396.17138, Berechnet: 418.15260 für $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ Na $[\text{M}+\text{Na}^+]$. Gefunden: 418.15368.



6.2.3.5 4-Methyl-N-(4-(propionamidomethyl)phenyl)-3-(pyridin-3-ylethynyl)benzamid (34)

Zu einer Lösung von **41b** (25 mg, 73 μmol) in 3 mL THF wurde bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ DIPEA (128 μL , 0.73 mmol) hinzugegeben und Propionylchlorid (16 μL , 0.18 mmol) in 0.5 mL THF zugetropft. Die Suspension wurde für 1.5 h bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ umgesetzt. Nach Erwärmen der Reaktionsmischung auf rt, wurde diese mit Wasser aufgenommen und mit EtOAc (3x15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (1-6 % MeOH/DCM) wurde **34** (7 mg, 17.6 μmol , 24 %) als weißer Feststoff erhalten.

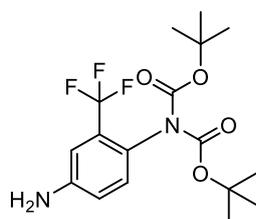
^1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 8.74 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.02 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.65 – 7.68 (m, 2H), 7.48 - 7.51 (m, 1H), 7.46 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.26 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.16 (t, J = 7.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 175.50, 166.25, 150.96, 148.08, 144.10, 139.10, 137.45, 132.70, 131.65, 130.81, 129.66, 128.63, 127.87, 127.65, 123.76, 122.37, 120.93, 120.70, 90.44, 89.69, 42.25, 28.80, 19.41, 9.13. HRMS (ESI-MS): Berechnet: 398.18630 für $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 398.18625, Berechnet: 420.16825 für $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$. Gefunden: 420.16857.



6.2.3.6 C,C'-Bis-tert-butyl N-4-amino-2-trifluoromethylphenyl)iminodicarbonat (37a)

Zu einer Lösung des Nitroanilins **36a** (1 g, 4.85 mmol) in THF (5 ml) wurden Et₃N (1 ml, 7.2 mmol) und DMAP (390 mg, 3.2 mmol) gegeben. Zu diesem wurde Di-tert-butylidicarbonat (2.2 ml, 10.2 mmol) gegeben, und die Reaktion wurde 5 h unter Rückfluss gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann abgekühlt, mit THF (250 ml) verdünnt und mit gesättigter NaCl-Lösung (250 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck konzentriert, um das Rohprodukt zu erhalten. Das Rohprodukt wurde weiter durch Säulenchromatographie (2-20 %EtOAc/Cyclohexan) gereinigt, um das entsprechende Di-Boc-geschütztes Nitroanilin (**37a**) (1.7 g, 4.4 mmol, 90 %) als weißen kristallinen Feststoff zu erhalten.

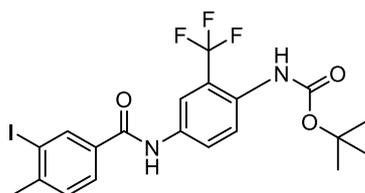
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.44 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 1.38 (s, 18H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 149.92, 147.25, 143.40, 132.92, 129.55, 129.30, 127.76, 123.50, 123.03, 122.99, 121.32, 84.75, 77.67, 77.41, 77.16, 77.16, 28.10.



6.2.3.7 C,C'-Bis-tert-butyl N-4-amino-2-trifluoromethylphenyl)iminodicarbonat (38a)

Zu einer Lösung von **37a** (1.7 g, 4.4 mmol) in MeOH (5 ml) wurde über 10 % Pd/C (0,1 g, 0,94 mmol) bei rt für 12 h hydriert (H₂). Das Reaktionsgemisch wurde über Celite® filtriert, unter vermindertem Druck konzentriert, um das entsprechende Anilin (**38a**) als einen cremefarbenen Feststoff (1.6 g, 4.35 mmol, 99 %) zu erhalten.

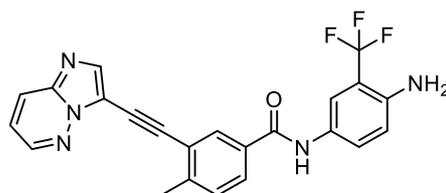
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.03 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.38 (br, 1H), 1.37 (s, 18H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 151.41, 144.36, 139.68, 131.94, 129.14, 128.40, 128.17, 126.23, 124.40, 122.77, 122.59, 119.61, 114.17, 83.27, 77.67, 77.16, 27.96. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 377.38 für $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 377.02.



6.2.3.8 *Tert*-butyl (4-(3-iodo-4-methylbenzamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**39a**)

38a (250 mg, 0.66 mmol), HATU (281 mg, 0.74 mmol) und DIPEA (1 ml, 10.1 mmol) wurden in DCM (5 ml) gelöst und 30 min bei rt gerührt. Dann wurde 3-Iod-2-methylbenzoesäure (197 mg, 0.74 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gequenchet und mit EtOAc (4×5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (1-10 % MeOH/DCM) lieferte **39a** als cremefarbenen Feststoff (164.7 mg, 0,32 mmol, 48 %).

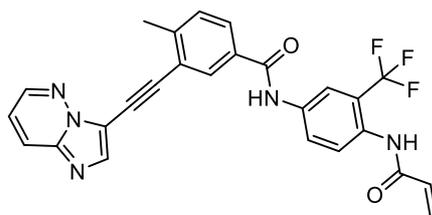
^1H NMR (600 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 8.37 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.48 (s, 9H). LCMS (ESI-MS): Berechnet: 520.29 für $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{IN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. Gefunden: 520.72.



6.2.3.9 *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid (41a)

Die Substanz **39a** wurde wie in der AAV 2 beschrieben synthetisiert und nach Aufarbeitung ohne weiterer Aufreinigung direkt Entschützt. Die Boc-Entschützung wurde mit 0.5 mL TFA verdünnt in 2 mL DCM für 30 min bei rt durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 %-iger NaOH-Lösung in ein alkalisches Milieu überführt und anschließend mit EtOAc (3x15 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie wurde das gewünschte Produkt als cremefarbener Feststoff (10.4 mg, 0.02 mmol, 25 %) erhalten.

¹H NMR (700 MHz, MeOD-*d*₄) δ 8.74 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 2.65 (s, 3H). ¹³C NMR (176 MHz, MeOD-*d*₄) δ 167.28, 143.66, 133.99, 131.98, 131.86, 131.12, 129.72, 129.28, 128.00, 127.86, 127.07, 125.74, 125.52, 123.57, 122.07, 120.68, 120.65, 118.87, 98.27, 80.50, 65.54, 20.90, 19.30. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 436.41 für C₂₃H₁₇F₃N₅O [M+H⁺]. Gefunden: 436.38.



6.2.3.10 *N*-(4-acrylamido-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid (**33**)

41a (10 mg, 0.01 mmol) wurde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 2 mL THF und DIPEA (20 μL , 0.1 mmol) gelöst. Acryloylchlorid (1.2 μL 0.015 mmol) wurde in 0.5 mL THF gelöst und langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung für 1.5 h bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend für 5 h bei rt gerührt. Die Reaktion wurde anschließend mit Wasser gequentscht und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Reversed-Phase Flash Chromatographie gereinigt und **33** (1 mg, 0.002 mmol, 10 %) als weißer Feststoff isoliert.

^1H NMR (600 MHz, $\text{CD}_3\text{CN-}d_3$) δ 9.01 (s, 1H), 8.54 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.06 – 8.00 (m, 2H), 7.95 (dd, $J = 8.7$, 2.2 Hz, 1H), 7.88 (dt, $J = 10.0$, 5.0 Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26 (dt, $J = 13.4$, 6.7 Hz, 1H), 6.44 (dd, $J = 17.0$, 10.3 Hz, 1H), 6.33 (dd, $J = 16.9$, 1.4 Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 2.64 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{CD}_3\text{CN-}d_3$) δ 165.59, 164.99, 145.14, 144.83, 140.66, 138.73, 137.73, 133.02, 130.91, 130.70, 130.39, 130.34, 128.61, 127.87, 126.48, 124.56, 123.10, 119.22, 96.61, 81.55, 20.58. LCMS (ESI-MS): Berechnet: 490.46 für $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. Gefunden: 490.42.

6.3 Biochemische Charakterisierung

6.3.1 Allgemeine Anmerkungen

Die biochemische Charakterisierung in Form der Bestimmung der IC_{50} -Werte der synthetisierten Verbindungen und der Referenzverbindungen gegenüber diversen Kinasen erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen Cisbio KinEASE™ HTRF Assay, welcher bereits in Kapitel 3.3.4.1 vorgestellt wurde. Weiterhin fand dieses Assaysystem Anwendung bei der Charakterisierung der kinetischen Parameter der kovalenten Bindungsbildung nach Krippendorf *et al.*²⁶⁷.

Chemikalien und Reagenzien zur Vorbereitung von Puffer-, Protein- und Additivilösungen wurden von den Firmen Fisher Scientific, Carl Roth GmbH und Sigma-Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Die verwendeten Proteine wurden kommerziell über die Proqinase GmbH oder Life Technologies erworben (vgl. Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht über kommerziell bezogene Proteine.

Protein (aktiv)	Hersteller	Bestellnummer	Lotnummer
KIT, V559D/T670I	Proqinase GmbH	1044-0000-1	002
KIT, wt	Proqinase GmbH	0979-0000-1	010
KIT, V559D/V654A	Proqinase GmbH	1045-0000-1	001
KIT, D816H	Proqinase GmbH	1041-0000-1	002
VEGFR2, wt	Life Technologies	PV3660	1223246F

6.3.2 Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™)

6.3.2.1 Etablierung des HTRF-System

Das Messprinzip des Cisbio KinEASE™ HTRF Assay²²⁵ wurde bereits in Kapitel 3.3.4.1 vorgestellt. Die Generierung von IC₅₀-Werten mit diesem Assaysystem ist erst nach Durchführung gewisser Etablierungsschritte möglich, um zu gewährleisten, dass die bestimmten Daten auf reproduzierbaren und robusten Primärdaten basieren.

Sämtliche für dieses Assaysystem ermittelten Daten wurden in weißen Mikrotiterplatten im 384-well Format mit einem Kavitätvolumen von 25 µL der Firma Greiner Bio One GmbH erhoben. Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgte durch das PerkinElmer EnVision Multimode Platenauslesegerät bei einer Emissionswellenlänge von 620 nm (Eu-markierter Antikörper) und 665 nm (XL665-markiertes Streptavidin) 60 µs nach Anregung bei 317 nm.

Die Enzymaktivität wurde durch die Titration der Kinasen bestimmt. Die erhaltene optimale Proteinkonzentration wurde verwendet, um die Kinetik der Substratphosphorylierung und somit die optimale Inkubationszeit zu ermitteln. Die Durchführung dieser Etablierungsschritte erfolgte nach den Herstellerangaben und kann in der Dissertation von A. Richters nochmals im Detail nachgelesen werden.²⁸⁴ Im nächsten Schritt musste der Substrat/ATP-K_M bestimmt werden.

Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass der Assay stabile und solide Daten liefert, da der K_M die Konzentration des halbmaximalen katalytischen Umsatzes repräsentiert, sodass die zu untersuchenden Kinasen unter optimalen Umsatzbedingungen die Katalysereaktion vollziehen. Im Fall der Verwendung einer ATP-Konzentration im Bereich des ATP- K_{MS} wird zusätzlich verhindert, dass die Konkurrenzreaktion zwischen Inhibitor und ATP in einem Bereich liegt, der die Effektivität des Inhibitors artifiziell herabgesetzt. Den letzten Schritt der Etablierungsmaßnahmen stellte die Ermittlung des Fluorophorgehalts (XL665) dar. Die Anpassung des Fluorophorgehalts ermöglicht die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve bei einem maximalen Assayfenster (maximaler Faktor zwischen minimaler und maximaler Aktivität). Mögliche Fluorophor/Substrat-Verhältnisse sind 1/8, 1/4, 1/2, und 1/1. Der Fluorophorgehalt wurde mit den zuvor optimierten Konzentrationen an Kinase, ATP und Substrat, sowie mit der entsprechenden Reaktionszeit für die jeweilige Kinase bestimmt.

Die Durchführung der Etablierung des Substrat/ATP- K_{MS} erfolgte nach den Herstellerangaben und kann in der Dissertation von A. Richters nochmals im Detail nachgelesen werden.²⁸⁴ Die ermittelten optimalen Assayparameter sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Ermittelte Assayparameter zur Durchführung des KinEASE™ Assays (Cisbio Bioassays) für die untersuchten Kinasen.

Protein	Fluorophor/ Substrat	Substrat	Kinase/Kavität (ng)	ATP (μ M)	Substrat (μ M)	Rk-Zeit (min)
KIT, V559D/T670I	1/8	TK	3.1	20	0.45	25
KIT, wt	1/4	TK	5	30	0.33	25
KIT, V559D/V654A	1/8	TK	7	50	1	35
KIT, D816H	1/8	TK	2	12	1	30
VEGFR2, wt	1/8	TK	0.04	70	0.8	10

6.3.2.2 Arbeitsanweisung zur Generierung von IC₅₀-Werten mittels HTRF®

Die zuvor bestimmten optimalen Assayparameter für die jeweilige Kinase wurden für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurven herangezogen, um daraus anschließend die entsprechenden IC₅₀-Werte zu determinieren. Zunächst wurden 2.5 µL Kinasepuffer zur Generierung der Inhibitorverdünnungsreihe vorgelegt. Die Verdünnungsreihe (6-fach Verdünnung; 1.4 nM-20 µM) der untersuchenden Inhibitoren (10 mM DMSO-Stammlösung) wurden dazu via des akustischem Dispersionssystem ECHO 520 *Liquid Handler* der Firma Labcyte (Sunnyvale, California, USA) gemäß der Dosis-Wirkungs-Software Echo Dose Response v1.5.4 erstellt.

Der Kinasepuffer wurde nach den Herstellerangaben für den Cisbio KinEASE™ HTRF Assay²²⁵ für die jeweilige Kinase hergestellt (10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.01 % Triton X-100, 5 x HTRF-Puffer, ddH₂O).

Die Verdünnungsreihe wurde mit 5 µL der jeweiligen Kinase für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 2.5 µL der ATP/Substrat-Mischung mit der zuvor im Etablierungsprozess ermittelten Konzentrationen im Bereich der K_M-Werte der jeweiligen untersuchten Kinase (Tabelle 22). Als Substrat wurde das von Cisbio kommerziell vertriebene TK-Substrat für Tyrosinkinase verwendet. Die in der Enzymkinetik bestimmte optimale Reaktionszeit wurde für die jeweilige Kinasereaktion herangezogen und nach Ablauf durch 10 µL Stopplösung (Detektionspuffer, TK-Antikörper, STV-XL665) beendet. Das molare Verhältnis von Fluorophor zu Substrat betrug für die hier untersuchten Kinasen 1/4 und 1/8. Nach 1 h Inkubation mit der Stopplösung wurde der FRET bei einer Wellenlänge von 317 nm für die jeweilige Verdünnung angeregt und die daraus folgende Emission bei 665 nm sowie 620 nm detektiert. Der Quotient Em_{665 nm}/Em_{620 nm} der beiden Emissionswerte für die Kinasereaktion bei acht verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurde durch die Quattro Software Suite für die Determinierung von IC₅₀-Werten analysiert. Die Auftragung der, auf die Positiv-(Staurosporin) und Negativ-Kontrolle (DMSO) normierten Emissionswerte gegen die dazugehörige Inhibitorkonzentration liefert die IC₅₀-Werte. Die ermittelten Werte wurden jeweils in Duplikaten in mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen erhoben.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_i und k_{inakt} erfolgt prinzipiell nach der gleichen Arbeitsanweisung. Für die zeitaufgelöste Determinierung der IC_{50} -Werte wurde die Inhibitorverdünnung über unterschiedliche Zeiträume (2-90 min) inkubiert. Die abschließend bestimmten IC_{50} -Werte der untersuchten Inhibitoren wurden gegen die unterschiedlichen Inkubationszeitpunkte aufgetragen und K_i und k_{inakt} nach Krippendorff *et al.*²⁶⁷ ermittelt

6.3.2.3 Arbeitsanweisung zur Herstellung der verwendeten Puffer

Der 5 x HTRF-Puffer sowie der Detektionspuffer könne kommerziell von Cisbio erworben werden. Es ist allerdings auch möglich diese selbst herzustellen. Die genaue Reihenfolge der Zugabe der Puffer-Komponenten muss dabei strengst eingehalten werden um die Kompatibilität mit dem Assay zu garantieren.

Im Nachfolgenden sind die Mengen und die Zugabe-Reihenfolge der einzelnen Komponenten dargestellt:

5x HTRF-Puffer 100 mL:

5.96 g, HEPES (250 mM, 238.31 g/mol); 250 μ L Na_3VO_4 (200 mM Aliquot \pm 0.5 mM in 100 mL); 100 mg NaN_3 (0.1 %); pH auf 7 einstellen (NaOH); 50 mg BSA (0.05 %)

Detektionspuffer 500 mL:

5.96 g HEPES (50 mM, 238.31 g/mol) (pH 7.0); pH auf 7 einstellen (KOH); 0.5 g, BSA (0.1 %), KF (0.8 M, 58.1 g/mol); 3.72 g EDTA (20 mM, 372.34 g/mol)

Aktivierung des Orthovanadats:

Für 200 mM Lösung werden 0.32 g Na_3VO_4 in 10 mL dd H_2O gelöst. Mit 1N HCl und 1N NaOH wird die Lösung auf pH 10 gebracht (Gelbfärbung). Die Lösung wird anschließend gekocht bis sie farblos wird. Die Lösung wird auf rt abgekühlt und der Prozess von pH-Einstellung, Kochen und Abkühlen wird solange wiederholt bis die Lösung farblos bleibt und der pH konstant bei 10 verweilt. Die Lagerung des aktivierten Na_3VO_4 erfolgt bei -20 °C.

6.4 Charakterisierung in GIST-Zelllinien

6.4.1 GIST-Zelllinien

Eine vollständige Vorstellung der hier untersuchten GIST-Zelllinien erfolgte bereits in Kapitel 3.3.5.

6.4.2 Methoden und Materialien

Zellkultivierung

Die Kultivierung der humanen GIST-Zelllinien erfolgte im Inkubator der Firma Binder in einer wasserdampfgesättigten, 5 %-igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank Herasafe/KS, Thermo Scientific) durchgeführt. Alle verwendeten Medien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden steril eingekauft, steril filtriert oder durch Autoklavieren sterilisiert. Medien und Lösungen die in Kontakt mit den Zellen kommen wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Medienzusammensetzung.

Kultivierungsmedium für GIST430-V654A	83 % IMDM-Iscove's Modified Dulbecco's Media (1x) (Gibco™ by Life Technologies) + BPE und MITO+ + Imatinib 100 nM 1 % L-Glutamin 15 % FCS 1 % Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin
Kultivierungsmedium für GIST-48B	83 % IMDM-Iscove's Modified Dulbecco's Media (1x) (Gibco™ by Life Technologies) 1 % L-Glutamin 15 % FCS 1 % Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin
Kultivierungsmedium für GIST-T1	89 % DMEM High Glucose (4,5g Glucose) GlutaMAX™ (Gibco™ by Life Technologies) 10 % FCS 1 % Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin
Kultivierungsmedium GIST-T1-D816E	83 % IMDM-Iscove's Modified Dulbecco's Media (1x) (Gibco™ by Life Technologies) + Imatinib 200 nM 1 % L-Glutamin 15 % FCS 1 % Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin
Kultivierungsmedium GIST-T1-T670I-	89 % DMEM High Glucose (4,5g Glucose) GlutaMAX™ (Gibco™ by Life Technologies) + Imatinib 1 µM 10 % FCS 1 % Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin

Einfriermedien	74 % IMDM/ DMEM GlutaMAX™ 15 % FCS 10 % DMSO 1 % Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin
-----------------------	--

Passagieren der GIST-Zellen

Haben die Zellen eine ausreichende Konfluenz erreicht werden sie passagiert. Die Zeiträume für das Passagieren sowie das Passagen-Verhältnis der einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Zellen mögen schon vorher konfluent wirken, die angegebenen Zeitangaben sollten aber nicht unterschritten werden.

Tabelle 24: Zeiträume für das Passagieren der GIST-Zelllinien.

Zelllinie	Passagieren nach	Passagen-Verhältnis
GIST430-V654A	<u>7 d</u> (könne schon nach 2-3 d konfluent wirken)	1:3-1:4
GIST-48B	<u>7 d</u> (könne schon nach 2-3 d konfluent wirken)	1:5-1:6
GIST-T1	<u>7 d</u>	1:6-1:8
GIST-T1-D816E	<u>5 d/7 d</u>	1:4/1:6
GIST-T1-T670I-	<u>5 d/7 d</u>	1:4/1:6

Zur Ablösung der adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit DBPS gewaschen bevor sie mit einer 0.25 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung (2.5 mL/T-75-Kultivierungsflaschen, (Sarstedt)) für 3-5 min inkubiert wurde. Die abgelösten Zellen wurden anschließend mit 10.5 mL frischem Medium aufgenommen und bei 1000 rpm bei 25 °C sedimentiert (5 min). Das Zellpellet wurde dann in 10 mL frischen Medium resuspendiert. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen in den in Tabelle 24 angegebenen Passagen-Verhältnis in insgesamt 12 mL des entsprechenden Mediums ausgesät, sodass eine Zellkonzentration von ca. 1×10^6 Zellen pro T-75 Flasche erreicht wurde.

Kryokonservieren von Zellen

Für die Kryokonservierung der Zellen wurde von der jeweiligen Zellpassage das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert. 1 mL mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml der jeweiligen Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und 24 h in einem *Freezing Container* langsam auf -80°C heruntergekühlt. Die endgültige Lagerung der Zellen erfolgte bei -150°C .

Auftauen der kryokonservierten Zellen

Für das Auftauen der kryokonservierten Zellen (-150°C) wurde das entsprechende Kryoröhrchen (1 ml Zellsuspension mit ca. 1×10^6 Zellen/ml) in einem auf 37°C temperierten Wasserbad erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in einer T-75-Kulturfasche mit 11 ml des entsprechenden Kultivierungsmediums ausplattiert. Das Medium wurde nach 24 h gewechselt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen bis zur Konfluenz.

Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurden $10\ \mu\text{L}$ der jeweiligen Zellsuspension mit $10\ \mu\text{L}$ Trypanblau-Lösung versetzt. $10\ \mu\text{L}$ dieses Gemisches wurden auf einen Objektträger übertragen und mit dem Zellzähler Countess® II der Firma Life Technologie ausgezählt.

Zellzahloptimierung

Eine detaillierte Beschreibung des Prozesses der Zellzahloptimierung ist in Kapitel 3.3.5 zu finden. Die entsprechenden Zellen wurden auf 384-*well* Platten des Herstellers Greiner Bio-one (#78180) in jeweils acht dem Wachstumsverhalten der Ziellinien angepassten Konzentrationen ausplattiert (Siehe Kapitel 3.3.5). Die Zellen wurden für 72 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert bevor die Zellviabilitätsmessung via des CTG-Reagenzes durchgeführt wurde.

6.4.2.1 Arbeitsanweisung zur Generierung von GI₅₀-Werten mittels Zellviabilitätsassay

Für die Bestimmung der GI₅₀-Werte wurden die Zellen in einer Zellzahl ausgesät die Linearität und optimale Signalintensität garantiert (GIST-T1-T670I: 750 Zellen/*well*, GIST430-V654A: 2000 Zellen/*well*, GIST-T1-D816E: 800 Zellen/*well*, GIST-48B: 400 Zellen/*well*, und GIST-T1: 900 Zellen/*well*). Nach einer Kultivierungszeit von 24 h im entsprechenden Medium in wasserdampfgesättigten, 5 %-igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Inhibitoren in serieller Verdünnung (1.4 nM-20 μM, 384-*well* Platten) inkubiert. Der Transfer der entsprechenden Inhibitor-konzentrationen erfolgte mit dem akustischen Dispersionssystem ECHO 520 *Liquid Handler* der Firma Labcyte gemäß der Dosis-Wirkungs-Software Echo Dose Response v1.5.4. Staurosporin und DMSO wurden jeweils als Kontrollverbindungen genutzt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde die Viabilität der Zellen mit dem CellTiter-Glo® Lumineszenz Zellviabilitätsassays von Promega ermittelt.²²⁹Eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise dieses Assaysystems ist in Kapitel 3.3.5.1 gegeben. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden sowohl die Zellen, als auch das CellTiter-Glo-Reagenz auf Raumtemperatur temperiert (20 min). Das CellTiter-Glo-Reagenz wurde entsprechend der Herstellerangaben 1:1 mit DPBS (Gibco™ von Life Technologies) gemischt und zu jeweils 25 μL/*well* auf die Zellen pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden für 3 min bei 600 rpm geschüttelt, um die Zellyse zu induzieren. Abschließend wurden die Mikrotiterplatten im Dunkeln für 20 min inkubiert, um das Lumineszenzsignal zu stabilisieren. Die Messung der Lumineszenz erfolgte durch das PerkinElmer EnVision Multimode Platenauslesegerät bei einer Integrationszeit von 500 ms.

Die Datenanalyse sowie die Bestimmung der GI₅₀-Werte erfolgten mit der Quattro Software. Alle Datenpunkte wurden in Duplikaten und in mindestens drei unabhängigen Messungen wiederholt.

6.4.2.2 Western Blot Analyse

Reagenzien und Antikörper

Imatinib, Sunitinib, Regorafenib und Ponatinib wurden von LC Laboratories (Woburn, MA) erworben. Der Polyklonale Kaninchen-Antikörper für KIT wurde von DAKO (Carpinteria, CA) hergestellt. Der Beta Actin Antikörper wurde von Sigma (St. Louis, MO) erworben. Alle anderen Antikörper, die für die in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots Verwendung fanden wurden von Cell Signaling (Beverly, MA) erworben.

Arbeitsanweisung zur Durchführung der Western Blots

Die Zellen wurden in 6 *well*-Platten ausgesät und über Nacht in einer wasserdampfgesättigten, 5 %-igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Nach 3 stündiger Inkubation mit der zu untersuchenden Verbindung, DMSO und Ponatinib als Kontrollverbindungen wurden die Zelllysate vorbereitet und anschließend zur Durchführung der SDS-Page und der Western Blots verwendet. Die genaue Durchführung wurde bereits in der Literatur beschrieben.²⁷⁰ Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit den spezifischen Antikörpern gegen KIT und den KIT-Signal-Intermediaten inkubiert. Die Veränderungen in der Protein-Expression und -Phosphorylierung wurden durch Chemilumineszenz visualisiert und mittels eines FUJI LAS3000 System mit der Science Lab 2001 ImageGauge 4.0 Software (Fujifilm Medial Systems, Stamford, CT, USA) aufgenommen und quantifiziert.

6.4.3 Charakterisierung der pharmakokinetischen Parameter

Mikrosomaler Stabilitätsassay (Phase I)

Die Degradation der untersuchten Verbindungen wurde bei 37 °C über einen Inkubationszeitraum von 60 min bei einer Assaykonzentration von 3 µM und in humanen und murinen Mikrosomen mittels LCMS ermittelt. Aus den ermittelten Daten wurde die Halbwertszeit $t_{1/2}$ und die *in vitro* intrinsische Clearance CL_{int} berechnet.

Plasmastabilität

Die Plasmastabilität der Verbindungen wurde bei einer Assaykonzentration von 5 μM über einen Inkubationszeitraum von 60 min bei 37 °C in humanen und murinen Plasma ermittelt. Die Messung des Verhältnisses der verbleibenden Verbindungsmenge und der Ursprungsmenge erfolgte über LCMS.

Plasma-Proteinbindung

Die Bestimmung der Plasma-Proteinbindung erfolgte durch Gleichgewichtsdialyse. Dazu wurden die zu untersuchenden Verbindungen bei einer Assaykonzentration von 5 μM über einen Zeitraum von 6 h und einer Temperatur von 37 °C in 50 % Plasmapuffer (v/v) inkubiert. Die finale Konzentration der Verbindungen wurde via LCMS ermittelt. Die resultierende ungebundene Fraktion für 50 % Plasma ($f_{u50\%}$) wurde auf die ungebundene Fraktion für 100% Plasma ($f_{u100\%}$) nach der Gleichung $f_{u100\%} = f_{u50\%} / (2 - f_{u50\%})$ extrapoliert.

Caco-2 Assay

Um die zelluläre Permeabilität der Verbindungen zu untersuchen wurden diese in einer Konzentration von 10 μM in HBSS entweder auf die apikale (A) oder basolaterale (B) Seite einer Monoschicht von Caco-2 Zellen ausgesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der Verbindungen auf beiden Seiten der Membran mittels LCMS/MS bestimmt. Aus den erhaltenen Daten wurde die apparente Permeabilität (P_{app}) in apikal zu basolateral (A→B) und in der Richtung basolateral zu apikal (B→A) berechnet. Die verwendete Gleichung lautet: $P_{\text{app}}(\text{A} \rightarrow \text{B}) = (\Delta C_{\text{B}} \times V_{\text{B}} \times 0.001) / (\Delta t \times A \times C_{10,\text{A}})$.

6.5 Computergestützte Methoden

6.5.1 Molekulardynamik Simulation

Die Strukturen von KIT^{wt}, KIT^{V654A} und KIT^{T670I} wurden basierend auf der Komplexkristallstruktur von KIT^{wt} v (PDB 4u0i) mit dem Programm MOE 2015²⁸⁵ modelliert. Die MD-Simulationen wurden mit der GPU beschleunigten Version der *Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics* (PMEMD) Programmkomponente des AMBER14²⁸⁶ Simulationspaketes durchgeführt. Das ff14SB Kraftfeld²⁸⁷ wurde für die nachfolgend beschriebenen Schritte gewählt. Eine Oktaederstumpf Simulationsbox, die mit TIP3P-Wassermolekülen gefüllt war, wurde verwendet, um das Protein zu solvatisieren, und das System wurde unter Verwendung von Cl⁻-Ionen neutralisiert. Der SHAKE-Algorithmus wurde auf alle Bindungen mit Wasserstoffatomen angewendet, der Cut-off für nicht-gebundene Wechselwirkungen wurde auf 8 Å eingestellt. und Partikel-Mesh-Ewald-Weitbereichselektrostatik wurde verwendet. Die elektrostatischen Interaktionen wurden mit der *particle-mesh Ewald long-range electrostatics*-Methode berechnet. Anschließend wurden die modellierten Strukturen in zwei Schritten energieminiert. Zunächst wurden 50 Schritte des Steepest Descent-Minimierungsalgorithmus angewendet, gefolgt von maximal 200 Schritten des Konjugatgradienten, die einen RMS-Gradienten von 0,0001 kcal/(Mol·Å²) mit einer Proteinbeschränkung von 25 kcal/(Mol·Å²) erreichten. Dieses Verfahren wurde wiederholt, wobei die Beschränkungen auf 5 kcal/(Mol·Å²) reduziert wurden. Für die nachfolgend beschriebenen Simulationsschritte wurde ein Zeitschritt von 2 fs verwendet. Die Temperatur wurde unter Verwendung der Berendsen-Temperaturkopplung über 50 ps in einer kanonischen Ensemble-Simulation (NVT Ensemble-Simulation) unter Beibehaltung der Proteinbeschränkungen auf 300 K eingestellt. Anschließend wurde über 150 ps eine MD-Simulation eines NPT-Ensembles bei einem Druck von 1 atm und einer Proteineinschränkung von 5 kcal / (mol Å²) durchgeführt. Die Beschränkungen wurden schrittweise über 50 ps der NVT-Ensemble-Simulation reduziert und die letzten 10 ps wurden ohne Einschränkungen simuliert. In der Produktionsphase wurden 300 ns Simulationen des NVT Ensembles durchgeführt und atomare Koordinaten, Energien und Temperaturen alle 20 ps gemessen. Die Analyse und das Clustering der resultierenden Trajektorien wurde mit dem Tool cpptraj des AMBER14²⁸⁶-Simulationspaketes durchgeführt.

Die Simulationen in Gegenwart von Ponatinib wurden unter Verwendung der vorhergesagten Bindungsmodi aus Docking-Studien, wie unten beschrieben, durchgeführt. Das generalisierte Amber Kraftfeld²⁸⁸ (GAFF) wurde für die Berechnung der Liganden Ponatinib verwendet. Der Ligand wurde unter Verwendung der AMBER 14²⁸⁶-Modulvorkammer (AM1-BCC Ladungen wurden zugeordnet) und Parmchk parametrisiert.

Ein RMSD-basiertes Clustering der an der Ponatinib-Bindung beteiligten Reste (Reste in einem 5 Å-Radius von Ponatinib in der Kristallstruktur mit dem PDB-Code 4u0i) wurde verwendet, um Cluster-Repräsentative für alle sechs MD-Simulationen zu erhalten. Für die sglomerative hierarchische Clusteranalyse wurde ein *average-linkage* Fusionierungsalgorithmus in cpptraj angewendet, um final fünf Clustern pro Trajektorie zu erstellen (vordefinierte Clusternummer). Die ATP-Bindungsstellen der 300 ns MD-Simulation aller drei Proteine (KIT^{wt}, KIT^{V654A} und KIT^{T670I}) wurde in Abwesenheit eines Liganden und in Gegenwart von Ponatinib in Bezug auf die RMSD aller Bindungsstellenatome gruppiert. Tabelle 25 zeigt den Anteil der MD-Frames, die jedem Cluster zugewiesen wurden, die durchschnittliche Entfernung zum Clusterschwerpunkt und die Clusterqualitätsschätzungen.

Tabelle 25: Ergebnisse der Bindungsstellen-Clusteranalyse für die Trajektorien der Apostrukturen der drei simulierten Enzyme in Abwesenheit (Apo) und Anwesenheit (Ligand) von Ponatinib. Die Fraktionen der Cluster- snapshots innerhalb der gruppierten Rahmen und der durchschnittliche Abstand vom Schwerpunkt in Å (in Klammern) sind angegeben. Die Clustering-Metriken Davies-Bouldin-Index (DBI) und Pseudo-F-Statistik (pSF) für die Clusteranalysen dienen als Anhaltspunkt für die Clusterqualität.

Cluster Number	KIT ^{V654A}		KIT ^{wt}		KIT ^{T670}	
	apo (DBI: 1.57, pSF: 74.95)	ligand (DBI: 1.73, pSF: 71.88)	apo (DBI: 1.66, pSF: 17.99)	ligand (DBI: 2.04, pSF: 51.09)	apo (DBI: 1.46, pSF: 10.87)	ligand (DBI: 1.03, pSF: 2.56)
#1	0.791 (1.651)	0.531 (1.374)	0.921 (1.388)	0.746 (1.278)	0.971 (1.509)	0.995 (1.402)
#2	0.179 (1.712)	0.441 (1.311)	0.075 (1.482)	0.217 (1.359)	0.015 (1.694)	0.003 (1.439)
#3	0.025 (1.861)	0.025 (1.448)	0.002 (1.521)	0.025 (1.333)	0.013 (1.715)	0.001 (1.458)
#4	0.004 (1.733)	0.003 (1.442)	0.001 (1.505)	0.011 (1.366)	0.001 (1.714)	0.001 (1.766)
#5	0.001 (1.872)	0.001 (1.413)	0.001 (1.504)	0.001 (1.401)	0.001 (1.729)	0.001 (1.447)

Die Analyse des α -Helix-C-Winkels wurde unter Verwendung von ccptraj durchgeführt. Die Berechnungen des Winkels zwischen der Helixachse wurde anhand der Rückgratome O, C α , C α und N der Reste Leu631, Glu633, Glu635 und Leu637 und anhand des Einheitszellenvektors x über die gesamten Trajektorien der MD-Simulationen von KIT^{wt}, KIT^{V654A} und KIT^{T670I} durchgeführt. Die Wasserstoffbrückenanalyse wurde mit Hilfe des VMD HBonds Plugin²⁸⁹ (Standardeinstellungen) durchgeführt.

Das Tool mdpocket²⁹⁰ wurde verwendet, um das Volumen der Ponatinib-Bindungsstellen detaillierter zu analysieren. Dafür wurden pro Trajektorie fünf Snapshots pro ns extrahiert und eine Bindungsstellen-Detektion und eine manuelle Bindungsstellenauswahl durchgeführt, um anschließend die Deskriptoren der Ponatinib-Bindungsstellen der Varianten zu berechnen.

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal component analysis* (PCA)) wurde mit der ProDy-Interface-Funktion des Normalmodus-Assistenten (NMWiz) durchgeführt (Standardeinstellungen). Die Protein-C α -Atome wurden verwendet, um normale Moden für die MD-Trajektorien der Apostrukturen abzuleiten (jeweils 1500 snapshots).

6.5.2 MM-PB(GB)SA Berechnungen

Alle (MM-PB(GB)SA) Berechnungen basieren auf 50 ns Trajektorien, die wie zuvor in Kapitel 6.5.1 beschrieben generiert wurden. Mit der Ausnahme, dass die hier durchgeführten Berechnungen der Trajektorien über eine parallele CPU Version der PMEND Programmkomponente anstelle der GPU beschleunigten berechnet wurden. Dabei wurden die letzten 2000 *snapshots* (40 ns) genutzt, um den Unterschied in der freien Bindungsenergie zwischen Ponatinib-gebundenen und -ungebundenen Zustand der KIT-Varianten basierend auf dem AMBER2014 Script MMPBSA.py.²⁹¹ zu berechnen. Für die MM-GBSA-Berechnungen wurden die Standardeinstellungen mit Ausnahme der Veränderung der Salzkonzentration auf 0.1 M. Die Ionenstärke wurde auf 0.1 M für die MM-PBSA-Berechnungen gesetzt. Die unpolare freie Solvatationsenergie wurde als einzelner linear-proportionaler Term zu der Lösungsmittelzugängliche Oberfläche modelliert. Die Atomradien wurden entsprechend der zur Verfügung gestellten prmtop Datei eingestellt. Der Der Lösungsentropie-Term wurde bei der Berechnung der freien Energien vernachlässigt, da seine Berechnung oft mit den großen statistischen Unsicherheiten verbunden ist.¹⁸⁶

6.5.3 Docking

Die Strukturen der Moleküle wurden mit MOE 2015²⁸⁵ präpariert. Die Wasserstoffatome wurden mit der Wash Funktion hinzugefügt. Alle Moleküle wurden mittels eines MMFF94x Kraftfelds und einem Gradienten von $0.00001 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{Å}^2)$ energieminimiert. Die Generierung der Varianten KIT^{T670I} und KIT^{V654A} erfolgte über die Funktion Protein Builder in MOE. Die Kristallstruktur von KIT^{wt} in Komplex mit Ponatinib (PDB 4u0i) wurde als Referenzstruktur für alle computergestützten Analysen verwendet. Die jeweiligen Proteine wurden mit der Protonate3D Funktion protoniert. Die Docking-Studien wurden mit dem Programm GoldSuite2016²⁹² durchgeführt. Um die Proteinflexibilität zu berücksichtigen würde zunächst ein *ensemble docking* mit den repräsentativen Strukturen aus der MD-Simulation der drei KIT-Varianten (wt, T670I und V654A) durchgeführt. Anschließend wurden Docking-Studien mit den ursprünglich modifizierten Kristallstrukturen der Proteine durchgeführt. Die Docking Parameter wurden durch Dockingversuche mit Ponatinib (*redocking*) optimiert. Alle molekularen Docking-Studien wurden mit den Standardeinstellungen unter Variation der folgenden Parameter durchgeführt: 100 GA Durchläufe pro Ligand wurden ausgeführt wobei die *Cambridge Structural Database* (CSD) Ringkonformer-Bibliothek als Templat für die Generierung der Ringkonformationen während des Dockings genutzt wurde. Die Drehung der freien Ringecken wurde zugelassen. Die Bindungstasche der Moleküle wurde über die AS-Reste definiert, welche die die Kavität um den Ursprungsliganden Ponatinib formen. Die finale Auswahl der Dockingposen wurde basierend auf einer detaillierten visuellen Untersuchung aller drei Docking-Studien getroffen. Für alle Dockingversuche von Ponatinib zeigte sich in den 30 höchst-eingestuften Posen ein beinahe nativer Bindungsmodus (wt: maximale RMSD von 0.64 Å ; T670I: maximale RMSD von 0.75 Å ; V654A: maximale RMSD von 1.37 Å). Für die anschließende MD-Simulation wurden die Posen mit der kleinsten RMSD zur KIT^{wt}-Komplekxkristallstruktur gewählt (wt: rank 6, RMSD 0.4 Å ; T670I: rank 24, RMSD 0.38 Å ; V654A: rank 9, RMSD 0.4 Å).

6.5.4 Liganden-Bindungsstellenvergleich

Für den Liganden-Bindungsstellenvergleich mit der OpenEye-Bindungsstellen-Vergleichssoftware SiteHopper¹⁸⁷ wurden die repräsentative Struktur des prominentesten Clusters pro Variante verwendet. Die Ponatinib-Bindungsstellen aller Varianten wurden in Bezug auf die Bindungsstelle von Ponatinib in Komplex mit KIT^{wt} (PDB 4u0i) verglichen.

SiteHopper generiert anschließend die Bindungsoberflächen, die hinsichtlich Form und physikalisch-chemischen Eigenschaften verglichen werden können. Das Maß für die Formähnlichkeit beider Bindungsstellen wird ShapeTanimoto genannt und liegt zwischen 0 (völlig unterschiedliche Bindungsstellenformen) und 1 (für identische Bindungsstellenformen). Zusätzlich wurden die physikalisch-chemischen Bindungsstelleneigenschaften mit dem sogenannten ColorTanimoto als Ähnlichkeitsmaß verglichen. Auf diese Weise wurden Wasserstoffbrückenbindungs-Donor- und Akzeptor- sowie hydrophobe Eigenschaften der Bindungsstelle verglichen. Der PatchScore wird aus ShapeTanimoto + 3 ColorTanimoto berechnet und beschreibt das allgemeine Ähnlichkeitsmaß der Bindungsstellen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 26 gezeigt.

Tabelle 26: Vergleich der Ponatinib-Bindungsstellen der Varianten KITV654A und KITT670I (MD-Representative) mit der Ponatinib-gebundenen wt-Bindungsstelle in Abwesenheit (Apo) und Anwesenheit (Ligand) von Ponatinib sowie zu der unbesetzten wt-Bindungsstelle (in Klammern).

	KIT ^{V654A}		KIT ^{T670I}	
	Apoprotein	Ligand-gebunden	Apoprotein	Ligand-gebunden
Patch Score	1.253 (1.350)	2.009	1.695 (1.558)	2.057
Shape Tanimoto	0.303 (0.324)	0.561	0.469 (0.337)	0.581
Color Tanimoto	0.317 (0.342)	0.483	0.409 (0.407)	0.492

7 Literaturverzeichnis

- [1.] Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S., The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912-1934.
- [2.] Cheng, H. C.; Qi, R. Z.; Paudel, H.; Zhu, H. J., Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*, 794089.
- [3.] Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; Richters, A.; Tuckmantel, S.; Simard, J. R.; Rauh, D., Proteus in the world of proteins: Conformational changes in protein kinases. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2010**, *343* (4), 193-206.
- [4.] Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H., Ten things you should know about protein kinases: Iuphar review 14. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (11), 2675-2700.
- [5.] Stenberg, K. A.; Riikonen, P. T.; Vihinen, M., Kinmutbase, a database of human disease-causing protein kinase mutations. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 369-371.
- [6.] Hamilton, T. A., Protein kinases. Encyclopedia of Immunology (Second Edition): **1998**.
- [7.] Burnett, G.; Kennedy, E. P., The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem.* **1954**, *211* (2), 969-980.
- [8.] Martin, G. S., The hunting of the src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (6), 467-475.
- [9.] Stehelin, D.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M.; Vogt, P. K., DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **1976**, *260* (5547), 170-173.
- [10.] Deininger, M.; Buchdunger, E.; Druker, B. J., The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **2005**, *105* (7), 2640-2653.
- [11.] Buchdunger, E.; Peng, B.; Ford, J.; Capdeville, R.; Resta, D.; Druker, B.; Sawyers, C.; Talpaz, M., STI571, a molecularly targeted treatment modality for cml. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4482s-4482s.
- [12.] Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M., Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **1991**, *253* (5018), 414-420.
- [13.] Taylor, S. S.; Kornev, A. P., Protein kinases: Evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36* (2), 65-77.
- [14.] Daub, H.; Specht, K.; Ullrich, A., Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (12), 1001-1010.
- [15.] Tamborini, E.; Bonadiman, L.; Greco, A.; Albertini, V.; Negri, T.; Gronchi, A.; Bertulli, R.; Colecchia, M.; Casali, P. G.; Pierotti, M. A.; Pilotti, S., A new mutation in the kit atp pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* **2004**, *127* (1), 294-299.
- [16.] Madhusudan; Akamine, P.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S., Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of camp-dependent protein kinase. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (4), 273-277.
- [17.] Johnson, D. A.; Akamine, P.; Radzio-Andzelm, E.; Madhusudan, M.; Taylor, S. S., Dynamics of camp-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2243-2270.
- [18.] Jacobsen, D. M.; Bao, Z. Q.; O'Brien, P.; Brooks, C. L., 3rd; Young, M. A., Price to be paid for two-metal catalysis: Magnesium ions that accelerate chemistry unavoidably limit product release from a protein kinase. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (37), 15357-15370.
- [19.] Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D. R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F.; Sowadski, J. M., 2.2 a refined crystal structure of the catalytic subunit of camp-dependent protein kinase complexed with mnatp and a peptide inhibitor. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1993**, *49* (Pt 3), 362-365.
- [20.] Kornev, A. P.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F., A helix scaffold for the assembly of active protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105* (38), 14377-14382.
- [21.] Vijayan, R. S.; He, P.; Modi, V.; Duong-Ly, K. C.; Ma, H.; Peterson, J. R.; Dunbrack, R. L., Jr.; Levy, R. M., Conformational analysis of the dfg-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type ii inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (1), 466-479.
- [22.] Robinson, D. R.; Wu, Y. M.; Lin, S. F., The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **2000**, *19* (49), 5548-5557.
- [23.] Ullrich, A.; Schlessinger, J., Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **1990**, *61* (2), 203-212.
- [24.] Lemmon, M. A.; Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2010**, *141* (7), 1117-1134.
- [25.] Ward, C. W.; Lawrence, M. C.; Streltsov, V. A.; Adams, T. E.; McKern, N. M., The insulin and egf receptor structures: New insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32* (3), 129-137.

- [26.] Liu, H.; Chen, X.; Focia, P. J.; He, X., Structural basis for stem cell factor-kit signaling and activation of class iii receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **2007**, *26* (3), 891-901.
- [27.] Leppanen, V. M.; Prota, A. E.; Jeltsch, M.; Anisimov, A.; Kalkkinen, N.; Strandin, T.; Lankinen, H.; Goldman, A.; Ballmer-Hofer, K.; Alitalo, K., Structural determinants of growth factor binding and specificity by vegf receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (6), 2425-2430.
- [28.] Wiesmann, C.; Ultsch, M. H.; Bass, S. H.; de Vos, A. M., Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the trka receptor. *Nature* **1999**, *401* (6749), 184-188.
- [29.] Plx9486+plx3397, plexxikon: San antonio, tx, 2017. <http://www.plexxikon.com/pipeline/plx9486-plx3397/> (accessed 03.11.2017).
- [30.] Yuzawa, S.; Opatowsky, Y.; Zhang, Z. T.; Mandiyan, V.; Lax, I.; Schlessinger, J., Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase kit by stem cell factor. *Cell* **2007**, *130* (2), 323-334.
- [31.] Schlessinger, J.; Plotnikov, A. N.; Ibrahimi, O. A.; Eliseenkova, A. V.; Yeh, B. K.; Yayon, A.; Linhardt, R. J.; Mohammadi, M., Crystal structure of a ternary fgf-fgfr-heparin complex reveals a dual role for heparin in fgfr binding and dimerization. *Molecular Cell* **2000**, *6* (3), 743-750.
- [32.] Huse, M.; Kuriyan, J., The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **2002**, *109* (3), 275-282.
- [33.] Nolen, B.; Taylor, S.; Ghosh, G., Regulation of protein kinases: Controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell* **2004**, *15* (5), 661-675.
- [34.] Mohammadi, M.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R., Structure of the fgf receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell* **1996**, *86* (4), 577-587.
- [35.] Shewchuk, L. M.; Hassell, A. M.; Ellis, B.; Holmes, W. D.; Davis, R.; Horne, E. L.; Kadwell, S. H.; McKee, D. D.; Moore, J. T., Structure of the tie2 rtk domain: Self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and c-terminal tail. *Structure* **2000**, *8* (11), 1105-1113.
- [36.] Till, J. H.; Becerra, M.; Watty, A.; Lu, Y.; Ma, Y. L.; Neubert, T. A.; Burden, S. J.; Hubbard, S. R., Crystal structure of the musk tyrosine kinase: Insights into receptor autoregulation. *Structure* **2002**, *10* (9), 1187-1196.
- [37.] Mol, C. D.; Dougan, D. R.; Schneider, T. R.; Skene, R. J.; Kraus, M. L.; Scheibe, D. N.; Snell, G. P.; Zou, H.; Sang, B. C.; Wilson, K. P., Structural basis for the autoinhibition and sti-571 inhibition of c-kit tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (30), 31655-31663.
- [38.] Griffith, J.; Black, J.; Faerman, C.; Swenson, L.; Wynn, M.; Lu, F.; Lippke, J.; Saxena, K., The structural basis for autoinhibition of flt3 by the juxtamembrane domain. *Molecular Cell* **2004**, *13* (2), 169-178.
- [39.] Hubbard, S. R., Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (6), 464-470.
- [40.] Chang, P. M.; Ilangumaran, S.; La Rose, J.; Chakrabarty, A.; Rottapel, R., Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23* (9), 3067-3078.
- [41.] Dibb, N. J.; Dilworth, S. M.; Mol, C. D., Opinion - switching on kinases: Oncogenic activation of braf and the pdgfr family. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (9), 718-727.
- [42.] Niu, X. L.; Peters, K. G.; Kontos, C. D., Deletion of the carboxyl terminus of tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (35), 31768-31773.
- [43.] Li, D.; Fu, T. M.; Nan, J.; Liu, C.; Li, L. F.; Su, X. D., Structural basis for the autoinhibition of the c-terminal kinase domain of human rsk1. *Acta Crystallogr. Section D-Biological Crystallography* **2012**, *68*, 680-685.
- [44.] Knowles, P. P.; Murray-Rust, J.; Kjaer, S.; Scott, R. P.; Hanrahan, S.; Santoro, M.; Ibanez, C. F.; McDonald, N. Q., Structure and chemical inhibition of the ret tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (44), 33577-33587.
- [45.] Zhang, X. W.; 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* (6), 1137-1149.
- [46.] Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (3), 169-181.
- [47.] Qiu, C.; Tarrant, M. K.; Choi, S. H.; Sathyamurthy, A.; Bose, R.; Banjade, S.; Pal, A.; Bornmann, W. G.; Lemmon, M. A.; Cole, P. A.; Leahy, D. J., Mechanism of activation and inhibition of the her4/erb4 kinase. *Structure* **2008**, *16* (3), 460-467.
- [48.] Jura, N.; Endres, N. F.; Engel, K.; Deindl, S.; Das, R.; Lamers, M. H.; Wemmer, D. E.; Zhang, X.; Kuriyan, J., Mechanism for activation of the egf receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **2009**, *137* (7), 1293-1307.
- [49.] Macdonald-Obermann, J. L.; Pike, L. J., The intracellular juxtamembrane domain of the epidermal growth factor (egf) receptor is responsible for the allosteric regulation of egf binding. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (20), 13570-13576.

- [50.] Favelyukis, S.; Till, J. H.; Hubbard, S. R.; Miller, W. T., Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8* (12), 1058-1063.
- [51.] Furdui, C. M.; Lew, E. D.; Schlessinger, J.; Anderson, K. S., Autophosphorylation of fgfr1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Molecular Cell* **2006**, *21* (5), 711-717.
- [52.] Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2000**, *103* (2), 211-225.
- [53.] Pawson, T., Specificity in signal transduction: From phosphotyrosine-sh2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **2004**, *116* (2), 191-203.
- [54.] Schlessinger, J.; Lemmon, M. A., Sh2 and ptb domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* **2003**, *2003* (191), RE12.
- [55.] von Kriegsheim, A.; Baiocchi, D.; Birtwistle, M.; Sumpton, D.; Bienvenut, W.; Morrice, N.; Yamada, K.; Lamond, A.; Kalna, G.; Orton, R.; Gilbert, D.; Kolch, W., Cell fate decisions are specified by the dynamic erk interactome. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11* (12), 1458-U1172.
- [56.] Kholodenko, B. N., Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7* (3), 165-176.
- [57.] Ostman, A.; Bohmer, F. D., Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11* (6), 258-266.
- [58.] Volinsky, N.; Kholodenko, B. N., Complexity of receptor tyrosine kinase signal processing. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2013**, *5* (8).
- [59.] Regad, T., Targeting rtk signaling pathways in cancer. *Cancers (Basel)* **2015**, *7* (3), 1758-1784.
- [60.] Raval, S. H.; Singh, R. D.; Joshi, D. V.; Patel, H. B.; Mody, S. K., Recent developments in receptor tyrosine kinases targeted anticancer therapy. *Vet. World* **2016**, *9* (1), 80-90.
- [61.] Besmer, P.; Murphy, J. E.; George, P. C.; Qiu, F.; Bergold, P. J.; Lederman, L.; Snyder, H. W.; Brodeur, D.; Zuckerman, E. E.; Hardy, W. D., A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein-kinase gene family. *Nature* **1986**, *320* (6061), 415-421.
- [62.] Yarden, Y.; Kuang, W. J.; Yang-Feng, T.; Coussens, L.; Munemitsu, S.; Dull, T. J.; Chen, E.; Schlessinger, J.; Francke, U.; Ullrich, A., Human proto-oncogene c-kit: A new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* **1987**, *6* (11), 3341-3351.
- [63.] Lennartsson, J.; Ronnstrand, L., Stem cell factor receptor/c-kit: From basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (4), 1619-1649.
- [64.] Furitsu, T.; Tsujimura, T.; Tono, T.; Ikeda, H.; Kitayama, H.; Koshimizu, U.; Sugahara, H.; Butterfield, J. H.; Ashman, L. K.; Kanayama, Y., Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.* **1993**, *92* (4), 1736-1744.
- [65.] Yavuz, A. S.; Lipsky, P. E.; Yavuz, S.; Metcalfe, D. D.; Akin, C., Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood* **2002**, *100* (2), 661-665.
- [66.] Keshet, E.; Lyman, S. D.; Williams, D. E.; Anderson, D. M.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Parada, L. F., Embryonic expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J.* **1991**, *10* (9), 2425-2435.
- [67.] Matsui, Y.; Zsebo, K. M.; Hogan, B. L., Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* **1990**, *347* (6294), 667-669.
- [68.] Nocka, K.; Majumder, S.; Chabot, B.; Ray, P.; Cervone, M.; Bernstein, A.; Besmer, P., Expression of c-kit gene products in known cellular targets of w mutations in normal and w mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev.* **1989**, *3* (6), 816-826.
- [69.] Crosier, P. S.; Ricciardi, S. T.; Hall, L. R.; Vitas, M. R.; Clark, S. C.; Crosier, K. E., Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic-cell lines and acute myeloid-leukemia. *Blood* **1993**, *82* (4), 1151-1158.
- [70.] Reith, A. D.; Ellis, C.; Lyman, S. D.; Anderson, D. M.; Williams, D. E.; Bernstein, A.; Pawson, T., Signal transduction by normal isoforms and w mutant variants of the kit receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* **1991**, *10* (9), 2451-2459.
- [71.] Zhu, W. M.; Dong, W. F.; Minden, M., Alternate splicing creates two forms of the human kit protein. *Leuk. Lymphoma* **1994**, *12* (5-6), 441-447.
- [72.] Wheeler, D. L.; Yarden, Y. E., Receptor tyrosine kinases: Family and subfamilies. Springer International Publishing: **2015**; p XVII, 878.
- [73.] Rossi, P.; Marziali, G.; Albanesi, C.; Charlesworth, A.; Geremia, R.; Sorrentino, V., A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Developmental Biology* **1992**, *152* (1), 203-207.

- [74.] Paronetto, M. P.; Venables, J. P.; Elliott, D. J.; Geremia, R.; Rossi, P.; Sette, C., Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by fyn, plcgamma1 and sam68. *Oncogene* **2003**, *22* (54), 8707-8715.
- [75.] Voytyuk, O.; Lennartsson, J.; Mogi, A.; Caruana, G.; Courtneidge, S.; Ashman, L. K.; Ronnstrand, L., Src family kinases are involved in the differential signaling from two splice forms of c-kit. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (11), 9159-9166.
- [76.] Caruana, G.; Cambarelli, A. C.; Ashman, L. K., Isoforms of c-kit differ in activation of signalling pathways and transformation of nih3t3 fibroblasts. *Oncogene* **1999**, *18* (40), 5573-5581.
- [77.] Mol, C. D.; Lim, K. B.; Sridhar, V.; Zou, H.; Chien, E. Y.; Sang, B. C.; Nowakowski, J.; Kassel, D. B.; Cronin, C. N.; McRee, D. E., Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (34), 31461-31464.
- [78.] Roskoski, R., Jr., Structure and regulation of kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338* (3), 1307-1315.
- [79.] Lemmon, M. A.; Pinchasi, D.; Zhou, M.; Lax, I.; Schlessinger, J., Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (10), 6311-6317.
- [80.] Zhang, Z. T.; Zhang, R. G.; Joachimiak, A.; Schlessinger, J.; Kong, X. P., Crystal structure of human stem cell factor: Implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97* (14), 7732-7737.
- [81.] Reshetnyak, A. V.; Nelson, B.; Shi, X.; Boggan, T. J.; Pavlenco, A.; Mandel-Bausch, E. M.; Tome, F.; Suzuki, Y.; Sidhu, S. S.; Lax, I.; Schlessinger, J., Structural basis for kit receptor tyrosine kinase inhibition by antibodies targeting the d4 membrane-proximal region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110* (44), 17832-17837.
- [82.] DiNitto, J. P.; Deshmukh, G. D.; Zhang, Y.; Jacques, S. L.; Coli, R.; Worrall, J. W.; Diehl, W.; English, J. M.; Wu, J. C., Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. *J. Biochem.* **2010**, *147* (4), 601-609.
- [83.] Lennartsson, J.; Jelacic, T.; Linnekin, D.; Shivakrupa, R., Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* **2005**, *23* (1), 16-43.
- [84.] Mithraprabhu, S.; Loveland, K. L., Control of kit signalling in male germ cells: What can we learn from other systems? *Reproduction* **2009**, *138* (5), 743-757.
- [85.] Masson, K.; Heiss, E.; Band, H.; Ronnstrand, L., Direct binding of cbl to tyr568 and tyr936 of the stem cell factor receptor/c-kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem. J.* **2006**, *399* (1), 59-67.
- [86.] Sun, J.; Pedersen, M.; Bengtsson, S.; Ronnstrand, L., Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-kit signaling by recruitment of cbl. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313* (18), 3935-3942.
- [87.] Bayle, J.; Lopez, S.; Iwai, K.; Dubreuil, P.; De Sepulveda, P., The e3 ubiquitin ligase hoil-1 induces the polyubiquitination and degradation of socs6 associated proteins. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (11), 2609-2614.
- [88.] Zadjali, F.; Pike, A. C.; Vesterlund, M.; Sun, J.; Wu, C.; Li, S. S.; Ronnstrand, L.; Knapp, S.; Bullock, A. N.; Flores-Morales, A., Structural basis for c-kit inhibition by the suppressor of cytokine signaling 6 (socs6) ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (1), 480-490.
- [89.] Haglund, K.; Sigismund, S.; Polo, S.; Szymkiewicz, I.; Di Fiore, P. P.; Dikic, I., Multiple monoubiquitination of rtk is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5* (5), 461-466.
- [90.] Broudy, V. C.; Lin, N. L.; Liles, W. C.; Corey, S. J.; O'Laughlin, B.; Mou, S.; Linnekin, D., Signaling via src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-kit. *Blood* **1999**, *94* (6), 1979-1986.
- [91.] Blumejensen, P.; Wernstedt, C.; Heldin, C. H.; Ronnstrand, L., Identification of the major phosphorylation sites for protein-kinase-c in kit/stem cell factor-receptor in-vitro and in intact-cells. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (23), 14192-14200.
- [92.] Yee, N. S.; Hsiao, C. W. M.; Serve, H.; Vosseller, K.; Besmer, P., Mechanism of down-regulation of c-kit receptor - roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein-kinase-c. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (50), 31991-31998.
- [93.] Broudy, V. C.; Lin, N. L.; Sabath, D. F., The fifth immunoglobulin-like domain of the kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine* **2001**, *15* (4), 188-195.
- [94.] Paulson, R. F.; Vesely, S.; Siminovitch, K. A.; Bernstein, A., Signalling by the w/kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase shp1. *Nature Genetics* **1996**, *13* (3), 309-315.
- [95.] Kozlowski, M.; Larose, L.; Lee, F.; Le, D. M.; Rottapel, R.; Siminovitch, K. A., Shp-1 binds and negatively modulates the c-kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-kit juxtamembrane domain. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18* (4), 2089-2099.

- [96.] Garrido, M. C.; Bastian, B. C., Kit as a therapeutic target in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (1), 20-27.
- [97.] Laine, E.; de Beauchene, I. C.; Perahia, D.; Auclair, C.; Tchertanov, L., Mutation d816v alters the internal structure and dynamics of c-kit receptor cytoplasmic region: Implications for dimerization and activation mechanisms. *PLoS Comput. Biol.* **2011**, *7* (6).
- [98.] Lam, L. P. Y.; Chow, R. Y. K.; Berger, S. A., A transforming mutation enhances the activity of the c-kit soluble tyrosine kinase domain. *Biochem. J.* **1999**, *338*, 131-138.
- [99.] Sanger institute catalogue of somatic mutations in cancer. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/> (accessed 31.12.17).
- [100.] Natali, P. G.; Nicotra, M. R.; Winkler, A. B.; Cavaliere, R.; Bigotti, A.; Ullrich, A., Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int. J. Cancer.* **1992**, *52* (2), 197-201.
- [101.] Abbaspour Babaei, M.; Kamalidehghan, B.; Saleem, M.; Huri, H. Z.; Ahmadipour, F., Receptor tyrosine kinase (c-kit) inhibitors: A potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 2443-2459.
- [102.] Heinrich, M. C.; Blanke, C. D.; Druker, B. J.; Corless, C. L., Inhibition of kit tyrosine kinase activity: A novel molecular approach to the treatment of kit-positive malignancies. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20* (6), 1692-1703.
- [103.] Hirota, S.; Isozaki, K.; Moriyama, Y.; Hashimoto, K.; Nishida, T.; Ishiguro, S.; Kawano, K.; Hanada, M.; Kurata, A.; Takeda, M.; Tunio, G. M.; Matsuzawa, Y.; Kanakura, Y.; Shinomura, Y.; Kitamura, Y., Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **1998**, *279* (5350), 577-580.
- [104.] Jr., R. R. Fda-approved protein kinase inhibitors www.brimr.org/PKI/PKIs.htm (accessed 22.02.18).
- [105.] Roskoski, R., Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 26-48.
- [106.] Dar, A. C.; Shokat, K. M., The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 769-795.
- [107.] Gavrin, L. K.; Saiah, E., Approaches to discover non-atp site kinase inhibitors. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *4*, 41-51.
- [108.] Lamba, V.; Ghosh, I., New directions in targeting protein kinases: Focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2936-2945.
- [109.] van Linden, O. P.; Kooistra, A. J.; Leurs, R.; de Esch, I. J.; de Graaf, C., Klifs: A knowledge-based structural database to navigate kinase-ligand interaction space. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (2), 249-277.
- [110.] Klebl, B.; Müller, G.; Hamacher, G., Protein kinases as drug targets. WileyVCH verlag & KGaA: **2011**.
- [111.] Cox, K. J.; Shomin, C. D.; Ghosh, I., Tinkering outside the kinase atp box: Allosteric (type iv) and bivalent (type v) inhibitors of protein kinases. *Future Med. Chem.* **2011**, *3* (1), 29-43.
- [112.] Khateb, M.; Ruimi, N.; Khamisie, H.; Najajreh, Y.; Mian, A.; Metodieva, A.; Ruthardt, M.; Mahajna, J., Overcoming bcr-abl t315i mutation by combination of gnf-2 and atp competitors in an abl-independent mechanism. *Bmc. Cancer* **2012**, *12*.
- [113.] Yang, J.; Campobasso, N.; Biju, M. P.; Fisher, K.; Pan, X. Q.; Cottom, J.; Galbraith, S.; Ho, T.; Zhang, H.; Hong, X.; Ward, P.; Hofmann, G.; Siegfried, B.; Zappacosta, F.; Washio, Y.; Cao, P.; Qu, J.; Bertrand, S.; Wang, D. Y.; Head, M. S.; Li, H.; Moores, S.; Lai, Z.; Johanson, K.; Burton, G.; Erickson-Miller, C.; Simpson, G.; Tummino, P.; Copeland, R. A.; Oliff, A., Discovery and characterization of a cell-permeable, small-molecule c-abl kinase activator that binds to the myristoyl binding site. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (2), 177-186.
- [114.] Wylie, A. A.; Schoepfer, J.; Jahnke, W.; Cowan-Jacob, S. W.; Loo, A.; Furet, P.; Marzinzik, A. L.; Pelle, X.; Donovan, J.; Zhu, W. J.; Buonamici, S.; Hassan, A. Q.; Lombardo, F.; Iyer, V.; Palmer, M.; Berellini, G.; Dodd, S.; Thohan, S.; Bitter, H.; Branford, S.; Ross, D. M.; Hughes, T. P.; Petruzzelli, L.; Vanasse, K. G.; Warmuth, M.; Hofmann, F.; Keen, N. J.; Sellers, W. R., The allosteric inhibitor abl001 enables dual targeting of bcr-abl1. *Nature* **2017**, *543* (7647), 733-737.
- [115.] Gower, C. M.; Chang, M. E. K.; Maly, D. J., Bivalent inhibitors of protein kinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49* (2), 102-115.
- [116.] van Ameijde, J.; Poot, A. J.; van Wandelen, L. T.; Wammes, A. E.; Ruijtenbeek, R.; Rijkers, D. T.; Liskamp, R. M., Preparation of novel alkylated arginine derivatives suitable for click-cycloaddition chemistry and their incorporation into pseudosubstrate- and bisubstrate-based kinase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (7), 1629-1639.
- [117.] Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A., The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10* (4), 307-317.

- [118.] Baillie, T. A., Targeted covalent inhibitors for drug design. *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, *55* (43), 13408-13421.
- [119.] Lategahn, J.; Keul, M.; Rauh, D., Lessons to be learned: The molecular basis of kinase-targeted therapies and drug resistance in non-small cell lung cancer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *57* (9), 2307-2313.
- [120.] Tsujimura, T.; Furitsu, T.; Morimoto, M.; Isozaki, K.; Nomura, S.; Matsuzawa, Y.; Kitamura, Y.; Kanakura, Y., Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line p-815 generated by a point mutation. *Blood* **1994**, *83* (9), 2619-2626.
- [121.] Tsujimura, T.; Furitsu, T.; Morimoto, M.; Kanayama, Y.; Nomura, S.; Matsuzawa, Y.; Kitamura, Y.; Kanakura, Y., Substitution of an aspartic acid results in constitutive activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a rat tumor mast cell line rbl-2h3. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1995**, *106* (4), 377-385.
- [122.] Carvajal, R. D.; Lawrence, D. P.; Weber, J. S.; Gajewski, T. F.; Gonzalez, R.; Lutzky, J.; O'Day, S. J.; Hamid, O.; Wolchok, J. D.; Chapman, P. B.; Sullivan, R. J.; Teitcher, J. B.; Ramaiya, N.; Giobbie-Hurder, A.; Antonescu, C. R.; Heinrich, M. C.; Bastian, B. C.; Corless, C. L.; Fletcher, J. A.; Hodi, F. S., Phase II study of nilotinib in melanoma harboring KIT alterations following progression to prior KIT inhibition. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (10), 2289-2296.
- [123.] Curtin, J. A.; Busam, K.; Pinkel, D.; Bastian, B. C., Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24* (26), 4340-4346.
- [124.] Ashman, L. K.; Griffith, R., Therapeutic targeting of c-kit in cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2013**, *22* (1), 103-115.
- [125.] Poveda, A.; Martinez, V.; Serrano, C.; Sevilla, I.; Lecumberri, M. J.; de Beveridge, R. D.; Estival, A.; Vicente, D.; Rubio, J.; Martin-Broto, J., Seom clinical guideline for gastrointestinal sarcomas (GIST) (2016). *Clin. Transl. Oncol.* **2016**, *18* (12), 1221-1228.
- [126.] Antonescu, C. R., The GIST paradigm: Lessons for other kinase-driven cancers. *J. Pathol.* **2011**, *223* (2), 251-261.
- [127.] Søreide, K.; Sandvik, O. M.; Søreide, J. A.; Giljaca, V.; Jureckova, A.; Bulusu, V. R., Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol.* **2016**, *40*, 39-46.
- [128.] Sanders, K. M.; Koh, S. D.; Ward, S. M., Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 307-343.
- [129.] Zhao, X.; Yue, C., Gastrointestinal stromal tumor. *J. Gastrointest. Oncol.* **2012**, *3* (3), 189-208.
- [130.] Foo, W. C.; Liegl-Atzwanger, B.; Lazar, A. J., Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Med. Insights Pathol.* **2012**, *5*, 23-33.
- [131.] Scola, D.; Bahoura, L.; Copelan, A.; Shirkhoda, A.; Sokhandon, F., Getting the GIST: A pictorial review of the various patterns of presentation of gastrointestinal stromal tumors on imaging. *Abdom Radiol (NY)* **2017**, *42* (5), 1350-1364.
- [132.] PDQ®, N. C. I. Gastrointestinal stromal tumors treatment. <http://www.cancer.gov/types/soft-tissue-sarcoma/patient/gist-treatment-pdq> (accessed 02.11.17).
- [133.] Linch, M.; Claus, J.; Benson, C., Update on imatinib for gastrointestinal stromal tumors: Duration of treatment. *OncoTargets Ther.* **2013**, *6*, 1011-1023.
- [134.] Koumariou, A.; Economopoulou, P.; Katsaounis, P.; Laschos, K.; Arapantoni-Dadioti, P.; Martikos, G.; Rogdakis, A.; Tzanakis, N.; Boukovinas, I., Gastrointestinal stromal tumors (GIST): A prospective analysis and an update on biomarkers and current treatment concepts. *Biomark. Cancer* **2015**, *7* (Suppl 1), 1-7.
- [135.] Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Duensing, A.; McGreevey, L.; Chen, C. J.; Joseph, N.; Singer, S.; Griffith, D. J.; Haley, A.; Town, A.; Demetri, G. D.; Fletcher, C. D.; Fletcher, J. A., PDGFRα activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* **2003**, *299* (5607), 708-710.
- [136.] Verweij, J.; Casali, P. G.; Zalcberg, J.; LeCesne, A.; Reichardt, P.; Blay, J. Y.; Issels, R.; van Oosterom, A.; Hogendoorn, P. C.; Van Glabbeke, M.; Bertulli, R.; Judson, I., Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: Randomised trial. *Lancet* **2004**, *364* (9440), 1127-1134.
- [137.] Corless, C. L.; McGreevey, L.; Haley, A.; Town, A.; Heinrich, M. C., KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160* (5), 1567-1572.
- [138.] Joensuu, H.; Hohenberger, P.; Corless, C. L., Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* **2013**, *382* (9896), 973-983.
- [139.] Gramza, A. W.; Corless, C. L.; Heinrich, M. C., Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (24), 7510-7518.

- [140.] Jensen, B. M.; Akin, C.; Gilfillan, A. M., Pharmacological targeting of the kit growth factor receptor: A therapeutic consideration for mast cell disorders. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154* (8), 1572-1582.
- [141.] Corless, C. L.; Barnett, C. M.; Heinrich, M. C., Gastrointestinal stromal tumours: Origin and molecular oncology. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (12), 865-878.
- [142.] The pymol molecular graphics system. Version 1.2r3pre ed.; Schrödinger, L., Ed.
- [143.] Buchdunger, E.; Cioffi, C. L.; Law, N.; Stover, D.; Ohno-Jones, S.; Druker, B. J.; Lydon, N. B., Abl protein-tyrosine kinase inhibitor sti571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295* (1), 139-145.
- [144.] Sun, L.; Liang, C.; Shirazian, S.; Zhou, Y.; Miller, T.; Cui, J.; Fukuda, J. Y.; Chu, J. Y.; Nematalla, A.; Wang, X.; Chen, H.; Sista, A.; Luu, T. C.; Tang, F.; Wei, J.; Tang, C., Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1h-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (7), 1116-1119.
- [145.] Wilhelm, S. M.; Dumas, J.; Adnane, L.; Lynch, M.; Carter, C. A.; Schutz, G.; Thierauch, K. H.; Zopf, D., Regorafenib (bay 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int. J. Cancer* **2011**, *129* (1), 245-255.
- [146.] Carroll, M.; Ohno-Jones, S.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B.; Gilliland, D. G.; Druker, B. J., Cgp 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing bcr-abl, tel-abl, and tel-pdgfr fusion proteins. *Blood* **1997**, *90* (12), 4947-4952.
- [147.] Zimmermann, J. Pyrimidin derivatives and process for their preparation. EP0564409B1, 19.01.2000, 2000.
- [148.] Sun, C. L. W., C. C.; Tang, P. C.; Koenig, M.; Zhou, Y.; Vojkovsky, T. N., A.S. Prodrugs of a 3-(pyrrolo-2-ylmethylidene)-2-indolinobne derivative. US 2003/0100555 A1, 29.05.2003, 2003.
- [149.] Boyer, S.; Dumas, J.; Phillips, B.; Scott, W. J.; Smith, R. A.; Chen, J.; Jones, B.; Wang, G. Oxo-1,3,5-perhydrotriazapine derivatives useful in the treatment of hyper-proliferative, angiogenesis, and inflammatory disorders. WO2004078746 A3, 01.03.2004, 2004.
- [150.] Heinrich, M. C.; Owzar, K.; Corless, C. L.; Hollis, D.; Borden, E. C.; Fletcher, C. D.; Ryan, C. W.; von Mehren, M.; Blanke, C. D.; Rankin, C.; Benjamin, R. S.; Bramwell, V. H.; Demetri, G. D.; Bertagnolli, M. M.; Fletcher, J. A., Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the north american intergroup phase iii trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: Calgb 150105 study by cancer and leukemia group b and southwest oncology group. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26* (33), 5360-5367.
- [151.] Pogorzelski, M.; Falkenhurst, J.; Bauer, S., Molecular subtypes of gastrointestinal stromal tumor requiring specific treatments. *Curr. Opin. Oncol.* **2016**, *28* (4), 331-337.
- [152.] Debiec-Rychter, M.; Scot, R.; Le Cesne, A.; Schlemmer, M.; Hohenberger, P.; van Oosterom, A. T.; Blay, J. Y.; Leyvraz, S.; Stul, M.; Casali, P. G.; Zalcberg, J.; Verweij, J.; Van Glabbeke, M.; Hagemeyer, A.; Judson, I.; Tissue, E. S.; Bone Sarcoma, G.; Italian Sarcoma, G.; Australasian Gastrointestinal Trials, G., Kit mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur. J. Cancer.* **2006**, *42* (8), 1093-1103.
- [153.] Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; Joensuu, H.; Roberts, P. J.; Eisenberg, B. L.; von Mehren, M.; Fletcher, C. D. M.; Sandau, K.; McDougall, K.; Ou, W. B.; Chen, C. J.; Fletcher, J. A., Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24* (29), 4764-4774.
- [154.] Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; von Mehren, M.; Heinrich, M. C.; Eisenberg, B.; Fletcher, J. A.; Corless, C. L.; Fletcher, C. D. M.; Roberts, P. J.; Heinz, D.; Wehre, E.; Nikolova, Z.; Joensuu, H., Long-term results from a randomized phase ii trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing kit. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26* (4), 620-625.
- [155.] Demetri, G. D.; van Oosterom, A. T.; Garrett, C. R.; Blackstein, M. E.; Shah, M. H.; Verweij, J.; McArthur, G.; Judson, I. R.; Heinrich, M. C.; Morgan, J. A.; Desai, J.; Fletcher, C. D.; George, S.; Bello, C. L.; Huang, X.; Baum, C. M.; Casali, P. G., Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: A randomised controlled trial. *Lancet* **2006**, *368* (9544), 1329-1338.
- [156.] Demetri, G. D.; Reichardt, P.; Kang, Y. K.; Blay, J. Y.; Rutkowski, P.; Gelderblom, H.; Hohenberger, P.; Leahy, M.; von Mehren, M.; Joensuu, H.; Badalamenti, G.; Blackstein, M.; Le Cesne, A.; Schoffski, P.; Maki, R. G.; Bauer, S.; Nguyen, B. B.; Xu, J.; Nishida, T.; Chung, J.; Kappeler, C.; Kuss, I.; Laurent, D.; Casali, P. G.; investigators, G. s., Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (grid): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **2013**, *381* (9863), 295-302.

- [157.] Garner, A. P.; Gozgit, J. M.; Anjum, R.; Vodala, S.; Schrock, A.; Zhou, T. J.; Serrano, C.; Eilers, G.; Zhu, M. J.; Ketzer, J.; Wardwell, S.; Ning, Y. Y.; Song, Y.; Kohlmann, A.; Wang, F.; Clackson, T.; Heinrich, M. C.; Fletcher, J. A.; Bauer, S.; Rivera, V. M., Ponatinib inhibits polyclonal drug-resistant kit oncoproteins and shows therapeutic potential in heavily pretreated gastrointestinal stromal tumor (gist) patients. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20* (22), 5745-5755.
- [158.] Bauer, S.; Joensuu, H., Emerging agents for the treatment of advanced, imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors: Current status and future directions. *Drugs* **2015**, *75* (12), 1323-1334.
- [159.] Nishida, T.; Blay, J. Y.; Hirota, S.; Kitagawa, Y.; Kang, Y. K., The standard diagnosis, treatment, and follow-up of gastrointestinal stromal tumors based on guidelines. *Gastric Cancer* **2016**, *19* (1), 3-14.
- [160.] Wu, L.; Zhang, Z.; Yao, H.; Liu, K.; Wen, Y.; Xiong, L., Clinical efficacy of second-generation tyrosine kinase inhibitors in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of recent clinical trials. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 2061-2067.
- [161.] O'Hare, T.; Shakespeare, W. C.; Zhu, X.; Eide, C. A.; Rivera, V. M.; Wang, F.; Adrian, L. T.; Zhou, T.; Huang, W. S.; Xu, Q.; Metcalf, C. A., 3rd; Tyner, J. W.; Loriaux, M. M.; Corbin, A. S.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Keats, J. A.; Wang, Y.; Sundaramoorthi, R.; Thomas, M.; Zhou, D.; Snodgrass, J.; Commodore, L.; Sawyer, T. K.; Dalgarno, D. C.; Deininger, M. W.; Druker, B. J.; Clackson, T., Ap24534, a pan-bcr-abl inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the t315i mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* **2009**, *16* (5), 401-412.
- [162.] Huang, W. S.; Metcalf, C. A.; Sundaramoorthi, R.; Wang, Y.; Zou, D.; Thomas, R. M.; Zhu, X.; Cai, L.; Wen, D.; Liu, S.; Romero, J.; Qi, J.; Chen, I.; Banda, G.; Lentini, S. P.; Das, S.; Xu, Q.; Keats, J.; Wang, F.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Snodgrass, J. T.; Broudy, M. I.; Russian, K.; Zhou, T.; Commodore, L.; Narasimhan, N. I.; Mohemmad, Q. K.; Iuliucci, J.; Rivera, V. M.; Dalgarno, D. C.; Sawyer, T. K.; Clackson, T.; Shakespeare, W. C., Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-n-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (ap24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (bcr-abl) kinase including the t315i gatekeeper mutant. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (12), 4701-4719.
- [163.] Cortes, J. E.; Kantarjian, H.; Shah, N. P.; Bixby, D.; Mauro, M. J.; Flinn, I.; O'Hare, T.; Hu, S.; Narasimhan, N. I.; Rivera, V. M.; Clackson, T.; Turner, C. D.; Haluska, F. G.; Druker, B. J.; Deininger, M. W. N.; Talpaz, M., Ponatinib in refractory philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367* (22), 2075-2088.
- [164.] Dorer, D. J.; Knickerbocker, R. K.; Baccarani, M.; Cortes, J. E.; Hochhaus, A.; Talpaz, M.; Haluska, F. G., Impact of dose intensity of ponatinib on selected adverse events: Multivariate analyses from a pooled population of clinical trial patients. *Leuk. Res.* **2016**, *48*, 84-91.
- [165.] Jain, P.; Kantarjian, H.; Jabbour, E.; Gonzalez, G. N.; Borthakur, G.; Pemmaraju, N.; Daver, N.; Gachimova, E.; Ferrajoli, A.; Komblau, S.; Ravandi, F.; O'Brien, S.; Cortes, J., Ponatinib as first-line treatment for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: A phase 2 study. *Lancet Haematol.* **2015**, *2* (9), e376-383.
- [166.] Zhang, Y.; Hodous, B. L.; Kim, J. L.; Wilson, K. J.; Wilson, D. Compositions useful for treating disorders related to kit. WO2015/057873, 2017.
- [167.] Flynn, D. L.; Petillo, P. A.; Kaufman, M. D. Cyclopropane amides and analogs exhibiting anti-cancer and anti-proliferative activities. US 8278331, 2013.
- [168.] Blu-285, dcc-2618 show activity against gist. *Cancer Discov.* **2017**, *7* (2), 121-122.
- [169.] Klebe, G., Wirkstoffdesign-entwurf und wirkung von arneistoffen. © *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg* 2009, **2009**; Vol. 2. Auflage.
- [170.] Anderson, A. C., The process of structure-based drug design. *Chem. Biol.* **2003**, *10* (9), 787-797.
- [171.] Lounnas, V.; Ritschel, T.; Kelder, J.; McGuire, R.; Bywater, R. P.; Foloppe, N., Current progress in structure-based rational drug design marks a new mindset in drug discovery. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**, *5*, e201302011.
- [172.] Lind, K. E.; Du, Z.; Fujinaga, K.; Peterlin, B. M.; James, T. L., Structure-based computational database screening, in vitro assay, and nmr assessment of compounds that target tar rna. *Chem. Biol.* **2002**, *9* (2), 185-193.
- [173.] Filikov, A. V.; Mohan, V.; Vickers, T. A.; Griffey, R. H.; Cook, P. D.; Abagyan, R. A.; James, T. L., Identification of ligands for rna targets via structure-based virtual screening: Hiv-1 tar. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, *14* (6), 593-610.
- [174.] Varney, M. D.; Marzoni, G. P.; Palmer, C. L.; Deal, J. G.; Webber, S.; Welsh, K. M.; Bacquet, R. J.; Bartlett, C. A.; Morse, C. A.; Booth, C. L.; et al., Crystal-structure-based design and synthesis of benz[cd]indole-containing inhibitors of thymidylate synthase. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (4), 663-676.
- [175.] Chan, D. C.; Laughton, C. A.; Queener, S. F.; Stevens, M. F., Structural studies on bioactive compounds. 34. Design, synthesis, and biological evaluation of triazenyl-substituted pyrimethamine inhibitors of pneumocystis carinii dihydrofolate reductase. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (16), 2555-2564.

- [176.] Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935-949.
- [177.] Seddon, G.; Lounnas, V.; McGuire, R.; van den Bergh, T.; Bywater, R. P.; Oliveira, L.; Vriend, G., Drug design for ever, from hype to hope. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26* (1), 137-150.
- [178.] Wang, J.; Deng, Y.; Roux, B., Absolute binding free energy calculations using molecular dynamics simulations with restraining potentials. *Biophys. J.* **2006**, *91* (8), 2798-2814.
- [179.] Singh, N.; Warshel, A., Absolute binding free energy calculations: On the accuracy of computational scoring of protein-ligand interactions. *Proteins* **2010**, *78* (7), 1705-1723.
- [180.] Marshall, G. R., Limiting assumptions in structure-based design: Binding entropy. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26* (1), 3-8.
- [181.] Nguyen, C. N.; Young, T. K.; Gilson, M. K., Grid inhomogeneous solvation theory: Hydration structure and thermodynamics of the miniature receptor cucurbit[7]uril. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137* (4), 44101.
- [182.] Genheden, S.; Mikulskis, P.; Hu, L.; Kongsted, J.; Soderhjelm, P.; Ryde, U., Accurate predictions of nonpolar solvation free energies require explicit consideration of binding-site hydration. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (33), 13081-13092.
- [183.] Czeslik, C.; Seemann, H.; Winter, R., Basiswissen physikalische Chemie. *Vieweg +Teubner | GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden*, **2010**.
- [184.] Maelicke, A.; Waßmer, T. Molecular Modelling beim Wirkstoffdesign. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/drug_design/modelling.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug_design/kraftfeldrechnung.vscml.html (accessed 13.11.2017).
- [185.] Heinrich, M. C.; Fletcher, C. D.; Anjum, R.; Serrana-Garcia, C.; Vodala, S.; Bauer, S.; Zhu, M.; Ning, Y.; Eilers, G.; Griffith, D.; Patterson, J.; McKinley, A.; Wardwell, S.; Wang, Y. F.; Garner, A. P.; Rivera, V. M. Ponatinib inhibits kinase mutations associated with drug-resistant gastrointestinal stromal tumors (gist). https://media4.asco.org/132/8235/81208/81208_poster_big_1.jpg (accessed 07.05.2018).
- [186.] Genheden, S.; Ryde, U., The mm/pbsa and mm/gbsa methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert. Opin. Drug. Discov.* **2015**, *10* (5), 449-461.
- [187.] Batista, J.; D., H. P. C.; Tolbert, R.; Geballe, M. T., Sitehopper - a unique tool for binding site comparison. *J. Cheminform.* **2014**, *6*, 57.
- [188.] Azam, M.; Seeliger, M. A.; Gray, N. S.; Kuriyan, J.; Daley, G. Q., Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (10), 1109-1118.
- [189.] Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Eyck, L. F., Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (47), 17783-17788.
- [190.] Krüll, J. Struktur-basiertes design, synthese und biologische evaluierung von reversiblen und irreversiblen inhibitoren der rezeptor-tyrosinkinase kit. Master Thesis, TU Dortmund, 2015.
- [191.] Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J., Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* **2007**, *19* (10), 2003-2012.
- [192.] Antonescu, C. R.; Yoshida, A.; Guo, T.; Chang, N. E.; Zhang, L.; Agaram, N. P.; Qin, L. X.; Brennan, M. F.; Singer, S.; Maki, R. G., Kdr activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Res.* **2009**, *69* (18), 7175-7179.
- [193.] Walter, J. W.; North, P. E.; Waner, M.; Mizeracki, A.; Blei, F.; Walker, J. W.; Reinisch, J. F.; Marchuk, D. A., Somatic mutation of vascular endothelial growth factor receptors in juvenile hemangioma. *Genes Chromosomes Cancer* **2002**, *33* (3), 295-303.
- [194.] Ryden, L.; Linderholm, B.; Nielsen, N. H.; Emdin, S.; Jonsson, P. E.; Landberg, G., Tumor specific vegf-a and vegfr2/kdr protein are co-expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *82* (3), 147-154.
- [195.] Duff, S. E.; Jeziorska, M.; Rosa, D. D.; Kumar, S.; Haboubi, N.; Sherlock, D.; O'Dwyer, S. T.; Jayson, G. C., Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: Implications for anti-angiogenic therapy. *Eur. J. Cancer.* **2006**, *42* (1), 112-117.
- [196.] Seto, T.; Higashiyama, M.; Funai, H.; Imamura, F.; Uematsu, K.; Seki, N.; Eguchi, K.; Yamanaka, T.; Ichinose, Y., Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and kdr receptors in stage i non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **2006**, *53* (1), 91-96.
- [197.] Shibuya, M., Vascular endothelial growth factor (vegf)-receptor2: Its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand vegf-e. *Endothelium* **2006**, *13* (2), 63-69.
- [198.] Wang, Q.; Liu, F.; Wang, B.; Zou, F.; Chen, C.; Liu, X.; Wang, A.; Qi, S.; Wang, W.; Qi, Z.; Zhao, Z.; Hu, Z.; Wang, W.; Wang, L.; Zhang, S.; Wang, Y.; Liu, J.; Liu, Q., Discovery of n-(3-((1-isonicotinoylpiperidin-4-yl)oxy)-4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)benz amide (chmfl-kit-110) as

- a selective, potent, and orally available type ii c-kit kinase inhibitor for gastrointestinal stromal tumors (gists). *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (8), 3964-3979.
- [199.] Liu, Y.; Gray, N. S., Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (7), 358-364.
- [200.] Li, Y.; Cheng, H.; Zhang, Z.; Zhuang, X.; Luo, J.; Long, H.; Zhou, Y.; Xu, Y.; Taghipouran, R.; Li, D.; Patterson, A.; Smaill, J.; Tu, Z.; Wu, D.; Ren, X.; Ding, K., N-(3-ethynyl-2,4-difluorophenyl)sulfonamide derivatives as selective raf inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (5), 543-547.
- [201.] Desai, B.; Dixon, K.; Farrant, E.; Feng, Q.; Gibson, K. R.; van Hoorn, W. P.; Mills, J.; Morgan, T.; Parry, D. M.; Ramjee, M. K.; Selway, C. N.; Tarver, G. J.; Whitlock, G.; Wright, A. G., Rapid discovery of a novel series of abl kinase inhibitors by application of an integrated microfluidic synthesis and screening platform. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (7), 3033-3047.
- [202.] Matulenko, M. A.; Paight, E. S.; Frey, R. R.; Gomtsyan, A.; DiDomenico, S., Jr.; Jiang, M.; Lee, C. H.; Stewart, A. O.; Yu, H.; Kohlhaas, K. L.; Alexander, K. M.; McGaraughty, S.; Mikusa, J.; Marsh, K. C.; Muchmore, S. W.; Jakob, C. L.; Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F.; Bhagwat, S. S., 4-amino-5-aryl-6-arylethynylpyrimidines: Structure-activity relationships of non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (4), 1586-1605.
- [203.] Zhang, C. H.; Zheng, M. W.; Li, Y. P.; Lin, X. D.; Huang, M.; Zhong, L.; Li, G. B.; Zhang, R. J.; Lin, W. T.; Jiao, Y.; Wu, X. A.; Yang, J.; Xiang, R.; Chen, L. J.; Zhao, Y. L.; Cheng, W.; Wei, Y. Q.; Yang, S. Y., Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of 3-(phenylethynyl)-1h-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine derivatives as a new class of src inhibitors with potent activities in models of triple negative breast cancer. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (9), 3957-3974.
- [204.] Ren, X.; Pan, X.; Zhang, Z.; Wang, D.; Lu, X.; Li, Y.; Wen, D.; Long, H.; Luo, J.; Feng, Y.; Zhuang, X.; Zhang, F.; Liu, J.; Leng, F.; Lang, X.; Bai, Y.; She, M.; Tu, Z.; Pan, J.; Ding, K., Identification of gzd824 as an orally bioavailable inhibitor that targets phosphorylated and nonphosphorylated breakpoint cluster region-abelson (bcr-abl) kinase and overcomes clinically acquired mutation-induced resistance against imatinib. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (3), 879-894.
- [205.] AbdelMagid, 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. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (11), 3849-3862.
- [206.] Guanti, G.; Banfi, L.; Riva, R., Regioselective synthesis of 1,8-dihydroxytetralins through a tandem reduction intramolecular hydroxyalkylation of 4-(3-hydroxyphenyl)alkanoates. *Tetrahedron* **1994**, *50* (41), 11945-11966.
- [207.] Zhang, J. H.; Gao, X. Q.; Zhang, C. Y.; Ma, J. F.; Zhao, D. F., Highly efficient system for reduction of carboxylic acids and their derivatives to alcohols by hfcl4/kbh4. *Synth. Commun.* **2009**, *39* (9), 1640-1654.
- [208.] Corey, E. J.; William Suggs, J., Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16* (31), 2647-2650.
- [209.] Miller, R. A.; Hoerner, R. S., Iodine as a chemoselective reoxidant of tempo: Application to the oxidation of alcohols to aldehydes and ketones. *Org. Lett.* **2003**, *5* (3), 285-287.
- [210.] Moorthy, J. N.; Singhal, N.; Venkatakrishnan, P., Studies on oxidations with ibx: Oxidation of alcohols and aldehydes under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (28), 5419-5424.
- [211.] Aiguade Bosch, J. New 7-phenyl-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3(2h)-one derivatives. EP 2 322 176 A1, 2011.
- [212.] Tamaki, K.; Yamagushi, T.; Oda, K.; Terasaka, N.; Nakai, D.; Nakadai, M. Benzene compound having 2 or more substituents. WO 2006/046593 A1, 2006.
- [213.] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N., Convenient synthesis of acetylenes - catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, (50), 4467-4470.
- [214.] Cassar, L., Synthesis of aryl-substituted and vinyl-substituted acetylene derivatives by use of nickel and palladium complexes. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93* (2), 253-257.
- [215.] Dieck, H. A.; Heck, F. R., Palladium catalyzed synthesis of aryl, heterocyclic and vinylic acetylene derivatives. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93* (2), 259-263.
- [216.] Chinchilla, R.; Najera, C., Recent advances in sonogashira reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (10), 5084-5121.
- [217.] Alves, D.; dos Reis, J. S.; Luchese, C.; Nogueira, C. W.; Zeni, G., Synthesis of 3-alkynylselenophene derivatives by a copper-free sonogashira cross-coupling reaction. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, (2), 377-382.

- [218.] Gu, Z.; Li, Z. Z.; Liu, Z. C.; Wang, Y.; Liu, C. B.; Xiang, J., Simple, efficient copper-free sonogashira coupling of haloaryl carboxylic acids or unactivated aryl bromides with terminal alkynes. *Catal. Commun.* **2008**, *9* (13), 2154-2157.
- [219.] Marion, N.; Nolan, S. P., Well-defined n-heterocyclic carbenes-palladium(ii) precatalysts for cross-coupling reactions. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (11), 1440-1449.
- [220.] Stará, I. G.; Starý, I.; Kollárovič, A.; Teplý, F.; Šaman, D.; Fiedler, P., Coupling reactions of ortho-substituted halobenzenes with alkynes. The synthesis of phenylacetylenes and symmetrical or unsymmetrical 1,2-diphenylacetylenes. *Collect. Czech. Chem. C.* **1999**, *64* (4), 649-672.
- [221.] Zhou, Z.; Zhao, L.; Zhang, S.; Vincent, K.; Lam, S.; Henze, D., Facile synthesis of functionalized bis(arylethynyl)benzene derivatives via sila-sonogashira reaction. *Synth. Commun.* **2011**, *42* (11), 1622-1631.
- [222.] Schilz, M.; Plenio, H., A guide to sonogashira cross-coupling reactions: The influence of substituents in aryl bromides, acetylenes, and phosphines. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (6), 2798-2807.
- [223.] Barrios-Landeros, F.; Hartwig, J. F., Distinct mechanisms for the oxidative addition of chloro-, bromo-, and iodoarenes to a bisphosphine palladium(0) complex with hindered ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (19), 6944-6945.
- [224.] 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.
- [225.] Cisbio bioassays tr-fret basics. <http://www.cisbio.com/other/drug-discovery/tr-fret-basics> (accessed 24.12.2017).
- [226.] Lambert, G. K.; Duhme-Klair, A. K.; Morgan, T.; Ramjee, M. K., The background, discovery and clinical development of bcr-abl inhibitors. *Drug Discov. Today* **2013**, *18* (19-20), 992-1000.
- [227.] Rey, J. B.; Launay-Vacher, V.; Tournigand, C., Regorafenib as a single-agent in the treatment of patients with gastrointestinal tumors: An overview for pharmacists. *Target Oncol.* **2015**, *10* (2), 199-213.
- [228.] Guo, T.; Agaram, N. P.; Wong, G. C.; Hom, G.; D'Adamo, D.; Maki, R. G.; Schwartz, G. K.; Veach, D.; Clarkson, B. D.; Singer, S.; DeMatteo, R. P.; Besmer, P.; Antonescu, C. R., Sorafenib inhibits the imatinib-resistant ktt670i gatekeeper mutation in gastrointestinal stromal tumor. *Clin. Cancer. Res.* **2007**, *13* (16), 4874-4881.
- [229.] Assay, P. C. C.-G. L. C. V. <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/> (accessed 01.01.2018).
- [230.] Z'-lyte kinase assay kits. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/kinasebiology/kinase-activity-assays/z-lyte.html> (accessed 05.01.2018).
- [231.] Eid, S.; Turk, S.; Volkamer, A.; Rippmann, F.; Fulle, S.; Kinmap: A web-based tool for interactive navigation through human kinome data. *BMC Bioinf.* **2017**, *18* (1), 16.
- [232.] Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G., "Scaffold-hopping" by topological pharmacophore search: A contribution to virtual screening. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38* (19), 2894-2896.
- [233.] Cramer, R. D.; Jilek, R. J.; Guessregen, S.; Clark, S. J.; Wendt, B.; Clark, R. D., "Lead hopping". Validation of topomer similarity as a superior predictor of similar biological activities. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (27), 6777-6791.
- [234.] Martin, Y. C.; S., M., Beyond qsar: Lead hopping to different structures. *Qsar & Combinatorial Science* **2009**, *28* (8), 797-801.
- [235.] Bohm, H. J.; Flohr, A.; Stahl, M., Scaffold hopping. *Drug Discovery Today: Technol.* **2004**, *1* (3), 217-224.
- [236.] Sun, H.; Tawa, G.; Wallqvist, A., Classification of scaffold-hopping approaches. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (7-8), 310-324.
- [237.] Vieth, M.; Siegel, M. G.; Higgs, R. E.; Watson, I. A.; Robertson, D. H.; Savin, K. A.; Durst, G. L.; Hipkind, P. A., Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (1), 224-232.
- [238.] Liu, X.; X., I.; Loren, J.; Molteni, V.; Nabakka, J.; Nguyen, B.; Petrassi, H., M. J.; Yeh, V. Compounds and compositions as c-kit kinase inhibitors. WO2013/033116A1, 2013.
- [239.] Diana, G. D.; Volkots, D. L.; Nitz, T. J.; Bailey, T. R.; Long, M. A.; Vescio, N.; Aldous, S.; Pevear, D. C.; Dutko, F. J., Oxadiazoles as ester bioisosteric replacements in compounds related to disoxaril. Antirhinovirus activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (15), 2421-2436.
- [240.] Hall, A.; Billinton, A.; Brown, S. H.; Chowdhury, A.; Giblin, G. M.; Goldsmith, P.; Hurst, D. N.; Naylor, A.; Patel, S.; Scoccitti, T.; Theobald, P. J., Discovery of a novel indole series of ep1 receptor antagonists by scaffold hopping. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (8), 2684-2690.

- [241.] Stanovnik, B.; Tišler, M.; Drnovšek, I., 3-bromoimidazo[1,2- b]pyridazine-bromine and 3-bromo-6-chloroimidazo [1,2- b]pyridazine-bromine complexes; new brominating agents for organic compounds. George Thieme Verlag: **1981**.
- [242.] Basham, K. J.; Bhonde, V. R.; Kieffer, C.; Mack, J. B.; Hess, M.; Welm, B. E.; Looper, R. E., Bis-aryloxadiazoles as effective activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (11), 2473-2476.
- [243.] Bauer, R. A., Covalent inhibitors in drug discovery: From accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (9), 1061-1073.
- [244.] Williams, D. P.; Kitteringham, N. R.; Naisbitt, D. J.; Pirmohamed, M.; Smith, D. A.; Park, B. K., Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3* (4), 351-366.
- [245.] Lanning, B. R.; Whitby, L. R.; Dix, M. M.; Douhan, J.; Gilbert, A. M.; Hett, E. C.; Johnson, T. O.; Joslyn, C.; Kath, J. C.; Niessen, S.; Roberts, L. R.; Schnute, M. E.; Wang, C.; Hulce, J. J.; Wei, B.; Whiteley, L. O.; Hayward, M. M.; Cravatt, B. F., A road map to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10* (9), 760-767.
- [246.] Erkes, D. A.; Selvan, S. R., Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: Plausibility of mediating antitumor immunity. *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 175265.
- [247.] Guengerich, F. P., Common and uncommon cytochrome p450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (6), 611-650.
- [248.] Zhou, S.; Chan, E.; Duan, W.; Huang, M.; Chen, Y. Z., Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab. Rev.* **2005**, *37* (1), 41-213.
- [249.] Utrecht, J.; Naisbitt, D. J., Idiosyncratic adverse drug reactions: Current concepts. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65* (2), 779-808.
- [250.] Erve, J. C. L., Chemical toxicology: Reactive intermediates and their role in pharmacology and toxicology. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2* (6), 923-946.
- [251.] Miller, J. A., The metabolism of xenobiotics to reactive electrophiles in chemical carcinogenesis and mutagenesis: A collaboration with Elizabeth Cavert Miller and our associates. *Expert Opin. Drug Discov.* **1998**, *30* (4), 645-674.
- [252.] 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* (1), 195-202.
- [253.] 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. Rev.* **2009**, *41*, 124-124.
- [254.] Walgren, J. L.; Mitchell, M. D.; Thompson, D. C., Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **2005**, *35* (4), 325-361.
- [255.] Lammert, C.; Einarsson, S.; Saha, C.; Niklasson, A.; Bjornsson, E.; Chalasani, N., Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: Search for signals. *Hepatology* **2008**, *47* (6), 2003-2009.
- [256.] Robertson, J. G., Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry* **2005**, *44* (15), 5561-5571.
- [257.] Jost, C.; Nitsche, C.; Scholz, T.; Roux, L.; Klein, C. D., Promiscuity and selectivity in covalent enzyme inhibition: A systematic study of electrophilic fragments. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (18), 7590-7599.
- [258.] Monks, T. J.; Lau, S. S., Reactive intermediates: Molecular and MS-based approaches to assess the functional significance of chemical-protein adducts. *Toxicol. Pathol.* **2013**, *41* (2), 315-321.
- [259.] Liebler, D. C., Protein damage by reactive electrophiles: Targets and consequences. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (1), 117-128.
- [260.] Chaikuad, A.; Koch, P.; Laufer, S.; Knapp, S., Targeting the protein kinases cysteinome. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**.
- [261.] Barf, T.; Kaptein, A., Irreversible protein kinase inhibitors: Balancing the benefits and risks. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (14), 6243-6262.
- [262.] 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* (5), 1347-1355.
- [263.] 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* (5), 1347-1355.
- [264.] Potashman, M. H.; Duggan, M. E., Covalent modifiers: An orthogonal approach to drug design. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (5), 1231-1246.

- [265.] Chackalamannil, S.; Rotella, D.; Ward, S. M., Comprehensive medicinal chemistry iii. Oliver Walter: Elsevier **2017**; p 79-80.
- [266.] Singh, J.; Gosh, S.; Kluge, A. F.; Petter, R. Heterocyclic compounds and uses thereof. US 2008/0300268 A1, 2008.
- [267.] Krippendorff, B. F.; Neuhaus, R.; Lienau, P.; Reichel, A.; Huisinga, W., Mechanism-based inhibition: Deriving $k(i)$ and $k(\text{inact})$ directly from time-dependent $ic(50)$ values. *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14* (8), 913-923.
- [268.] Kaitsiotou, H.; Keul, M.; Hardick, J.; Mühlenberg, T.; Ketzer, J.; Ehrh, C.; Krüll, J.; Medda, F.; Koch, O.; Giordanetto, F.; Bauer, S.; Rauh, D., Inhibitors to overcome secondary mutations in the stem cell factor receptor kit. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (21), 8801-8815.
- [269.] Wilson, A. J.; Kerns, J. K.; Callahan, J. F.; Moody, C. J., Keep calm, and carry on covalently. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (19), 7463-7476.
- [270.] 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* (6), 2361-2372.
- [271.] Wu, F. F.; Gao, S. G.; Chen, Z. Y.; Su, J. Y.; Zhang, D. Y., An efficient synthesis of 2-(2,2-difluoroethoxy)-6-trifluoromethyl-n(5,8-dimethoxy-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine-2-yl) benzenesulfonamide: Penoxsulam. *J. Chem. Res.* **2013**, (4), 197-200.
- [272.] Ueda, S.; Su, M.; Buchwald, S. L., Completely n1-selective palladium-catalyzed arylation of unsymmetric imidazoles: Application to the synthesis of nilotinib. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (1), 700-706.
- [273.] Flynn, D. L.; Petillo, P. A.; Kaufman, M. D.; Patt, W. C. Kinase inhibitors useful for the treatment of proliferative diseases. US 2009/0099190 A1, 2009.
- [274.] Richters, A.; Ketzer, J.; Getlik, M.; Grütter, C.; Schneider, R.; Heuckmann, J. M.; Heynck, S.; Sos, M. L.; Gupta, A.; Unger, A.; Schultz-Fademrecht, C.; Thomas, R. K.; Bauer, S.; Rauh, D., Targeting gain of function and resistance mutations in abl and kit by hybrid compound design. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (14), 5757-5772.
- [275.] Shen, W.; Tremblay, M. S.; Deshmukh, V. A.; Wang, W.; Filippi, C. M.; Harb, G.; Zhang, Y. Q.; Kamireddy, A.; Baaten, J. E.; Jin, Q.; Wu, T.; Swoboda, J. G.; Cho, C. Y.; Li, J.; Laffitte, B. A.; McNamara, P.; Glynn, R.; Wu, X.; Herman, A. E.; Schultz, P. G., Small-molecule inducer of beta cell proliferation identified by high-throughput screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (5), 1669-1672.
- [276.] Koroleva, E. V.; Kadutskii, A. P.; Farina, A. V.; Ignatovich, J. V.; Ermolinskaya, A. L.; Gusak, K. N.; Kalinichenko, E. N., A practical synthesis of 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzoic acid-the key precursor toward imatinib. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (38), 5056-5058.
- [277.] Nguyen, T.; Sakasegawa, Y.; Doh-ura, K.; Go, M. L., Anti-prion activities and drug-like potential of functionalized quinacrine analogs with basic phenyl residues at the 9-amino position. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (7), 2917-2929.
- [278.] Zhang, Y. Nitrogenous heterocyclic derivatives and their application in drugs. Wo 2014/012360 A1, 18.07.2013, 2013.
- [279.] Kazuhiko, T. T., Y.; Kozo, O.; Naoki, T.; Daisuke, N.; Masakazu, N. Benzene compound having two or more substituents. WO2006/046593 A1, 04.05.2006, 2007.
- [280.] Tasker, A. Z., D.; Chakrabarti, P. P.; Falsey, J. R.; Herberich, B. J.; Hungate, W. R.; Pettus, L. H.; Reed, A.; Rzasa, R. M.; Sham, K. K.C.; Thaman, M. C.; Xu, S. Phthalazine, aza- and diaza-phthalazine compounds and methods of use. US 2006/0199817 A1, 02.03.2006, 2006.
- [281.] Ren, X. M.; Pan, X. F.; Zhang, Z.; Wang, D. P.; Lu, X. Y.; Li, Y. P.; Wen, D. H.; Long, H. Y.; Luo, J. F.; Feng, Y. B.; Zhuang, X. X.; Zhang, F. X.; Liu, J. Q.; Leng, F.; Lang, X. F.; Bai, Y.; She, M. Q.; Tu, Z. C.; Pan, J. X.; Ding, K., Identification of gzd824 as an orally bioavailable inhibitor that targets phosphorylated and nonphosphorylated breakpoint cluster region-abelson (bcr-abl) kinase and overcomes clinically acquired mutation-induced resistance against imatinib. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (3), 879-894.
- [282.] Thomas, M.; Huang, W. S.; Wen, D.; Zhu, X. T.; Wang, Y. H.; Metcalf, C. A.; Liu, S. Y.; Chen, I.; Romero, J.; Zou, D.; Sundaramoorthi, R.; Li, F.; Qi, J. W.; Cai, L. S.; Zhou, T. J.; Commodore, L.; Xu, Q. H.; Keats, J.; Wang, F.; Wardwell, S.; Ning, Y. Y.; Snodgrass, J. T.; Broudy, M. I.; Russian, K.; Iulucci, J.; Rivera, V. M.; Sawyer, T. K.; Dalgarno, D. C.; Clackson, T.; Shakespeare, W. C., Discovery of 5-(arenethynyl) hetero-monocyclic derivatives as potent inhibitors of bcr-abl including the t315i gatekeeper mutant. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (12), 3743-3748.
- [283.] Hu, Y. L., Y.; Ding, J.; Ai, J. Alkynyl heterocyclic compounds and uses thereof. WO 2014/194667 A1, 04.06.2014, 2014.

- [284.] Richters, A. Kinaseinhibitoren als molekulare sonden in der chemischen biologie. Dissertation, TU Dortmund, 2013.
- [285.] ULC, C. C. G. C. *Molecular operating environment (moe)*, 2015, 2017.
- [286.] Case, D. A. B.; J.T.; Betz, R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham, I., T.E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N.; Izadi, S.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Li, P.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K. M.; Monard, G.; Needham, P.; Nguyen, H.; Nguyen, H. T.; Omelyan, I.; Onufriev, A.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Salomon-Ferrer, R.; Simmerling, C. L.; Smith, W.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; York, D. M.; Kollman, P. A. *Amber 2014*, 2014.
- [287.] Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C., Ff14sb: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99sb. *Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696-3713.
- [288.] Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A., Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157-1174.
- [289.] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., Vmd: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33-38, 27-38.
- [290.] Schmidtke, P.; Bidon-Chanal, A.; Luque, F. J.; Barril, X., Mdpocket: Open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics* **2011**, *27* (23), 3276-3285.
- [291.] Miller, B. R., 3rd; McGee, T. D., Jr.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E., Mmpbsa.Py: An efficient program for end-state free energy calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3314-3321.
- [292.] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R., Development and validation of a genetic algorithm for flexible ligand docking. . *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1997**, *214*, 727-748.

Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh für das Anvertrauen eines interessanten Themas für meine Dissertation, die gute Betreuung sowie die anregenden Diskussionen während meiner Dissertation und die Bereitstellung der Ressourcen für die Durchführung der nötigen Experimente danken. Herrn Prof. Dr. Daniel Summerer möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Zudem möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern bedanken, die an dem GIST Projekt mitgewirkt haben. Prof. Dr. Sebastian Bauer, Julia Ketzer und Thomas Mühlenberg von der Universität Essen, die mir einen Einblick auf mein Dissertationsthema von Seiten der Patienten und Ärzte ermöglicht haben und ihr Wissen um biologische Methoden mit mir geteilt haben. Dr. Fabrizio Giordanetto und Federico Medda sowie dem gesamten Team der Taros Chemical GmbH & Co.KG möchte ich für die Zusammenarbeit, die freundliche Aufnahme und die schöne Zeit, die ich bei Taros verbringen durfte, danken. Insbesondere Rachel, Xenia und Michael, die sich intensiv mit mir um die Aufreinigung bemüht haben. Danke ihr Lieben.

Dr. Oliver Koch und Christiane Ehrt möchte ich für die Anfertigung der MD-Simulationen und Docking-Versuchen, sowie die anregenden Diskussionen und den Einblick in die hier verwendeten computergestützten Methoden danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der instrumental-analytischen Abteilung der TU Dortmund. Prof. Dr. Wolf Hiller und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Durchführung zahlreicher, nicht immer einfacher NMR-Messungen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei Dr. Petra Janning und Jens Warmers aus der AG Waldmann für die Wartung der LCMS Geräte sowie die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der LCMS Messungen bedanken. Petra Janning, Andreas Brockmeyer und Malte Metz danke ich für die die Durchführung der HRMS und MS/MS-Messungen.

Für die schöne Zeit in- und außerhalb des Labors, anregenden Gespräche, Hilfe bei allen möglichen Fragstellungen und gute Zusammenarbeit möchte ich den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rauh: Andretinib, Becker, Svenja, Julian, Stevo, Mikey Mouse, Justus Lisa, Bianca, Kira, Tobi, Zhizhou, Rajesh, Debjit, Patrik, Jörn, Marina, Janina, Andreas, Martina, Uli, Maria, Petra, Nickel, Jonas, Marius, Lena, Ina und Matthias, sowie unseren adoptierten Mitgliedern Jasmin, Alinöö, Jana, Robo, Luke und Leandi

danken. Es war eine geile Zeit, an die ich noch lange zurückdenken werde. Vielen Dank Leute.

Insbesondere danke ich meiner Masterstudentin Jasmin Krüll, die mit den Ergebnissen ihrer Thesis zu dieser Arbeit beigetragen hat. Simone Eppmann, André Richters und Marina Keul danke ich dafür, dass sie einen Chemiker unter ihre Fittiche genommen haben und ihm biochemische sowie zelluläre Evaluierungsmethoden beigebracht haben.

Besonders Marina, die ich weiß nicht wie viele Tage mit mir und den GIST Zellen verbracht hat und so einige biochemische Messungen mit mir durchgeführt und ausgewertet hat, möchte ich danken.

Mike Bührmann, Steven Smith, Jens Wilkus und André Richters möchte ich für die Korrektur der Dissertation und die hilfreichen Kommentare danken.

Max, Ina, Anna, Annika, Tascha und Oli möchte ich vor allem für ihr Verständnis, insbesondere wenn es im Labor dann doch mal wieder länger gedauert hat, die willkommene Ablenkung vom Laboralltag und die vielen, vielen Jahre die wir jetzt schon befreundet sind, danken.

Für sein Verständnis, seine Unterstützung, Liebe und dafür, dass er meine Tiraden erträgt und trotzdem noch motivierende Worte findet, kann ich meinem Freund Jens gar nicht genug danken.

Der größte Dank geht an meine Familie: Meine Eltern, Chaido und Antonios, und meiner kleinen Schwester Tina, ohne eure Unterstützung und einfach eurem Dasein wäre diese Arbeit und dieses Studium nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr mich immer wieder aufgebaut habt, mir gut zugesprochen habt, mich abgelenkt und mir mit Rat und Tat zur Seite standet. Danke für alles.

Eidesstattliche Erklärung

Kaitsiotou, Helena

Name, Vorname

116182

Matrikel-Nr.

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, 13.05.18

Ort, Datum

Unterschrift

Titel der Dissertation:

„Design, Synthese, biochemische und zelluläre Evaluierung von Inhibitoren zur Umgehung von Wirkstoffresistenzen in KIT-abhängigen gastrointestinalen Stroma Tumoren (GIST)“

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, 13.05.18

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Helena Kaitsiotou

Geburtstag 13.01.1988

Geburtsort Dortmund

Staatsangehörigkeit griechisch

Ausbildung

seit 06.2014 Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Forschungsgruppe: Daniel Rauh
Teile der Arbeit wurden im Rahmen des Kooperationsprojektes in der Taros Chemicals GmbH & Co. KG erstellt (15 Monate).

Titel der Dissertation:

„Design, Synthese, biochemische und zelluläre Evaluierung von Inhibitoren zur Umgehung von Wirkstoffresistenzen in KIT-abhängigen gastro-intestinalen Stroma Tumoren (GIST)“

09.2011-09.2013 M. Sc. Chemie Technische Universität Dortmund
Schwerpunkt: Anorganische Chemie; Organische Chemie
Titel der Masterarbeit:

“Strukturbasiertes Design und Synthese kovalenter TBK1-Inhibitoren“

abgeschlossen als Master of Science

08.2007-09.2011 B. Sc. Chemie Technische Universität Dortmund
Schwerpunkt: Anorganische Chemie; Organische Chemie
Titel der Bachelorarbeit:

“Flexible, Metall-modifizierte Purin-Komplexe als künstliche Analoga für Nukleobasen Quartette“

abgeschlossen als Bachelor of Science